

異物検査における顕微鏡画像の提示方法の開発

—三点視法—

青木 央

Presentation method of integrated microscope photo image for Food contamination inspection

Hiroshi Aoki

要 旨

異物検査は、分析機器、IT技術の進歩により、実施が容易な環境が整って来ている。食品の異物検査の場合は、通常の生物試料と異なり、材質の異なる物質が混在するという試料を観察する。顕微鏡検査で得られた、明視野、暗視野、位相差の3つの観察方法により、同定の確実性を向上できるが、これらを一定の構成式により1枚の画像に説明を表現する方法を開発した。つまりは画像処理のソフトウェア技術によって、ハードウェアの欠点を補正できる。検査対象物の観察像の特徴をIT技術により統合することが可能で、真正性を変更することなく検査対象物のイメージを専門家ではない一般消費者という第三者に伝える技術が開発できるだろう。

食品の苦情や相談の要因を分類すると、腐敗・変敗、カビの発生、異味・異臭、変色、変質や表示、取扱方法（調理法、開封方法、保存の仕方）などがあり、これらと比較して、全体の2割は、「異物の混入」に関しての苦情となっている。食品の安全と安心から、この課題に関する消費者の視点は、年々厳しくなる方向にあり、寄せられる件数も増加の傾向にある¹⁾。

クレームが発生したとき消費者から理化学的な分析検査が求められた場合、解決する手段として取られる3大手法は、既に一般化していて「顕微鏡観察」、「赤外分光分析」、「X線定性元素分析」である。その他にも還元、パイロライザーに代表されるGC-MSを使った燃焼臭気試験、溶媒への溶解性を利用してのHPLCやLC-MSを用いた定量定性試験、さらに、現代ではDNA鑑定法の応用などさまざまな分析手法が適用されるが、異物の検査の場合は、サンプルがこれひとつで少量という条件のもとで、確実な分析を実行する必要があるため、非破壊検査が優先されるという特殊事情がある。

工業技術センターでもこの異物検査でよく実施される生物顕微鏡観察と赤外分光分析法の2つの分析手法については、依頼実績が増加傾向にある。(図1)これには理由があって、ひとつは分析機器の進歩、それから、写真のデジタル化、インターネット情報検索などのIT環境の変化がある。表

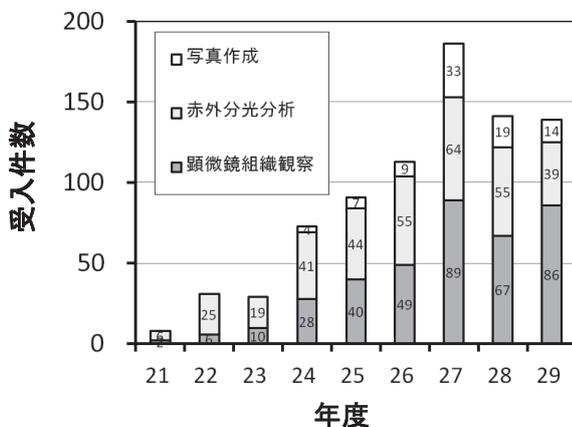


図1 異物検査でよく実施される試験項目の過去9年間の受入実績の変化

1にまとめてみたが、この分析機器の環境の変化は、異物検査における微小化、非破壊化の要求に答え、また、その得られた分析データが意味するところの所見の回答に必要な知識の取得に貢献することに、多大な進歩があるといえる。

表1 異物検査に使える機器環境の変遷

20世紀 1990年代	21世紀
フィルム式カメラ	デジタル式カメラ
波長分散型IR分析計	フーリエ変換型IR分析計
KBr錠剤成形法	ATR法
単機能型光学顕微鏡	位相差、明暗視野一体型 生物顕微鏡
コマンド式テキスト検索	インターネット情報検索

