

修士論文

光捕捉下粒子の実時間ブラウン運動解析に向けた
機械学習を用いた粒子位置推定法の開発

野原 有実

2018 年 3 月 15 日

奈良先端科学技術大学院大学
情報科学研究科 情報科学専攻

本論文は奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科に
修士(工学) 授与の要件として提出した修士論文である。

野原 有実

審査委員：

金谷 重彦 教授	(主指導教員)
佐藤 嘉伸 教授	(副指導教員)
MD.ALTAUF-UL-AMIN 准教授	(副指導教員)
小野 直亮 准教授	(副指導教員)
黄 銘 助教	(副指導教員)

光捕捉下の粒子の実時間ブラウン運動解析に向けた 機械学習を用いた粒子位置推定法の開発*

野原 有実

内容梗概

静止した水中を浮遊し、不規則な運動(ブラウン運動)する μm オーダーの微小物体を捕捉し、操作するための有効なツールとして光ピンセット技術がある。光ピンセットは、集光レーザービームを微小物体に照射した時に発生する光の放射圧を利用しているため、顕微鏡下で非接触・非破壊に微小物体を 3 次元的に捕捉・操作することができる。しかしながら、捕捉下の微小物体は完全にブラウン運動が抑制されておらず、わずかに動き続けている。これにより正確なビーム照射が行えず、時折、微小物体の取りこぼしが発生する。より正確な捕捉・操作のためには、捕捉下の微小物体のブラウン運動の様子を 3 次元的に解析し、その運動を抑制するような制御を行う必要がある。そこで本研究では、捕捉対象を球形粒子として、機械学習を用いた光ピンセット捕捉下の実時間でのブラウン運動解析に向けた粒子位置推定法を提案し、16 分割光検出器を用いることを想定した提案手法に最適な機械学習手法の検討を行った。検討実験では、まず、16 分割光検出器から取得できる信号電圧に疑似した信号を顕微鏡画像から作成した。そして、1 つの推定器から粒子位置の 3 次元座標を出力する多出力モデルと 3 次元座標の 1 成分のみを出力する推定器を 3 つ組み合わせて 3 次元座標を得る単出力モデルの 2 種類を構築した。その結果、多出力モデルは単出力モデルよりも精度が低い結果となった。また、面内方向(x,y)に関してはニューラルネットワークとランダムフォレストで構築した 2 つ推定モデルの精度がよく、光軸方向(z)に関してはサポートベクターマシンで構築した推定モデルの精度がよい結果となることを確認した。

キーワード

光ピンセット, ブラウン運動, 3次元位置推定, 機械学習, 16分割光検出器

*奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科情報科学専攻修士論文,
NAIST-ISMT1651087, 2018 年 3月 15日.

Development of a three-dimensional position measurement of a Brownian particle in an optical trap based on machine learning for real-time motion analysis *

Yumi Nohara

Abstract

Optical tweezers are sensitive and effective tools for trapping and manipulating a micro object suspended in water and always moving by Brownian motion. Radiation pressure exerts on a microscopic object when a focused laser beam is irradiated on it. Optical tweezers utilize the radiation pressure and manipulate it three-dimensionally under a microscope without mechanical contact and damage. However, the Brownian motion of the microscopic object under trapping is not restrained completely and continues to move slightly. Thereby, accurate beam irradiation cannot be conducted and a captured object sometimes gets out of the trapping spot. To solve this problem and to improve capture and manipulation accuracy, it is necessary to analyze and control the Brownian motion three-dimensionally in an optical trap. Therefore, in this study, I regard objects to be manipulated as spherical and propose the three-dimensional position measurement method of a Brownian particle in an optical trap based on machine learning. To pick up the most suitable machine learning method for an estimation model by experimental verification, I built up an estimation model using different machine learning methods and compared them. I suppose to use the 16-segmented photodiode in the proposed method; therefore, 16 pseudo signals made from microscopic images of a particle were prepared for a start. Then two estimation models based on three different machine learning methods were constructed. One is the multi-output model that outputs three-dimensional position of a particle. Second is the single-output model that outputs one-dimensional position of a particle sequentially. As a result of the experiment, the estimation accuracy of the multi-output model is lower than that of the single-output model. In addition, I confirmed that Neural Network and Random Forest give the highest

estimation accuracy for the in-plane direction and Support Vector Machine gives that for the optical axis direction.

Keywords:

Optical tweezers, Brownian movement, three-dimensional position estimation, machine learning, 16-segmented photodiode

. *Master's Thesis, Department of Information Systems, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-MT1651087, March 15, 2018.

