

画像処理による目視計測の自動化（第2報）

5 牛の精子数の目視測定スキルのデジタル化

藤本直也、伊藤幸一、日高健雅*、佐藤伸哉*、森政賢二*

Digitization of visual measurement skills of cow sperm counts

FUJIMOTO Naoya, ITOH Koichi, HIDAKA Takemasa, SATOU Shinya and MORIMASA Kenji

Artificial insemination is a technique in which semen from male livestock is cryopreserved and artificially injected into the uterus to cause pregnancy. Because it is possible to breed a large number of excellent male animals to a large number of female animals and reduce the cost of raising male animals, artificial insemination is generally used in the breeding of domestic animals today. Semen used for artificial insemination is often shipped as a product after adjusting its concentration by visual counting. In this study, we developed analysis software to automatically count sperm counts from photographed images of sire sperm.

キーワード：画像処理、デジタル化、人工授精

1 結 言

人工授精技術¹⁾は、種雄牛（精液を採取するための雄畜）の精液を凍結保存後、人工的に子宮内に注入して妊娠させる技術である。優秀な種雄牛を多くの繁殖雌牛（子牛を出産させる雌畜）に交配することが可能となり、種雄牛の飼育に要する費用を削減できるため、現在家畜の交配は一般的に人工授精で行われている。人工授精に用いる精液は、目視によって精子数をカウントし、所定の濃度となるように調整し、製品として出荷されることが多い。濃度調整のための精子数のカウントは経験と手技が必要であり、誰でもできる作業ではない。そのため、この作業をデジタル化することによって、品質の安定性と作業効率の向上を狙える。

本研究では、撮影した種雄牛の精子の画像から、自動で精子数をカウントする解析ソフトを開発した。

2 作業手順

採取された精液は、一次希釈、二次希釈により目標とする濃度に調整をした後、人工授精に使用される。

精子数カウントは、一次希釈後の精液を更に 100 倍希釈し、計測用セルに注入して行う。縦 1mm×横 1mm×深さ 0.1mm の測定視野 4 箇所が存在する精子数をカウントし、1ml 当たりの濃度を算出する。算出した濃度を元に一次希釈後の精液濃度を評価し、それに合わせて二次希釈で濃度調整を行い目標の濃度とする。

精子数のカウントの作業において、従来は倒立顕微鏡（TMS-F、株式会社ニコン製）を用いて観察しながら手動によるカウントが行われていた。そこで、倒立顕微鏡にデジタルカメラ（D5600、株式会社ニコン製）を設置し、精液の画像を撮影し、解析ソフトによってカウントした。

3 解析ソフト概要

3.1 操作画面・解析手順

デジタルカメラによる撮影は、設置場所の都合により測定視野を二分割し、2枚の画像として撮影した後に1枚の画像に合成する。図1に合成を含めた画像処理の手順を示す。

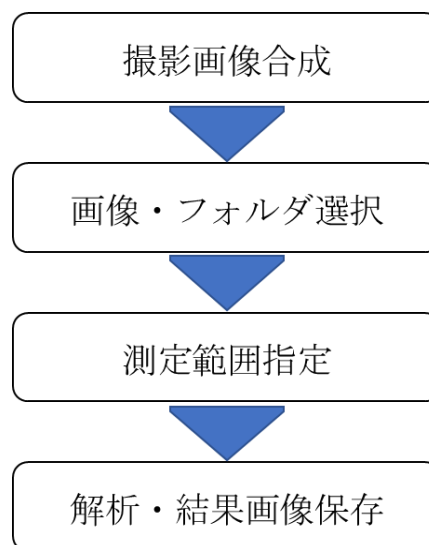


図1 解析手順

*広島県立総合技術研究所畜産技術センター

3.2 撮影画像合成アルゴリズム

開発にはPythonの画像処理ライブラリOpenCVを主に使用した。図2に画像合成の例を示す。一つの測定視野（縦1mm×横1mm×深さ0.1mm）は太線を含む0.25mm間隔に配置された5本の縦線と5本の横線で区切られた4×4マスの区間となっている。一度の撮影で横のマスは全て撮影できるが、縦は2マス若しくは3マス（横線が3本若しくは4本）しか撮影できないため、2枚の画像を重ね合わせる必要がある。

- (1) 画像内の直線をLSD (Line Segment Detector)²⁾のアルゴリズムを用いて検出する。
- (2) サイズや傾きの閾値から枠線ではない可能性が高い直線を除外する。縦線は青線、横線は赤線で示す。
- (3) 横線のy座標をリストに格納し、近い値は同一の直線とみなし、上側の画像と下側の画像に含まれる横線の数を判別し、合成の基準となる上から3本目の横線のy座標を算出する。
- (4) 算出したy座標の差分を用いて上側の画像と下側の画像を重ね合わせる。この際、縦線についても(3)と同様の手順を行い、補正を加える。