図1中の写真作成は、検査対象物の復元や外見証明に利用される。異物混入の問題は特別食品関係に限ったことではなく、半導体などの電子産業や、食品とは無関係の機械製造、包装関係資材の関係のファインケミカル関係などにも発生するが、特に、食品関係でいえば、金属探知機が普及しているので金属異物の混入リスクが低いという事情がある一方で、食べ物だけに身体への影響が直接及ぶのではないかなどの危機感と相まって社会的な事件となるなど関心の高い影響もある。学校給食の関係は健常な大人と異なり、社会的な弱者となる児童、生徒が消費者となり、献立を計画する提供者は十分な警戒をしている。法規の関係では、食品衛生法第6条に異物混入の禁止が定められている。

異物検査ではまず、指摘を受けた検査対象物の外見検査から始まり、その特徴から顕微鏡を使った細かな検査を進めてゆく。この時使われる顕微鏡には、実体顕微鏡と呼ばれる概ね30倍程度の拡大観察の可能な装置と800倍程度の拡大が観察可能な光学顕微鏡が利用される。

光学顕微鏡といっても様々な種類があり、生物系試料に適したもの他、金属試料に適した顕微鏡もあるが、ここでは生物顕微鏡について話す。現在の生物顕微鏡で特に正立顕微鏡という構造の機種は、教科書や学校実習でおなじみのスライドガラスにカバーガラスを乗せて試料を対物レンズの焦点に合わせ、接眼レンズを覗き込んで観察する。さらに詳しい説明は文献^{2) 3)}を参考にしてい

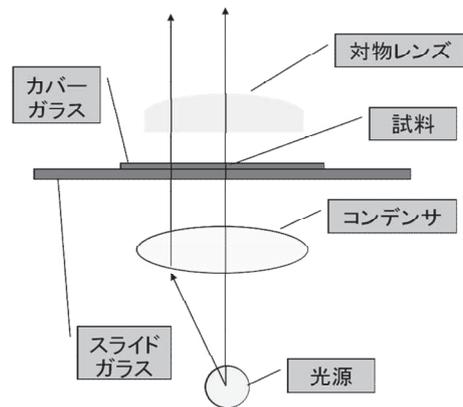


図2 明視野顕微鏡の光学系のうち照明部分の模式図

ただきたいが、この機種は明るい視野の観察像が得られ極めて一般的である。光学系のうち、この照明部分の概要を示すと図2のようになる。

試料の下側から光を照らし透過光を観察するシステムとなっている。この時、ケーラー照明という光学系が組み込まれていて、網膜に光源が結像するというのではない。この観察方法は一般的であるが、試料そのものが厚めであると背景光の強さに透過光が負けて、色調が判りにくいということが起こる。いわゆる「像がつぶれる」という現象を引き起す。病理検査などではマイクロームという機械を使ってスライスを薄く10 μ m以下に切るということが行われ、このような不具合を解消するが、パラフィンに包埋しての作業は時間を要すことや、引き続き実施される赤外分光分析の妨げになることがあって、検査対象物がこの方法の適用にならないケースが頻発する。サンプルロスのリスクを避けるため、ハンドカットを多用することになって、検鏡用の試料は厚めになるという事情が発生する。

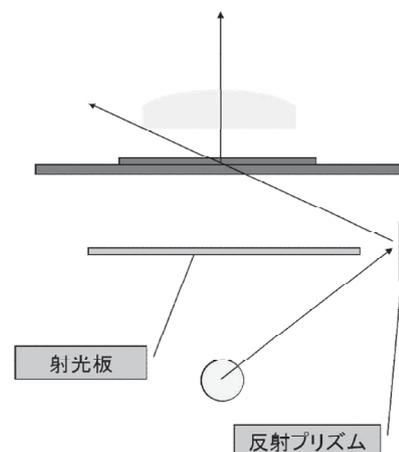


図3 暗視野顕微鏡の光学系のうち、照明部分の模式図

このような事情が発生する異物の検査で有効な方法が光を透過ではなく、側面から照射し、その散乱光を観察するという暗視野法という方法がある。透過光の場合は背景が明るいので明視野法と呼ばれるが、この暗視野法では背景が黒くなる。その光学系照明部分の模式図を図3にしめしたが、この方法によると、背景には透過してくる光がないので、暗闇の中に試料が観察される。そのため、検査対象物の質感が判りやすいという特徴がある。色がつぶれないで再現できるが、異物検査では、内部構造の詳細が判り難いことがある。