目次

第1章 序論	1
1.1 研究背景と目的	1
1.2 本論文の構成	1
第2章 光ピンセット技術	3
2.1 放射圧の発生	3
2.2 光ピンセットによる微小物体の捕捉と操作	6
2.3 光ピンセットの光学系	8
2.4 光ピンセット技術とブラウン運動	9
第3章 提案手法	10
3.1 先行研究	10
3.1.1 ホログラムを用いた粒子位置推定法	10
3.1.2 4分割光検出器を用いた粒子位置推定法	13
3.2 提案手法	15
第4章 機械学習手法の検討	17
4.1 機械学習手法	17
4.1.1 ニューラルネットワーク	17
4.1.2 ランダムフォレスト	20
4.1.3 サポートベクターマシン	21
4.2 検討方法	24
第5章 結果	28
5.1 多出力モデル	28
5.1.1 検討結果	28
5.2 単出力モデル	33
5.2.1 検討結果	33
5.3 考察	42
5.3.1 多出力モデルについての考察	42
5.3.2 単出力モデルについての考察	42
第6章 結論	46
謝辞	47

参考文献	48
付録	51

図目次

図 1	誘電体境界面での放射圧発生の様子	5
図 2	粒子への放射圧発生の様子	5
図 3	集光レーザービームにより捕捉される波長より十分に大きい粒子	6
図 4	集光レーザービームにより捕捉される波長より小さい粒子	7
図 5	本研究で用いた光学系	8
図 6	ホログラフィック顕微鏡の原理[11]	12
図 7	得られたホログラムと算出したホログラム[11]	12
図 8	4分割光検出器を含む光トラップ装置	14
図 9	16分割光検出器とその信号電圧の取得順番	15
図 10	ニューロンモデル	19
図 11	階層型ニューラルネットワーク	19
図 12	分類境界とマージン	23
図 13	SV 回帰と残差の関係	23
図 14	対象粒子($r=1\mu\text{m}$)の顕微鏡画像	24
図 15	ピント位置付近の粒子観察像	24
図 16	光軸方向における画像取得の刻み幅	26
図 17	面内方向における画像取得の粒子位置	26
図 18	顕微鏡画像から作成したデータセット	27
図 19	面内方向(x 方向)位置推定(ニューラルネットワーク)	29
図 20	光軸方向(z 方向)位置推定(ニューラルネットワーク)	29
図 21	決定木とエラー率の関係	30
図 22	面内方向(x 方向)位置推定(ランダムフォレスト)	31
図 23	光軸方向(z 方向)位置推定(ランダムフォレスト)	31
図 24	面内方向(x 方向)位置推定(ニューラルネットワーク)	35
図 25	光軸方向(z 方向)位置推定(ニューラルネットワーク)	35
図 26	決定木とエラー率の関係(面内方向)	37
図 27	決定木とエラー率の関係(光軸方向)	37
図 28	面内方向(x 方向)位置推定(ランダムフォレスト)	38
図 29	光軸方向(z 方向)位置推定(ランダムフォレスト)	38

図 30	面内方向(x 方向)位置推定(サポートベクターマシン)	40
図 31	光軸方向(z 方向)位置推定(サポートベクターマシン)	40
図 32	データセット更新後の光軸方向(z 方向)位置推定(サポートベクターマシン)	45

表目次

表 1	ニューラルネットワークの設定パラメータ	28
表 2	グリッドサーチにより設定したランダムフォレストのパラメータ	30
表 3	各学習アルゴリズムにおける各方向の標準偏差	32
表 4	ニューラルネットワークの設定パラメータ(面内方向).....	34
表 5	ニューラルネットワークの設定パラメータ(光軸方向).....	34
表 6	ランダムフォレストの設定パラメータ(面内方向).....	36
表 7	ランダムフォレストの設定パラメータ(光軸方向).....	36
表 8	サポートベクターマシンの設定パラメータ	39
表 9	各学習アルゴリズムにおける各方向の標準偏差	41
表 10	ニューラルネットワークとランダムフォレストの推定向上率	44
表 11	各機械学習手法における推定のために必要な平均時間	44
表 12	データセット更新後の各機械学習手法における推定向上率	44

第1章 序論

1.1 研究背景と目的

μm オーダーの微小物体を捕捉・操作するための有効なツールとして光ピンセット技術がある。光ピンセットは A. Ashkin によって 1986 年に開発された技術であり、顕微鏡にレーザービームを入射して対物レンズで集光することで微小物体の捕捉・操作が実現されることが多い。微小物体に集光レーザービームを照射すると光の放射圧が発生し、集光レーザービームの集光位置であるスポット位置に微小物体を引き込むように力が働くため、微小物体を捕捉することができる。また、集光レーザービームを移動させると微小物体は集光レーザービームに追従するように動くため、捕捉後に 3 次元的に微小物体を移動させることも可能である[1][2]。顕微鏡下で微小物体を非接触かつ非破壊に捕捉・操作可能である光ピンセット技術は、生物学、物理学、化学などの基礎科学分野のみならず、細胞融合、微粒子の配列、接着などの産業分野にも広く応用されている[3]。

一般的に、顕微鏡観察下で光ピンセットを用いて捕捉・操作される対象物は、カバーガラス上に分散している場合と、水中などの媒質中に浮遊している場合がある。前者は比較的容易に捕捉・操作することが可能である。しかし、後者では微小物体を捕捉していても、取りこぼしが発生することがある。その理由は、水中の微小物体はブラウン運動と呼ばれる不規則な運動をしており、捕捉下においても完全にその運動は抑制されているわけではなく、わずかに動き続けているためである。これにより、微小物体に対してビーム照射を正確に行えず、結果として微小物体が集光位置から離れてしまうことがある。より正確な捕捉・操作のためには、捕捉下の微小物体の 3 次元位置を推定することでブラウン運動の様子を 3 次元方向に解析し、その運動を抑制するような制御を行う必要がある。

