

# フローイメージング顕微鏡 FlowCam による有害藻類の自動判別および計数技術開発

## Development of Automated Identification and Counting Technology for Harmful Algae Using the Flow Imaging Microscope FlowCam

中西 弘文<sup>\*1</sup> 伊藤 友哉<sup>\*1</sup>  
Hirofumi Nakanishi Tomoyoa Itou

現在、水質および海洋環境分野における水中微細藻類の種判別・個体数計測は熟練技術者による手作業に依存しており、精度と効率に課題がある。本研究では、当社製フローイメージング顕微鏡 FlowCam を用いた自動判別および計数技術を開発した。上水原水や海水のサンプルには対象外の藻類や異物が多数含まれ、これが誤判別の主因となる。これに対処するため、対象外データの誤分類を抑制する判別補助モジュールを導入して精度向上を図った。ノリ養殖海域における有害藻類 *Coscinodiscus wailesii* を対象に検証した結果、種判別精度 95% 以上、細胞密度推定誤差  $\pm 10\%$  以内を達成した。本技術は、従来手法に比べて高精度かつ効率的な藻類モニタリングを実現し、水質管理や赤潮予測への応用が期待される。

Species identification and population measurement of underwater microalgae in the fields of water quality and marine environment monitoring rely heavily on manual work performed by skilled operators, posing challenges in terms of accuracy and efficiency. In this study, we have developed an automated identification and counting technology using FlowCam by YOKOGAWA, a flow imaging microscope. Samples of raw water and seawater often contain numerous non-target algae and foreign particles, which are the primary causes of misclassification. To address this issue, a classification support module was introduced to suppress misclassification of non-target data, thereby improving accuracy. Verification targeting the harmful alga *Coscinodiscus wailesii* in seaweed farming areas demonstrated species identification accuracy of over 95% and a cell density estimation error within  $\pm 10\%$ . This technology enables highly accurate and efficient algae monitoring compared to conventional methods and is expected to contribute to applications such as water quality management and red tide prediction.

### 1. はじめに

ダム貯水池は飲料用上下水の供給源として重要な役割を果たしているが、微細藻類が大量に繁殖するとフィルターの詰まり、臭気の発生、味の低下といった問題を引き起こす<sup>(1)</sup>。また、海域において有害藻類が発生すると、水産養殖、および魚介類を通して人間の健康へ被害を及ぼす可能性がある<sup>(2)</sup>。そのため、このような水域では定期的に水質が調査され、有害藻類の発生や毒素生成リスクを早期に特定することで被害を最小限に抑える対策が実施されている。

現状の生物学的な水質調査では、上水原水や海水のサンプルをラボにて顕微鏡観察し、形態的特徴を基に微細藻類を分類・計数し、種毎の細胞密度を算出するという手法が用いられている。具体的な一例として、1 ミリ方眼のます目

が入ったプランクトン計数板に一定量のサンプル水を注入し、顕微鏡下でます目内の微細藻類を種判定し、カウンターを使って種毎の細胞数を計数する。全てのます目の計数結果をサンプル注入量で除することにより細胞密度を算出している<sup>(3)</sup>。

しかし、このような手法では、多大な労力がかかる上、測定に長い時間を要する。また、専門知識を持った熟練技術者でなければ実施できないことや、技術者により判断が異なるために測定精度がばらつく可能性がある。

そこで、本研究では、当社製のフローイメージング顕微鏡 FlowCam を用い、自動で高速に、微細藻類を種判別し、計数する手法を開発した。FlowCam は、フローセル内を流れる液体サンプル中の粒子を連続的に撮像し、その画像を記録・解析する。図 1 に FlowCam8000 の外観を示す。FlowCam8000 は、取得した画像から粒子サイズや粒子形状などを解析できるが、種を判別する機能を有していない。そこで、本研究では、取得した画像から学習モデルを

<sup>\*1</sup> マーケティング本部イノベーションセンター DX 事業創出部

作成し、人工知能による種判別技術を開発した。上水原水や海水のサンプルには対象外の藻類や異物が多数含まれ、これが誤判別の主因となることから、対象外データの誤分類を抑制する判別補助モジュールを導入して精度向上を図った。本稿では、本技術の開発と、本技術を用いてノリ養殖海域における有害藻類 *Coscinodiscus wailesii* (*C. wailesii*) の判別および細胞計数の検証を行った結果を報告する。