以上の明視野法と暗視野法により、多くの試料の観察が可能であるが、特に問題になるのが、水分の多い試料の場合である。顕微鏡で試料の観察が可能となるのは、試料に滴下した水と検査対象物との間に屈折率の差があるときである。生物試料で特に含水物が多い試料の場合は、どちらの方法を用いても十分な観察ができない。このような光学顕微鏡の欠点を解消するために工夫されたのが、位相差顕微鏡法である。対物レンズに設定された干渉リングにより、光の位相を意図的に生みだしてコントラストを強調する方法（図4）は、フリッツ・ゼルニケ（Frederik ('Fritz') Zernike、1888-1966年、オランダの物理学者）の発明になるもので、1953年にノーベル物理学賞を受賞している。水分の多い試料の内部状態や外形状がよく観察されるという特徴がある。このため微生物である細菌やカビ酵母などの外見形状の観察、そして煩雑な染色操作が不要で生体組織観察が可能となる。しかし、光の干渉を利用するため、色の再現性はないという欠点がある。

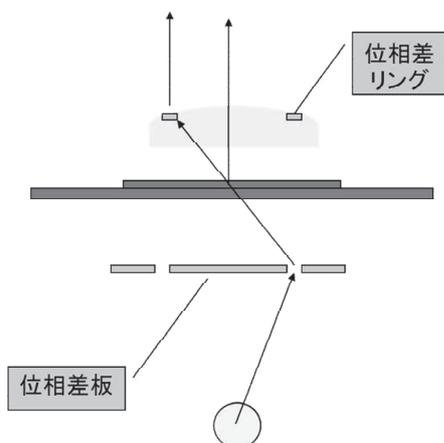


図4 位相差光学顕微鏡の光学系のうち照明部分の模式図

光学顕微鏡の光学系はそれぞれの観察対象物に合わせた検鏡法が発達して来ているので、目的にあった最良の方法を選択する。ところが異物検査の場合は事情が少し異なってくる。要するに検査対象物がどんなものか未知という前提に立つので、観察対象物に合わせた検鏡法の選択があらかじめできないのである。そのため、観察作業を進めながら検査対象物の説明に適切な観察像の得られる顕鏡法を探すということが実施される。

微生物汚染であれば位相法で、プラスチックなら暗視野でなどと証拠となる撮影像を得る作業が始まるが、食材にプラスチック片があって、微生物の汚染があるという試料が異物の場合は、そのことを同時に観察できる最良の方法がない。本報では、この異物検査における特殊事情を考慮し、顕微鏡画像の特徴を生かした提示方法の工夫を詳解する。

図2から図4に示した検鏡法を一つにした光学顕微鏡のシステムは現存している。基本的には位相差リングを内蔵した対物レンズは、位相差板といわれる一種の絞りのようなものを除くと通常の透過光を用いた明視野顕微鏡と同じ観察が可能である。この3つの検鏡法は同じ位相差用の対物レンズで、すなわち検査対象物に対する光軸を変更することなく、照明光の光路を切り替えるだけで切り替えが可能なのである。光の当て方を変えるだけだから、撮像したときに画像のフレームにブレが原理的には生じない。そのため、画像の重ね合わせが容易という特徴がある。しかし、この3つの観察法はその光学系の仕組みから同時観察ということは構造上できない。そこで、この構造上不可能な画像の取得を情報処理技術によって実現し、3つ観察法がもつそれぞれの欠点を解消し、異物検査の検体に適した画像の提示ができないかという課題を解決しようとするものである。

表題の「三点視法」は、「三視点合視法」と表現した方が判り易いかもしれないが、独自の呼称である。イメージを第三者に伝えて易くする方法の工夫で、観察方法の特徴を知らなくてもいい便利な手法、異なる材料の混在している場合に利点のある手法になると思っている。