そこで本研究では、光ピンセットでのより正確な捕捉・操作を目指すことを目的とし、捕捉対象を球形粒子とした機械学習を用いた光ピンセットトラップ下の実時間でのブラウン運動解析に向けた粒子位置推定法を提案する。機械学習とは、既知データを学習することにより未知データの性質を予測する技術のことである[4]。学習モデルを構築する機械学習手法を検討するために粒子の様々な 3 次元位置の疑似信号を基に粒子位置推定法を構築し、比較を行った。

1.2 本論文の構成

第 2 章では光ピンセット技術に用いられる放射圧の発生とその原理を述べ、光ピンセ

ットによる捕捉・操作、光ピンセットを構成している光学系を述べた後、ブラウン運動が原因の光ピンセット技術で微小物体を扱う際の技術的問題点を述べる。第 3 章では提案する機械学習と 16 分割光検出器を用いた粒子位置推定法と粒子位置推定法の先行研究について述べる。第 4 章では第 3 章で述べた提案手法に最適な機械学習手法の検討、第 5 章ではその検討結果を示し、考察を行う。最後に第 6 章で結論を述べる。

第2章 光ピンセット技術

この章では、光ピンセット技術の基本的な原理等について説明する。

光ピンセット技術は、1986年に A. Ashkin より開発された技術で、集光レーザービームを微小物体に照射した時に発生する光の放射圧を利用して微小物体を捕捉し、操作している。2.1 章では、放射圧の発生とその原理、2.2 章では、光ピンセットによる微小物体の捕捉と操作、2.3 章では、光ピンセットを構成している光学系、2.4 章では、光ピンセット技術の応用についてそれぞれ記述する。

2.1 放射圧の発生

放射圧とは、光の光子に起因する力である。対象物に光子が入射して、散乱、反射、屈折されることで運動量の変化が起こり、運動量保存則に則り、対象物に運動量が与えられ、その結果発生する力のことである。1884年に Poynting がマクスウェルの電磁気学理論が光のビームの運動量フラックスがその強度に比例しており、照射された物体が移動することを示しているとし、放射圧の存在を示した[4]。また、1901年に Lebedev らは、ミラーに光を照射する実験を行い、ミラーの回転を計測することにより放射圧を検出した[5]。そして 1936年に Beth が光の相互作用の結果としてマクロな物体に働く回転モーメントの実験結果を初めて報告した[6]のち、1970年に A. Ashkin がレーザー光の力が顕微鏡観察下における粒子の動きを変えることを示すことで放射圧の存在を示している[7]。

ここで、光ピンセットの場合、対象物がレーザー光の波長より十分に大きいか、小さいかによって異なった放射圧発生のメカニズムの解釈が存在する。レーザー光の波長 λ に対して、対象物の大きさ r が十分に大きい場合は、幾何光学的解釈を用い、レーザー光の波長 λ に対して、対象物の大きさ r が十分に小さいときは波動光学的解釈が用いられる[2][3][8]。

幾何光学的解釈

光子 1 つあたりの運動量 p は、

$$p = \frac{hk}{2\pi} \quad (2.1)$$

で与えられる。ここで、 h はプランク定数 ($= 6.63 \times 10^{-34} \text{J} \cdot \text{s}$)、 $\mathbf{k}$ は伝搬ベクトルであり、媒質の屈折率 n 、真空中の波数 k_0 、波長 λ を用いると $|\mathbf{k}|$ は $nk_0 (= 2\pi n/\lambda)$ である。

またパワー $I[\text{W}]$ の光束がもつ単位時間当たりの運動量は、真空中の光速 c を用いて表すと、

$$\mathbf{p} = n \frac{I}{c} \quad (2.2)$$

で与えられる。運動量の方向は光の進行方向に一致している。図 1 は 1 本の光線が屈折率の異なる誘電体との境界面に入射した場合を図示している。光は入射すると境界面にて反射し屈折する。屈折率 n_1 が屈折率 n_2 よりも低いとき、誘電体との境界面には図 1 のように放射圧が発生する。発生する放射圧は境界面を低屈折率側へ引くような方向に働き、境界面で運動量が保存されるように作用する。また、媒質が光を吸収しないとき、放射圧は常に境界面に対して垂直に働く。

また、図 2 は 1 本の光線が粒子に入射した場合を図示している。図 2 に示すように、光線が入射し射出すると運動量の方向ベクトルが変化する。運動量保存則により入射時と射出時の差分 $\Delta \mathbf{p} (= \mathbf{p}' - \mathbf{p} = -\mathbf{F})$ が放射圧となる。

通常、光ピンセットで用いられる光の波長は、熱発生を抑えるために周囲の媒質にも捕捉・操作対象物体にも吸収がないものを用いる。そのために、吸収による現象は無視することができ、反射と屈折によって発生する現象のみで説明することができる。