図1 FlowCam8000の外観

## 2. 本論

### 2.1 手法

#### 2.1.1 システム概要

本研究のシステムでは、FlowCam8000による網羅的な粒子画像取得および形態指標算出を起点とし、対象藻類種の判別および細胞密度の推定を目指す(図2)。FlowCam8000は2×~20×の対物レンズを使用できるが、*C. wailesii*(直径数100μmの円筒形状微細藻類)の画像の鮮明さと画像取得スループットを両立するために4×対物レンズを用いた。

具体的には、FlowCamにより各粒子のクロッピング(各粒子を検出し、切り出す処理)とマスク生成(粒子の形に沿って領域を抽出する処理)を行い、形態指標を算出し種判別を実施した。本検証では、対象種*C. wailesii*の同定に、FlowCamが算出する形態指標と1クラス分類を組み合わせる「形態指標方式」と、クロッピングされた粒子画像を直接学習させる「深層学習方式」の2方式を用い

た。現場サンプルには対象種外の粒子が混入し得るため、両方式とも判別対象外粒子を除外するOOD(Out-of-Distribution)検知機構を実装した。ここでのOODは学習された分布からの逸脱であり、判別対象種以外のデータサンプルがOODとして検知されることを期待した。

判別後の細胞密度*C*は式1により推定した。実効撮影率*η*にはFlowCamソフトウェアが出力する“Efficiency”を用いた。

$$C = \frac{N_{acc}}{V \times \eta \times \alpha} \quad (式1)$$

ここで、*N<sub>acc</sub>*は対象種と判別された粒子数、*V*は処理試料体積(mL)、*η*は実効撮影率、*α*は撮影時の視野端での見切れなどに起因する機器差を吸収する補正係数である。本研究では*η* = 0.356、*α* = 0.760とし、密度の単位はcells/mLとした。なお、*α*は検鏡検査で得た細胞密度とFlowCamから算出した細胞密度との対応関係を事前検証にて解析し、その結果に基づいて算出した。

#### 2.1.2 形態指標方式

形態指標方式の特徴量として、FlowCam専用解析ソフトウェアVisualSpreadsheetが算出する多数の形態指標のうち、分布、相関、および多重共線性を確認する探索的データ解析により選抜した有効指標群を用いた(表1)。これらの指標群はサイズ、形状、テクスチャなどの情報を要約しており、ノイズを抑えつつ判別に有効な情報を集約する。指標間のスケール差による影響を除くため、学習に先立ち標準化を施した。

モデルには、負例データを用いずに学習が可能であるOne-Class SVM<sup>(4)</sup>(RBFカーネル)を採用した。正例である*C. wailesii*のデータから「この種らしい特徴の範囲(正常域)」を学習し、その範囲から外れたサンプルを非対象として扱う枠組みである。RBFカーネルを用いることで、線形では表現しにくい境界にも対応可能である。

ハイパーパラメータはベイズ最適化により決定した<sup>(5)</sup>。具体的には、外れ値の許容度と境界のきめ細かさを調整する2種類の主要パラメータ*ν*と*γ*について、検証データにおけるF1スコアの最適化を目的として探索した。

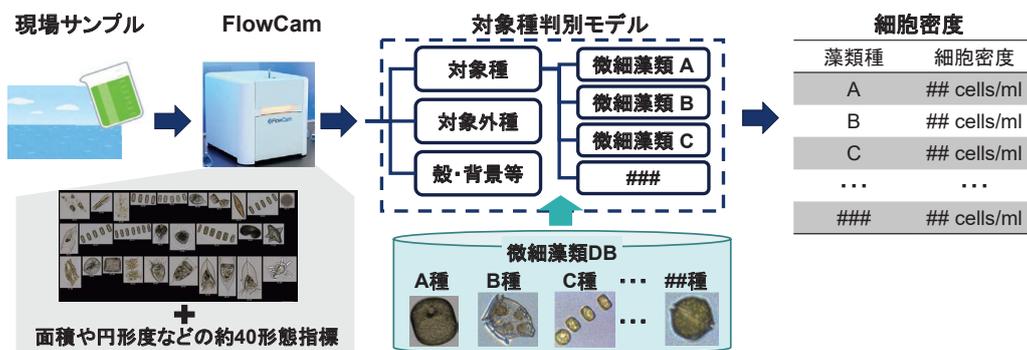


図2 システム概要

本検証の対象種は *C. wailesii* の一種のみであるため、One-Class SVM により完結させた。複数種を対象とする場合には、本方式を前段の外れ検出と対象候補抽出に用い、その後段に多クラス分類モデルを接続する二段構成へ拡張することで、対象種識別に対応可能である。