「三点視法」は、通常の顕微鏡の観察手法である「明視野法」 $N(x,y)$ の他に、側面から照明光を当てる「暗視野法」 $DF(x,y)$ 、それから、コント

ラストを強調し、水分の多い生物試料に適合した「位相差法」 $PH(x,y)$ の3つの方法によって取得した画像を定式により情報処理する方法である。

従来のように、顕微鏡の組織観察像を従来のフィルム式で得ていた場合、

$$\text{画像 } G(x,y) = aN(x,y) + bDF(x,y) + cPH(x,y)$$

但し a,b,c : 定数

と表現する事、そして $a=b=c=1/3$ というような重みを設定する。すなわち単純な重ね合わせが限界であった。しかし、次のような新しい画像: 三点視法 $G(x,y)$ の構成概念式

$$\text{三点視法 } G(x,y) = a DF(x,y) * N(x,y) + b PH(x,y)$$

但し a,b : 補正係数 $a+b=1$

が計算できれば、明視野の光の透過、暗視野の散乱、位相差の屈折率の違いを同時に表現することが可能になるのではないかと考えた。これが3点視法である。演算子 $*$ は画像の「曇り込み」という概念で、直感的には顕微鏡照明の仮想的な無影化を実現し、それに生物試料に適したコントラストを加えるという方式になる。

以下に実施例を解説する。顕微鏡用の試料は、定法にしたがって、スライドグラスに採取し、カバーグラスをかけて顕鏡する。装置は双眼生物顕微鏡(Nikon Eclipse-Ni)に、明視野、暗視野、位相差の3観察法一体型のレンズ・コンデンサセットを用いた。撮像は、NikonカメラDS-Ri1でBMP形式によりおこなった。

この画像処理の計算ソフトであるが、1からの開発では著者には難しいので、入手可能なPCソフトからAdobe Photoshop5.0LEを使用した。このフォトショップ⁴⁾は世界的に流通している画像処理ソフトでバージョンが多彩であるが、この版はスキナのバンドル版として広く流通した経緯がある。

このPCアプリによる画像処理により、検査対象物の特徴を1枚の画像に表現した観察結果を図7に示した。画像処理ソフトの具体的な内部関数は公開情報がなかったので、試行錯誤でコマンドを

試すことになったが、演算子 $*$ はレイヤーの「乗算」、演算子 $+$ は「オーバーレイ」を用いると結果が良かった。 a と b は、「不透明度」を%で設定すると結果が良かった。

図5の検査対象物の例では、ゲル状のものに線維性の物質が混在するが、明視野 $N(x,y)$ の画像では、線維性のものとゲル状のものとの存在が確認できるが、線維の色調などが再現できていない。また、ゲル状のもの内部の様子は不明瞭という観察像になっている。一方、暗視野 $DF(x,y)$ は、線維性のものの質感がよくわかり、また色調も鮮やかな赤色であることがよく判るほか、色調の異なる繊維も混在していることが確認できる。位相差 $PH(x,y)$ では、ゲル状のものと思われる透明部分の内部の様子が鮮明になり、カビ菌糸のようなものの汚染のないことが知れる。このようにそれぞれの画像には観察像の特徴があり、一方で不足もあるが、この3枚を画像処理により得た三点視法 $G(x,y)$ の例(図7上段)を見ると1枚の画像でほぼ全てを説明できる画像構成になっているのではないと思われる。

図6の場合では、明視野で平坦で茶色に見える組織は、暗視野でみると色調の黒い組織である。スライドグラス上で引き伸ばされているこの部分は位相差でははっきりと繊維性のものが確認できる。赤色の色素は左側に塊があるが、さらに細かな粒子の分布が、実は位相差でみえる繊維性のおそらくはゲル形成された繊維の濃度差に従って分散していることが3つの画像により予想される。三点視法による画像は図7下段に示したが、これらの様子が鳥瞰図のようによく見てとれる。繊維の谷に色素の点粒物の羅列と分布が良く見て取れる。半島の先にある飛地のような2つの領域の存在がはっきり認識できる。右下側のフレームアウトした部分は、位相差 $PH(x,y)$ の情報が加算されていない部分となるが、観察像は単に黒ずんだ様子にとどまり、鳥瞰図のような立体感を表現できないことがわかる。