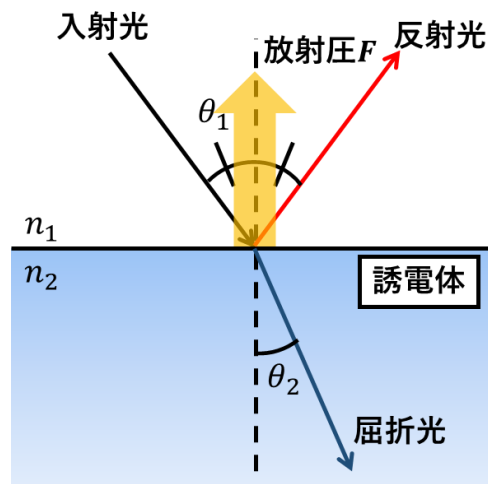


図 1 誘電体境界面での放射圧発生の様子

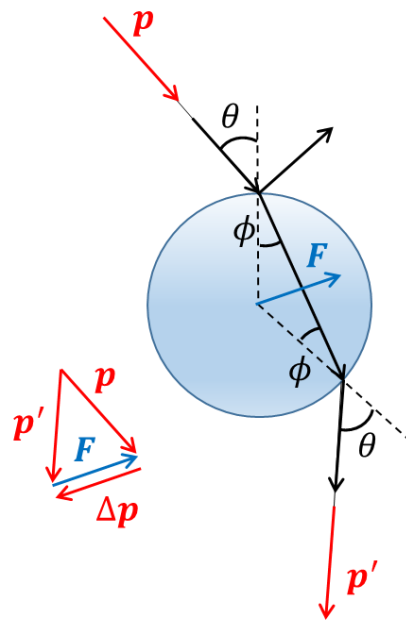


図 2 粒子への放射圧発生の様子

波動光学的解釈

光の波長より十分に小さいサイズの物体での光散乱現象は Rayleigh の光散乱理論に則り、1 個の電気双極子として近似することができ、周囲の電場から受ける力は Lorentz 力として得られる。Lorentz 力は対象物体と媒質の比誘電率に依存し、光強度勾配に沿った方向に働く勾配力と、光の進行方向に働く散乱力の 2 つの成分からなる。この Lorentz 力が放射圧となり、物体に働く。

2.2 光ピンセットによる微小物体の捕捉と操作

2.1 節では、幾何光学的解釈と波動光学的解釈、それぞれの解釈での放射圧の発生とその原理について述べた。この節では、微小物体に集光レーザービームが入射した際に発生する放射圧による微小物体の捕捉と操作について述べる。

幾何光学的解釈

図 3 には、波長よりも十分大きい誘電体である粒子に集光レーザービームが入射し、捕捉される様子を示している。図には集光レーザービームのうち、運動量 p_1 を持つ光線と、運動量 p_2 を持つ光線の 2 本の光線を示している。粒子に光線が入射し、屈折して射出すると、光線の運動量は p_1' と p_2' に変化する。入射時の運動量と射出時の運動量の差分が放射圧 F_1 、 F_2 となり、これら放射圧の合力 F が粒子に働く。このように足しあわされた放射圧と重力と浮力が釣り合うところで粒子は捕捉されることになり、粒子には集光点に引き寄せるような力が生じる [8]。

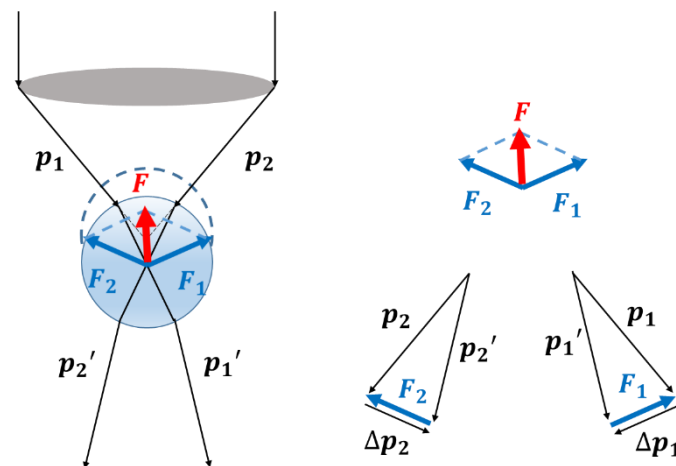


図 3 集光レーザービームにより捕捉される波長より十分に大きい粒子

波動光学的解釈

図 4 には、波長よりも十分に小さい粒子を捕捉する様子を示している。図 4 に示すように、勾配力と散乱力のバランスで捕捉されるかどうかが決まり、勾配力が散乱力より強く働き、集光レーザービームの光強度の強い部分である集光点に引き込まれるように力が働くとき、粒子を捕捉することができる。勾配力を散乱力よりも大きくするのは、レンズを用いて十分に大きい角度から集光させることで実現可能である[8]。

また、金属粒子の場合は、表面で光が反射するので通常粒子を押すような力が発生する。金属粒子の大きさが波長に比べて同程度、あるいは大きい場合、放射圧は常に粒子を集光レーザービームの進行方向に押すように働くため、粒子を捕捉することができない。しかし、粒子が波長よりも十分に小さい場合は金属粒子も捕捉することは可能である[3]。