表 1 形態指標方式にて利用した指標群

指標銘	簡易説明
Aspect Ratio	粒子を楕円と仮定した際の短軸と長軸の比率 1 に近いほど真円に近い
Compactness	粒子の複雑さを表す。値が大きいほど複雑
Geodesic Length	粒子を長方形と仮定したときの長辺の長さ
Geodesic Thickness	粒子を長方形と仮定したときの短辺の長さ

### 2.1.3 深層学習方式

本方式は、粒子ごとにクロッピングされた画像から多層ニューラルネットワークを通して高次特徴を抽出し、形態指標では捉えにくい局所形状や複雑なテクスチャを取り込むことで、対象種の近縁種や未知粒子（非対象種）混入時の判別頑健性を高めることを目的とした。ベースモデルには、計算速度と認識精度のバランスを考慮して EfficientNet-V2-Small<sup>(6)</sup> を採用した。前処理として、FlowCam 画像の特性に合わせたリサイズ、バディング、回転、コントラスト・明度変調などの画像拡張を適用した。

学習は二段構成とした。まず Simple Framework for Contrastive Learning of Visual Representations (SimCLR)<sup>(7)</sup> に準じた自己教師あり学習により、対象に依存しない良質な初期表現を獲得した。続いて Supervised Contrastive Learning (SupCon)<sup>(8)</sup> に類する手法により、クラス内凝集とクラス間分離の強化、および対象種分類の学習を並行して進めた。これにより、近縁種などの類似粒子画像との境界が明確化され、安定した分離が可能な特徴空間が得られた。主たるハイパーパラメータ（エポック数、学習率、バッチサイズなど）はグリッドサーチ（設定したハイパーパラメータの候補を全組み合わせ試す手法）で選定した。

OOD データの検知には、SupCon で学習したエンコーダによる特徴の「近さ」を用いる kNN-based OOD detection (kNN-OOD)<sup>(9)</sup> を採用した。ここでのエンコーダ  $f_\theta$  は、分類ヘッド（最終の全結合層やソフトマックスなど）を除いた特徴抽出部を指す。粒子画像  $x$  を特徴量  $z = f_\theta(x) \in \mathbb{R}^d$  に写像し、訓練特徴集合  $Z_{train}$  に対するユークリッド距離にもとづく  $k$  近傍集合  $N_k(z)$  を求めた。OOD スコア  $s(x)$  は近傍距離の平均で定義した：

$$s(x) = \frac{1}{k} \sum_{z_i \in N_k(z)} \|z - z_i\|_2$$

検証データにおけるスコア分布  $\{s(x_j^{val})\}$  の 95 パーセントイルに係数  $\alpha$  を掛けて閾値  $\tau$  を設定し（本研究では  $\alpha = 1.2$ ）、以下の規則で OOD を判定した。

$$\tau = \alpha \cdot P_{95}(\{s(x_j^{val})\})$$

$$Decision(x) = \begin{cases} in\ distribution & if\ s(x) \leq \tau \\ out\ of\ distribution & if\ s(x) > \tau \end{cases}$$

本研究では、 $k = 3$  とし、全訓練データを対象に近傍を探索した。以上により、分類器の確率出力に依存せず、「学習データの分布からの近さ」に基づく OOD 検知機構を実現し、未知粒子混入時の誤判別を抑制した。

## 2.2 評価方法

### 2.2.1 データセット

正確な教師データを利用するために、単離培養したサンプルを用いてモデルを構築し、現場海水サンプルを用いて評価を行った（表 2、図 3）。培養は 2 回行い、それぞれ  $N = 3$ （サンプル数）で 15 日間以上培養し、2～3 日ごとに FlowCam を用いてデータを取得した。1 回目と 2 回目の培養サンプルで細胞サイズが大きく異なるのは、継代培養および予備培養の期間が異なる *C. wailesii* を用いたためである。海洋サンプルは、2024 年 9～10 月に兵庫県の播磨灘の 30 地点で取得した。播磨灘で採取したサンプルは、培養サンプルよりも面積が小さい傾向であった。ラベリングは顕微鏡検査実施者または当該実施者の指導を受けた者が担当した。さらにモデルのロバスト性を評価するために兵庫県但馬沖で採取した海洋サンプルを追加取得して評価した。