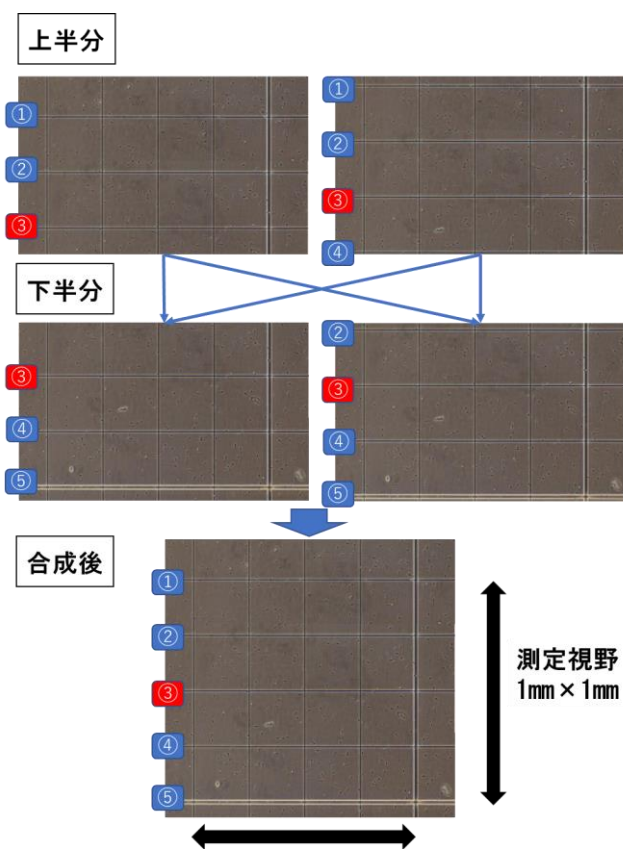


図2 画像合成の例

3.3 精子の検出アルゴリズム

精子の見た目は、通常撮影される黒い精子と、乾燥した場合や光の反射によって出現する白い精子の二種類に分けられる。作業従事者のカウントの実績を基に、それぞれに表1に示す色の閾値を定めOpenCVによって分類した。しかし、測定視野を示す枠及び周辺の反射光が、精子の色合いに近いため、精子の頭部約10μmの形状から大きく外れたものをアスペクト比やサイズの閾値から判断し、ノイズとして除外しても誤検出が生じる。図3に示すように、正常に検出された2,228枚の画像と誤検出された634枚の画像を分類して、機械学習を行った。機械学習によるフィルターをかけることによって、図4に青枠で示すような誤検出は95%以上が除外された。また、手動の測定値と比較した結果を表2に示す。手動測定と比較して約91%の精度での測定が可能となった。枠線に重なっている精子については、背景と色が重なっているため、検出できていない可能性が高く、今後改善の余地がある。

表1 精子の特徴及び検出条件

見た目	黒い精子	白い精子
頻度	多い	少ない
枠色	緑色	ピンク
閾値H(0-179)	72-144	0-50
閾値S(0-255)	0-160	30-150
閾値V(0-255)	0-160	160-255

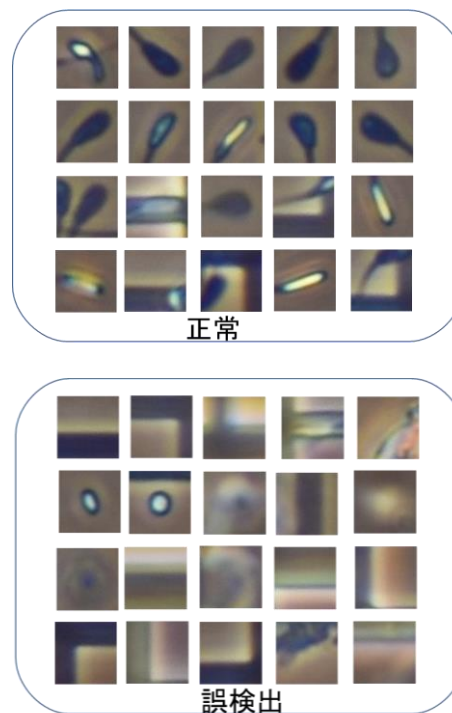
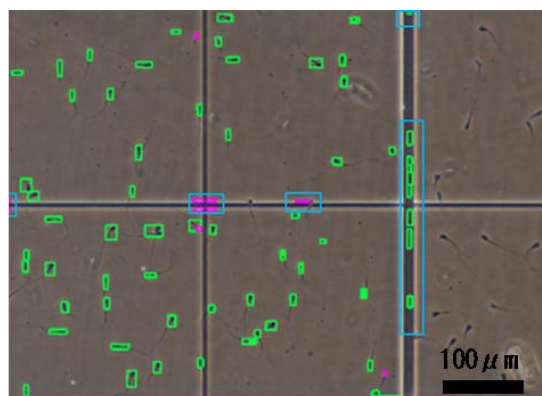