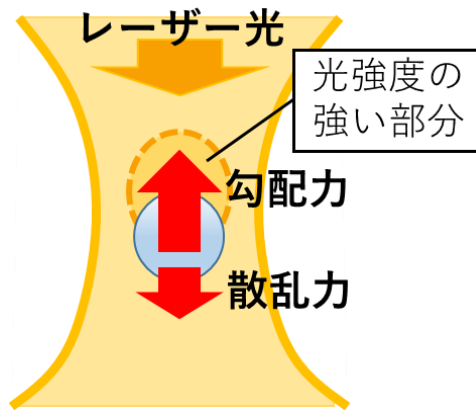


図 4 集光レーザービームにより捕捉される波長より小さい粒子

2.3 光ピンセットの光学系

本研究で用いた光ピンセットの光学系を図 5 に示す。光ピンセット用のレーザー光源である Nd:YAG レーザー(波長 $\lambda=1064\text{nm}$ 、出力最大 2W)から射出されたレーザービームはビームエキスパンダーによって拡大された後、音響光学素子(acousto-optic modulator, AOM)を通過し、2 枚のガルバノミラーで反射されてレンズによって集光される。そして、倒立型顕微鏡に入射した後、内部レンズに平行にされた後、ダイクロイックミラーで反射され、対物レンズで集光され対象物の捕捉に用いる。

また、サンプル中の対象物を捕捉し操作する様子は、同じ倒立型顕微鏡を通して拡大し、CCD カメラ上に結像して観察できる。この際、光ピンセット用のレーザー光はダイクロイックミラーで反射しており、さらにそこを通過した成分もカットフィルターでカットされるので、CCD カメラ上では光ピンセット用のレーザー光の影響を受けずに対象物を観察できる。

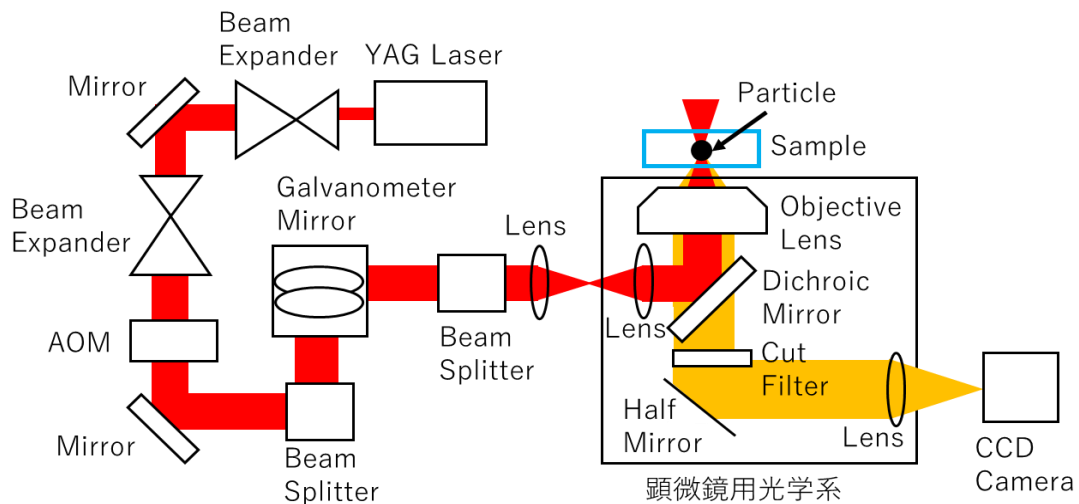


図 5 本研究で用いた光学系

2.4 光ピンセット技術とブラウン運動

顕微鏡観察下で光ピンセットを用いて捕捉・操作される微小物体が水中にある場合、その物体はブラウン運動をしている。ブラウン運動とは、微小物体が静止した水中に浮遊する際に顕微鏡で観測できる不規則な運動のことである[10]。水中では微小粒子は 3 次元的に自由自在にブラウン運動する。光ピンセット技術は、生物学、物理学、化学などの基礎科学分野のみならず産業分野にも広く応用されているが、そのような応用分野では捕捉・操作対象となる微小粒子は水中に存在する 경우가主であり、ブラウン運動の影響により粒径がレーザー波長程度でなければ安定して捕捉・操作することができない[3]。すなわち、粒径が小さくなるとブラウン運動による変位が大きくなり、粒子の捕捉・操作は不安定になる。加えて、粒子に作用する放射圧自体も小さくなることが報告されている[9]。捕捉下の粒子がブラウン運動により揺らぐと、粒子に対してレーザービーム照射が正確に行うことができず、結果として取りこぼしてしまうことが光ピンセット技術的な問題点として存在する。そこで本研究では、この技術的な問題点であるブラウン運動による取りこぼし等を抑制し、正確な光ピンセットでの捕捉・操作を目指すことを目的としている。

第3章 提案手法

2 章では、光ピンセットの基本的な原理や応用、光ピンセット技術におけるブラウン運動が原因で起こる技術的課題点について述べた。本研究では光ピンセット捕捉下の粒子の実時間ブラウン運動解析に向けた粒子の3次元位置推定法を開発した。3.1 節では、顕微鏡下粒子の3次元位置推定法における先行研究を紹介し、3.2 節では、提案する16分割光検出器を用いた粒子位置推定法について述べる。