深層学習モデルでは、対照クラスを設けることで特徴空間を安定に構築できる。そのため本研究では、*C. wailesii* に加え、形態的に大きく異なる *Anabaena* や *Karenia* などの微細藻類数種を学習データに追加した。なお、評価対象は *C. wailesii* の分類精度のみとした。

表 2 各データセットの画像数

	培養 1 回目	培養 2 回目	播磨灘	但馬沖
<i>C. wailesii</i>	2147	4178	582	5
<i>C. wailesii</i> の一部	30	141	—	—
<i>C. wailesii</i> の殻	338	2372	—	—
<i>C. wailesii</i> の近縁種	—	—	193	—
その他（微細藻類、デブリ等）	4528	18176	58247	20245

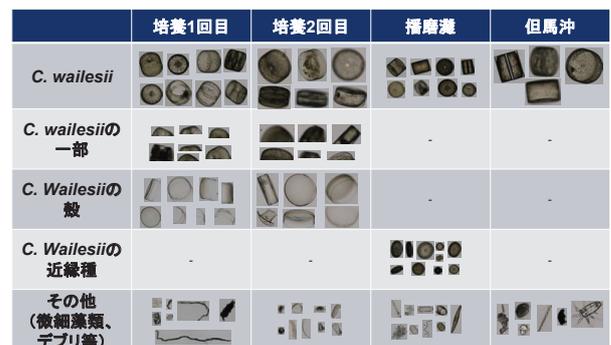


図 3 各データセットの画像例

2.2.2 評価系

播磨灘の 30 地点において海水サンプルを採取し、細胞密度に応じて 10~200 mL の原水を濃縮した後に FlowCam により撮像を行った。細胞密度は (式 1) を用いて推定し、同様の手法で但馬沖のサンプルについても評価した。

分類精度の評価には、一般的に用いられる指標である Precision (適合率), Recall (再現率), および F1 スコア (Precision と Recall の調和平均) を採用した。さらに、細胞密度推定の精度を検証するため、現行の顕微鏡観察による細胞密度算出法を基準として比較した。その際、推定値と基準値の一致度を評価するために決定係数 ( $R^2$ ) を、誤差の大きさを評価するために平均絶対誤差 (MAE) を算出した。これらの回帰問題における代表的な評価指標を用いて本手法と現行手法との差異を定量的に評価した。

2.3 結果と考察

2.3.1 モデル方式の比較

形態指標方式の F1 スコアは 84.1% であった (表 3)。対象外種の粒子画像が *C. wailesii* 画像の 100 倍程度存在するが、対象外種の誤分類は 0.25% 程度に抑えられており、Precision の大きな低下を防ぐことができている (表 4)。誤分類例は、訓練データに含まれていないほど色素の濃い *C. wailesii*, 類似近縁種, 殻・死骸などであり、専門家でも判別が難しい事例も含まれていた (図 4)。

深層学習方式の F1 スコアは 93.0% であった (表 3)。対象外種の誤分類は 0.05% 程度まで抑えられおり、形態指標方式よりも Precision が 15% 程度, F1 スコアが 10% 程度高くなっていた (表 5)。これは、SimCLR/SupCon による OOD 検知に適した特徴空間の形成と、kNN-OOD による OOD 検知により OOD 境界近傍での誤判別を抑制できたためと考えられる。

本検証において、訓練に用いた培養データと評価に用いた播磨灘データでは、*C. wailesii* のサイズが大きく異なっており、細胞の形態も明らかに異なっていた。それにも関わらず両方式で実用に足る高い精度が達成できたことから、両手法とも *C. wailesii* の本質的な特徴をモデル化できていると考えられる。

顕微鏡計数から求めた細胞密度の実測値に対し、両方式で求めた推測値のどちらも高い予測精度 ( $R^2$  値 0.9 以上) と低誤差 (MAE=1.5 程度) を示した (図 5)。すなわち、*C. wailesii* のように形態が際立つ種であれば、形態指標方式のみでも実用精度に達し得ると考えられる。一方で、複雑な模様や微細構造、および局所特徴に依存する種やタスクでは、深層学習方式の優位性が高まることが予想される。したがって、求める精度、対象種の性質、算出速度や計算資源の制約に応じて両方式を使い分けることが重要であろう。