図7は、 $G=0.5DF * N+0.5PH$ を表現した写真画像が表現されていて、今回は単純に画像の重みを等分しているだけであるが、人の目の感覚に近い画像となっているのではないかと考えている。

三点視法における補正係数 a と b の設定は、最適化の方法について数理的な根拠を得ているもの

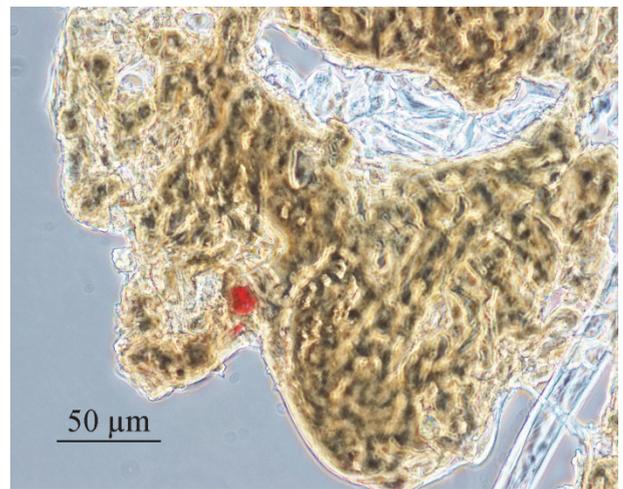