3.1 先行研究

顕微鏡下粒子の3次元位置推定には、粒子のホログラムに符号化された3次元位置情報を推定する方法や、4分割光検出器によって得られた信号から推定する方法がある。これら2つの方法について、紹介する。

3.1.1 ホログラムを用いた粒子位置推定法

S. H. Lee らは、デジタルホログラフィック顕微鏡を用いて取得したホログラムを用いて Lorenz-Mie 散乱理論に基づいて粒子の特性を明らかにし、追跡を行った[11]。ここで、ホログラフィーとは物体からの光(scattered beam)と参照光(incident beam)が作る干渉縞強度分布を記録する技術であり、記録した媒体のことをホログラムと呼ぶ(図 6)。ホログラムには、個々の物体の3次元位置、サイズ、光学的特性等が符号化されている[12]。また、Lorenz-Mie 散乱とは粒子と光の波長が同程度の場合(波長の10分の1以上)の散乱のことを指している[13]。散乱とは、光の波が障害物の背後に回り込んでいく回折や、干渉を伴った現象であり、散乱の様子は光が当たる物体の大きさや光の波長によって変わる。粒子の大きさが10分の1以下であるとき Rayleigh 散乱と呼び、波長より粒子が十分に大きいときは幾何学的散乱と呼ぶ。

ここで、Lorenz-Mie 散乱理論を用いて光強度をモデル化し、粒子の特性を推定するために、適合させるホログラムを算出する過程を述べる[12]。レーザービームが入射する焦点面内位置 $\mathbf{r}(= (x, y))$ における電界は、

$$\mathbf{E}_0(\mathbf{r}) = u_0(\mathbf{r})e^{i\varphi_0(\mathbf{r})}e^{ikz}\hat{x} \quad (3.1)$$

で与えられる。ここで、 k は媒質の波数、 $u_0(\mathbf{r})$ はビームの振幅、 $\varphi(\mathbf{r})$ は位相プロファイル、 z は焦点の光軸方向位置である。焦点面において位置 $\mathbf{r}_p(= (x_p, y_p))$ における粒子が散乱さ

せるビームの電界は、Lorenz-Mie 散乱理論における光の散乱を表す項を用いて

$$\mathbf{E}_s(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_0(\mathbf{r}_p) \mathbf{f}_s(k(\mathbf{r} - \mathbf{r}_p)|a_p, n_p) \quad (3.2)$$

で与えられる。 $\mathbf{f}_s(k\mathbf{r}|a_p, n_p)$ は半径が a_p であり、屈折率が n_p である粒子が $\hat{x}$ 偏光した平面波を持つ光を散乱する様子を表す Lorenz-Mie 散乱理論に基づいた項である。式(3.1)と式(3.2)を用いてモデル化した光強度は、

$$I(\mathbf{r}) = |\mathbf{E}_0(\mathbf{r}) + \mathbf{E}_s(\mathbf{r})|^2 \quad (3.3)$$

で与えられ、 $I_0(\mathbf{r}) = |\mathbf{E}_0(\mathbf{r})|^2 = u_0^2(\mathbf{r})$ を用いて正規化を行うと、モデル化した光強度は最終的に

$$b(\mathbf{r}) = \frac{I(\mathbf{r})}{I_0(\mathbf{r})} \approx |\hat{x} + e^{-ikz_p} \mathbf{f}_s(k(\mathbf{r} - \mathbf{r}_p)|a_p, n_p)|^2 \quad (3.4)$$

で与えられる。

S. H. Lee らは取得したホログラムに対し、Lorenz-Mie 散乱理論から算出したホログラムをピクセルごとに適合させることで、符号化されている情報の推定を行っている(図7) [11]。最新のビデオホログラフィック顕微鏡を用いると、粒子位置を特定するのはもちろんのこと、半径を数 nm の分解能で分析可能であり、屈折率を 1000 分の 1 の範囲内で決定可能であることが明らかにされている[14][15][16]が、各ホログラムに対しピクセルごとに適合させながらこれらを推定していくため、計算する上で大変な負荷となっている。そこで、A. Yevick らは処理時間を短縮させ、リアルタイム性能を持つ機械学習を用いた推定法を提案している[12]。教師データには式(3.4)を用いて作成したホログラムを使用している。機械学習手法にはサポートベクターマシンを用いており、従来手法に比べ推定の精度は落ちるが、処理時間は 1000 分の 1 となることを示しており、機械学習法が粒子の位置推定を高速にすることを実証している。しかし、本手法を本研究に応用するのは難しいと考えられる。なぜなら、教師データとなるホログラムは、単純化された Lorenz-Mie 散乱理論を用いた式から算出されており、本研究で用いる光ピンセットを構成する光学系を記述する理論として用いるのは適さないためである。

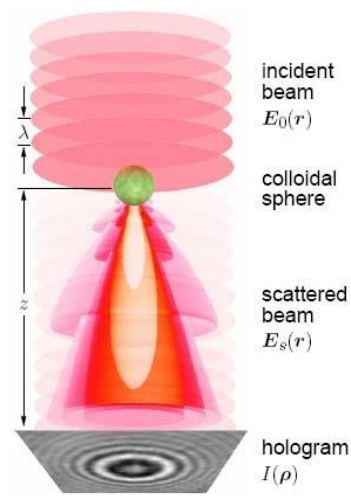


図 6 ホログラフィック顕微鏡の原理[11]