表 3 両手法の各種精度

	Precision	Recall	F1 スコア
形態指標方式	79.1%	89.9%	84.1%
深層学習方式	94.3%	91.8%	93.0%

表 4 形態指標方式の混合行列

		予測	
		<i>C. wailesii</i>	not <i>C. wailesii</i>
実際	<i>C. wailesii</i>	523	59
	not <i>C. wailesii</i>	138	58302
	内訳		
	Similar species	25	168
	その他	113	58134

表 5 深層学習方式の混合行列

		予測	
		<i>C. wailesii</i>	not <i>C. wailesii</i>
実際	<i>C. wailesii</i>	534	48
	not <i>C. wailesii</i>	32	58408
	内訳		
	Similar species	21	172
	その他	11	58236



図 4 両方式での誤予測画像の代表例

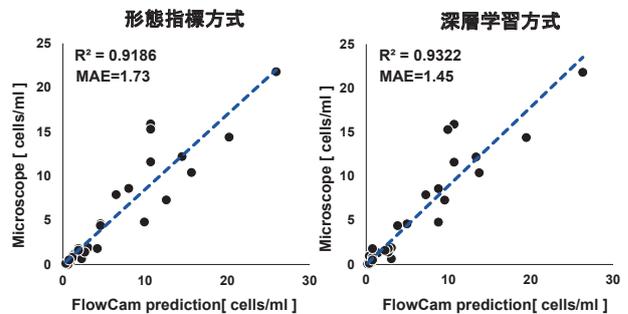


図 5 両方式での細胞密度の実測値と予測値 (30 地点)

### 2.3.2 但馬沖サンプルによる深層学習方式の堅牢性検証

但馬沖で採取した *C. wailesii* を含むサンプルを用いて、2方式のうち精度が優れていた深層学習方式の精度を検証し、堅牢性を評価した。その結果、全粒子中1粒子のみを除いて正しく判別された(表6, 図6)。誤判定例は、類縁種が *C. wailesii* と判別されたもので、専門家であっても見分けが難しい画像であった。この結果から、本方式は、モデル構築に利用したデータと異なる海域のサンプルに対しても分類可能であり、堅牢であることが示された。

表6 但馬沖データの混合行列

		予測	
		<i>C. wailesii</i>	not <i>C. wailesii</i>
実際	<i>C. wailesii</i>	5	0
	not <i>C. wailesii</i>	1	20244



図6 但馬沖データでの *C. wailesii* 誤予測画像

### 2.3.3 深層学習方式における OOD スコアの可視化と運用

深層学習方式の OOD は、モデルの埋め込み空間における  $k$  近傍平均距離に基づいた OOD スコアにより検出する。SupCon により、クラス内は近く、クラス間は遠く配置されるよう埋め込み空間を学習しているため、OOD スコアは既知クラスからの「離れ具合」を定量化している。実際に *C. wailesii* と推定された画像群の OOD スコア分布を観察すると、スコア上昇に伴って対象外種画像比率が増加し、設定した閾値前後で傾向が急峻に変化することが確認された(図7, 図8)。また、閾値近傍の事例には類似近縁種が多く含まれることから、運用上は閾値付近のデータのみ人手で精査するフローを適用することにより、対象外種の誤分類を抑え、高精度、安定性および透明性が達成できると考えられる。さらに閾値付近の事例についての人による判別結果を蓄積して再学習することで、モデルの継続的改善も可能となる。