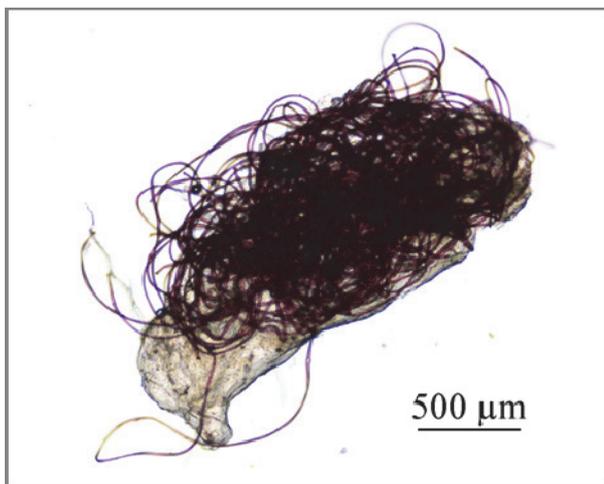
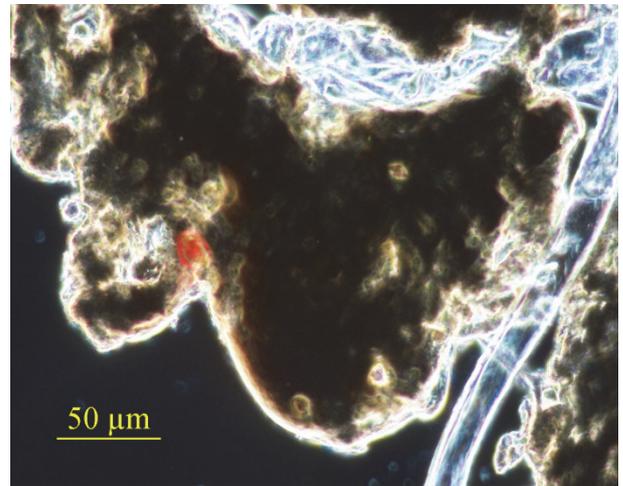
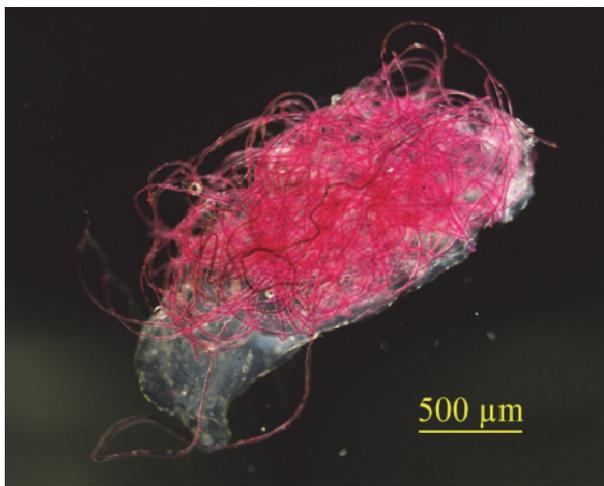
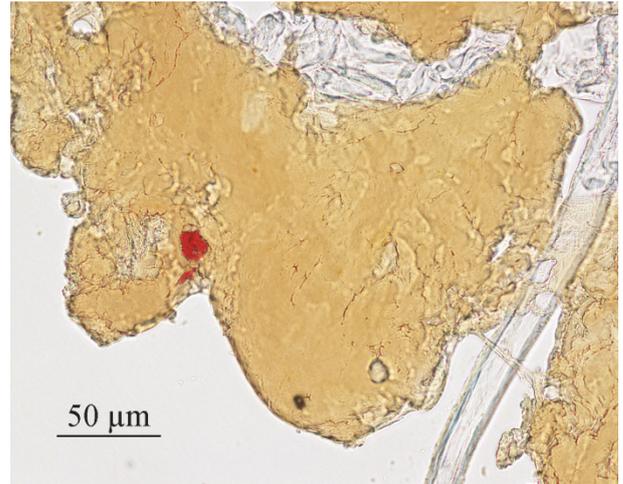
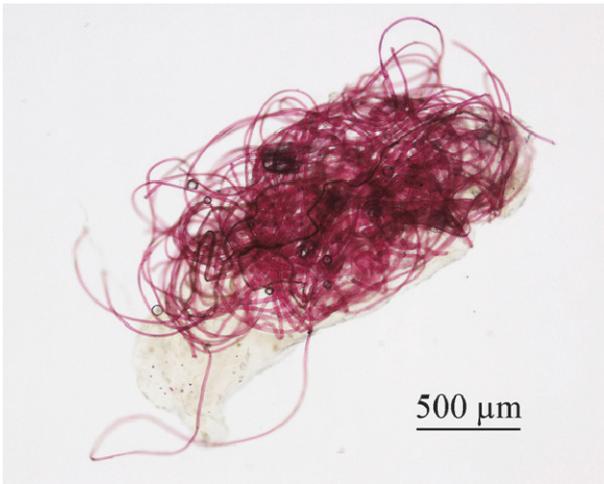