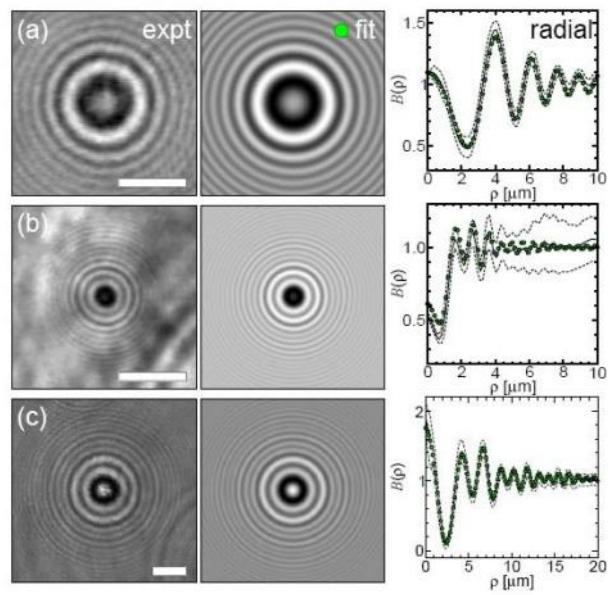


図 7 得られたホログラムと算出したホログラム[11]

3.1.2 4分割光検出器を用いた粒子位置推定法

F. Gittes らは、後焦点面(Back-focal-Plane)におけるレーザービームと粒子によって散乱したレーザービームの干渉パターンを 4 分割光検出器(Quadrant photodiode)で検出し、その信号を用いて粒子の横方向のみの 1 次元位置測定を行った。後焦点面とは集束レンズ(Condenser lens)を挟んで物体と反対側にある焦点面のことである。また、4 分割光検出器とは 4 つのセンサー素子が並んでいるデバイスのことである[17]。その後、A. Pralle らは、4 分割光検出器を用いて粒子の軸方向の位置測定も含めた 3 次元位置測定を光トラップ下粒子に対して行った[18]。また、図 8 には、4 分割光検出器を含む光トラップ装置を図示している。レーザースポットが 4 分割光検出器を照らすと、それぞれのセンサー素子は受け取った光強度に比例したアナログ信号電圧を出力する。図 8 においてセンサー素子 1 が出力する信号電圧を V_1 、センサー素子 2 が出力する信号電圧を V_2 、センサー素子 3 が出力する信号電圧を V_3 、センサー素子 4 が出力する信号電圧 V_4 とし、信号電圧の合計を V_0 とすると、面内方向である x 、 y 方向と光軸方向である z 方向の信号電圧値 S_x 、 S_y 、 S_z は、

$$S_x = ((V_2 + V_4) - (V_1 + V_3))/V_0 \quad (3.5)$$

$$S_y = ((V_1 + V_2) - (V_3 + V_4))/V_0 \quad (3.6)$$

$$S_z = (V_1 + V_2 + V_3 + V_4)/V_0 \quad (3.7)$$

で与えられる[19]。これら信号電圧値は粒子位置に比例しており、その比例定数は後焦点面における干渉パターンを算出することで得ることができる。4 分割光検出器は正確性・感受性が特に面内方向位置変動に関して高く、高分解能に推定可能である。また、他デバイスへの適応性も高いため、位置センサーデバイスを用いた位置推定としてよいアプローチであるとされている。[20]