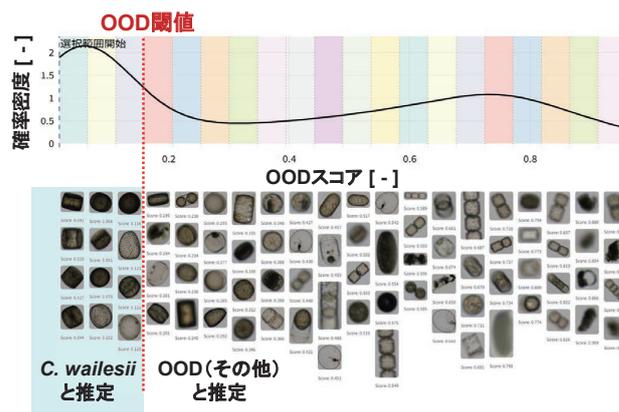


図7 各 OOD スコアでの画像例

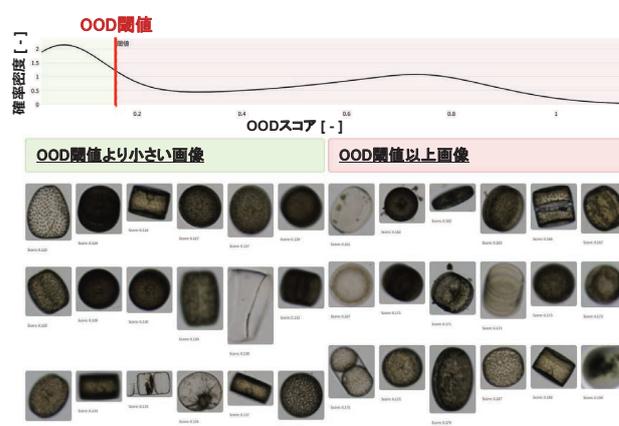


図8 OOD 閾値前後の画像

### 2.3.4 考察

本研究は、FlowCam を用いた微細藻類の特定種の判別手法として、形態指標方式と深層学習方式を開発・評価した。深層学習方式の方が高精度であったが、両手法とも実用に足る精度を示した。各手法には精度面や計算量面などでそれぞれのメリットがあるため、現場の要件に応じて両手法を相補的に運用することが有効である。計算資源や導入容易性が制約となる局面では形態指標方式が有力であり、近縁種が多発する環境、季節や海域による分布変動および未知混入が頻発する局面では深層学習方式が優位となる。加えて、深層学習方式は、OOD スコアを用いた部分的な人手介入によりきわめて高い精度と継続的なモデル改善を同時に実現できる。今後、多種同時判別や群体種への拡張が求められる局面では、深層学習方式の優位性がより明瞭になると考えられる。

### 3. おわりに

本研究では、フローイメージング顕微鏡 FlowCam を用いた微細藻類種の自動判別および計数技術を開発し、従来の熟練技術者による顕微鏡観察に基づいた手法に比べて高速かつ高精度な藻類モニタリングを実現する可能性を示した。今後は、本技術を他の複数種に適用した場合の精度や

堅牢性の検証, 連鎖した種の細胞判別, および計数技術の開発に取り組んでいく予定である。

## 謝辞

本研究は兵庫県立農林水産技術総合センター水産技術センターと共同で実施したものです。ご協力いただいた皆様に感謝申し上げます。

## 参考文献

- (1) 国土交通省, ダム貯水池水質改善の手引き, 2018
- (2) 木幡邦男, “環境問題基礎知識: 赤潮”, 国立環境研究所ニュース, Vol. 23, No. 4, 2004, p. 8-9
- (3) 日本水道協会, 上水試験方法 2011 年版 VI. 生物編, 2011
- (4) B. Schölkopf, R. C. Williamson, et al., “Support Vector Method for Novelty Detection,” Proc. Advances in Neural Information Processing Systems (NeurIPS), Vol. 12, 2000, pp. 582-588
- (5) J. Snoek, H. Larochelle, et al., “Practical Bayesian optimization of machine learning algorithms,” Proc. Advances in Neural Information Processing Systems (NeurIPS), Vol. 25, 2012, pp. 2951-2959

- (6) M. Tan, Q. V. Le, “EfficientNetV2: Smaller Models and Faster Training,” Proc. 38th Int. Conf. Machine Learning (ICML), Vol. 139, pp. 10096-10106
- (7) T. Chen, S. Kornblith, et al., “A Simple Framework for Contrastive Learning of Visual Representations,” Proc. 37th Int. Conf. Machine Learning (ICML), Vol. 119, 2020, pp. 1597-1607
- (8) P. Khosla, P. Teterwak, et al., “Supervised Contrastive Learning,” Proc. Advances in Neural Information Processing Systems (NeurIPS), Vol. 33, 2020, pp. 18661-18673
- (9) Y. Sun, Y. Ming, et al., “Out-of-Distribution Detection with Deep Nearest Neighbors,” Proc. 39th Int. Conf. Machine Learning (ICML), Vol. 162, 2022, pp. 20827-20840

\* FlowCam は横河電機の登録商標です。

\* その他, 本文中で使用されている会社名, 団体名, 商品名, サービス名およびロゴ等は, 横河電機株式会社, 各社または各団体の登録商標または商標です。