図5 顕微鏡組織観察の例1

上から明視野 $N(x,y)$ 、暗視野 $DF(x,y)$ 、位相差 $PH(x,y)$ の各撮影像、観察方法によって全く異なる印象を得る。

図6 顕微鏡組織観察の例2

上から明視野 $N(x,y)$ 、暗視野 $DF(x,y)$ 、位相差 $PH(x,y)$ の各撮影像。若干のフレームシフトがあるが補正できる。

ではないから、現在のところ経験ある検査担当員により最適値を探すほかない。この設定が善量な管理によって公正に行われるのであれば第三者証

明に利用できると思われる。異物検査という特殊な事情、生物試料と非生物試料が混在する試料の特性により利用が見込まれる観察方法と思われる。

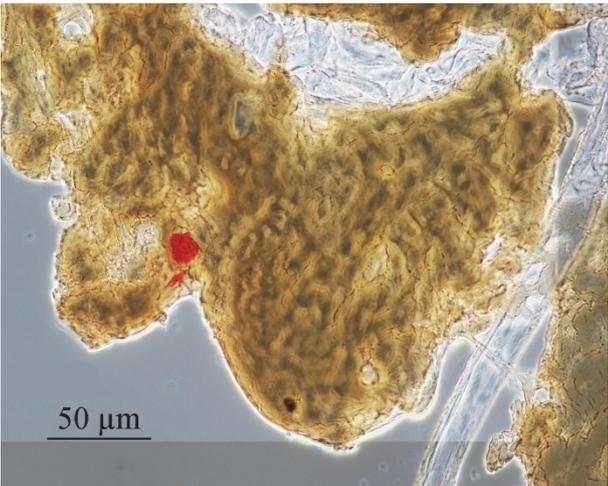
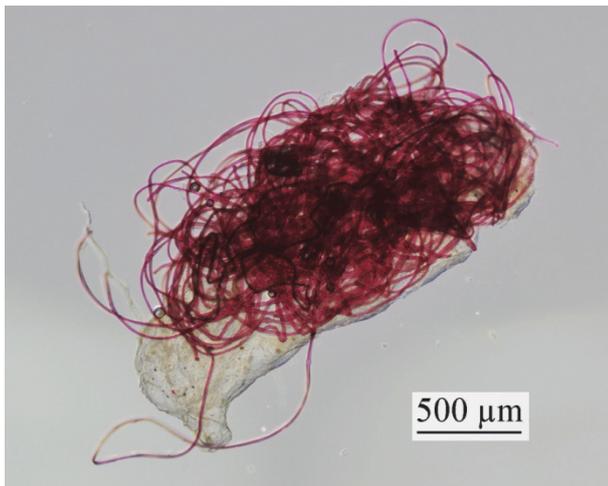


図7 三点視法による構成画像 $G(x, y)$ の例

上段は図5の場合である。色調の再現性は若干落ちるが、良好で、ゲル状の組織に包埋されている様子が判りやすい。下段は図6の場合で、中心部の形状が鳥瞰図のように表現できる。その半島端部にある2つの飛地のようなものも視認が容易な表現がされている。フレームシフトがある場合も調整が可能であるが、右と下にL字のような無効画像ができるので注意が必要である。また、スケールは入れ直しになる。

将来的には、一定の規則にしたがって、客観的に設定できるように公式化（主観の排除）できればよいが、信号処理が心理との関係で容易ではないケースの出現に備えて、デープラーニング（深層学習）の手法の活用により、AI（人工知能）の

活躍を期待してもよい分野ではないかと思う。

まとめると、異物検査は、分析機器、IT技術の進歩により、実施が容易な環境が整って来ている。顕微鏡検査では、明視野、暗視野、位相差の3つの観察手法を駆使することにより、同定の确实性を向上できるが、これらを一定の構成式により1枚の画像に説明を表現できる。

食品の異物検査の場合は、通常の生物試料と異なり、材質の異なる物質が混在するという試料を観察する。画像処理の技術によって、観察目的に合わせたハードウェアの欠点を補正し、検査対象物の特徴をIT技術により統合することで、真正性を変更することなく検査対象物のイメージを専門家ではない一般消費者という第三者に伝えることがこれからは大切な技術になるとと思われる。

文 献

- 1) 東京都福祉保健局：「食品の苦情統計」：
<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/shokuhin/kujou/>（2017年4月閲覧）
- 2) 稲澤譲治、津田均、小島清嗣：細胞工学別冊“顕微鏡フル活用術イラストレイテッド（秀潤社）（2000）
- 3) 野島博：“顕微鏡の使い方ノート- 光学顕微鏡からCCDカメラまで-”（羊土社）（1997）
- 4) アドビフォトショップ：https://ja.wikipedia.org/wiki/Adobe_Photoshop（2018年9月閲覧）

*本研究の「三点視法」は平成29年度北海道立工業技術センター研究成果発表会（2017年5月18日）で公表済みです。

謝辞：この研究は、北海道経済産業局、（公財）北海道科学技術総合振興センターの実施する事業資金により整備された研究機材が活用されています。関係者の皆様には、この場をかりて、感謝申しあげます。