図3 学習用データ



↓ 機械学習適用

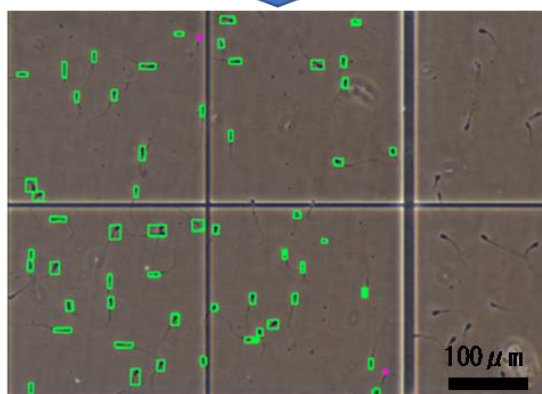


図4 機械学習適用前後の検出結果

表2 手動測定との比較

視野	検出数	手動測定	検出精度	機械学習による除外数
A	211	238	88.7%	84
B	243	264	92.0%	76
C	273	299	91.3%	81
D	223	246	90.7%	78
平均	237.5	261.8	90.7%	79.8

3.4 使用感

コード上ではなく、直感的に画像の参照や測定範囲が指定できるように、図5に示すGUI画面を作成した。撮影した画像の参照元、合成後の画像の保存先、測定結果の保存先を指定すると、画像が一枚ずつ順番に表示される。それぞれの画像について測定範囲をドラッグアンドドロップで指定することで、範囲内の精子を検出しカウントできる。従来の計測では1視野当たり約2分30秒かかっていた計測が、本ソフトの導入によって約30秒でできるようになった。今後運用していく上で、不便に感じる点や要望があれば、現場のニーズに応じて機能を追加する予定である。

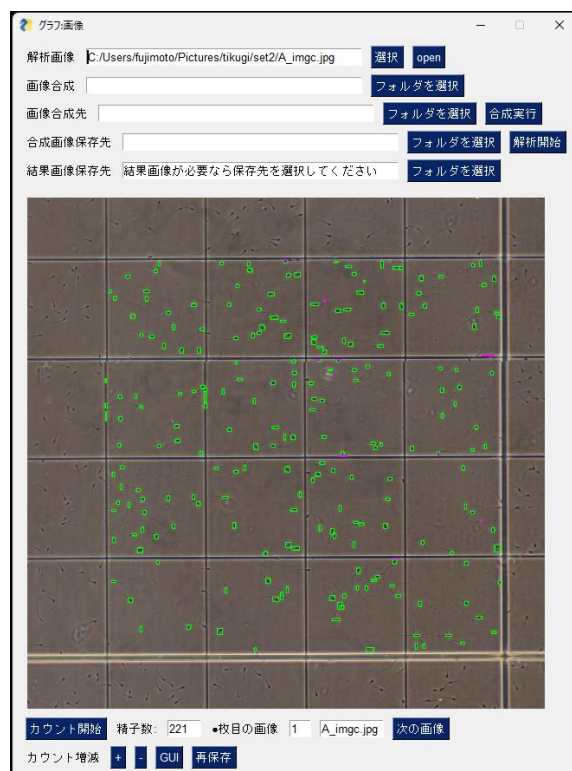


図5 精子数カウントソフトのGUI

4 結 言

牛の人工授精用精液の精子数をカウントする解析ソフトを開発し、下記の成果が得られた。

- (1) 画像処理と機械学習を用いて、手動測定に対して約91%の精度で解析が行うことができた。
- (2) 解析ソフトにより作業時間が約80%削減できた。
- (3) 枠線上に重なっている精子のカウントには課題が残った。

開発を通して得られた知見は花粉の数や金属組織の介在物や粒径測定等、他の分野におけるカウント技術においても適用可能と考える。

文 献

- 1) 社団法人畜産技術協会：牛の人工授精マニュアル，(2004)
- 2) Rafael Grompone von Gioi, LSD: a Line Segment Detector, Image Processing On Line, (2012)