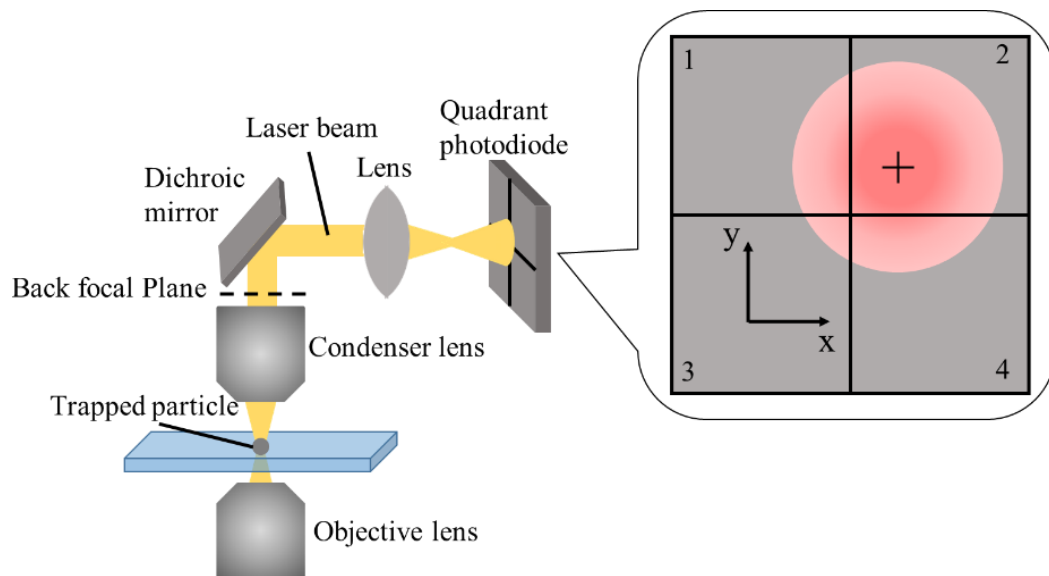


図 8 4 分割光検出器を含む光トラップ装置

3.2 提案手法

3.1 節では、顕微鏡観察下における粒子の 3 次元位置推定法の先行研究について述べた。本研究では、16 分割光検出器を導入した機械学習を用いた推定法の開発にあたってその検討を行った。以下に提案する粒子位置推定法の構築の流れを述べる。

(1) 16 分割光検出器を光学系に導入し、信号電圧を取得

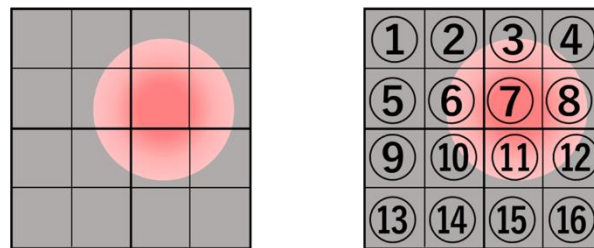
本研究では、光ピンセットの光学系に 16 個の独立したセンサー素子からなる 16 分割光検出器を導入することを検討している。図 9(a)は 16 分割光検出器の模式図である。この 16 分割光検出器で、レーザー光と捕捉下粒子の干渉パターンを検出し、信号電圧を取得する。

(2) 学習用データセットの作成

粒径が既知の粒子について様々な 3 次元位置の信号電圧を取得し、データセットを作成する。信号電圧の取得は図 9(b)の順番で行う。

(3) 推定モデルの作成

機械学習において、予測のために使用される変数を説明変数、予測したい変数を目的変数と呼ぶ[21]。本研究では、16 個の信号電圧を説明変数とし、粒子の 3 次元位置 (x,y,z) が目的変数として、機械学習を用いて粒子位置推定法を構築する。



(a)16分割光検出器 (b) 信号電圧の取得順番

図 9 16 分割光検出器とその信号電圧の取得順番

先行研究と提案手法の差異として、16 分割光検出器から得られた信号電圧を推定に用いることで、4 分割光検出器で得られた信号電圧を推定に用いるよりも、得られる情報量が多くなるため、特に光軸方向(z)に関して高い分解能を得られることが考えられる。16 分割光検出器を用いることで、情報量が多くなる分、粒子位置算出に用いる数式の複雑化が問題になる。そこで、機械学習を用いて推定モデルを構築することで、16 個の要素すべてに関して情報を有効に使用でき、光軸方向位置も含めた高精度な推定が可能になると考えられる。

また、機械学習手法は数種類存在する。そこで、本論では本研究の提案手法における推定モデルを構築する最適な機械学習手法の検討を行ったので、その結果を報告する。

第4章 機械学習手法の検討

3 章では、提案手法に関連した先行研究と提案手法について述べた。4 章では、提案手法に最適な機会学習手法の検討について述べる。4.1 節では、検討した機械学習手法のニューラルネットワーク、ランダムフォレスト、サポートベクターマシンについて述べ、4.2 節では最適な機械学習手法の検討実験について述べる。

4.1 機械学習手法

本研究の推定モデルは回帰モデルを用いている。回帰モデルは、連続値を取る目的変数を予測するために使用されるもので、本研究における目的変数である粒子の 3 次元位置は連続値を取るものとして考えられるため、回帰モデルを用いた。また、過去のラベル付けされた訓練データから学習する「教師あり学習」となる。本研究では機械学習手法として、教師あり学習の回帰モデルに用いられる手法であるニューラルネットワーク、ランダムフォレスト、サポートベクターマシンの 3 手法を用いた。各手法の特徴について述べる。

4.1.1 ニューラルネットワーク

ニューラルネットワークは、人間の脳の神経回路の仕組みを模したモデルであり、人間が経験によって脳を学習させていくように、データから学習を行う[22]。実際の神経回路においてニューロンは信号を受け取り、その情報を処理して受け渡す。図 10 のようにニューロンはモデル化することができる。入力値 x はそれぞれの結合部分に重み w とバイアス b が付けられる。出力する際には出力値 y に変換する活性化関数に入り、出力される。このニューロンモデルが複数繋がることで、ニューラルネットワークとなる。以下に、一般的にニューラルネットワークモデル構築の流れを示す[21]。

(1) 入力と出力する項目の決定と、入力データの標準化

本研究では、16 分割光検出器から得られた 16 個の信号電圧が入力となり、粒子の 3 次元位置が出力となる。また、入力データを 0 から 1 の範囲に変換を行う。この変換を行うことで、すべての入力データを同等に扱うことができる。

(2) 適切なニューラルネットワークの設定

最も基本的なニューラルネットワークは図 11 のような 2 段階で構成されるモデルと考えることができ、中間層のユニットの適当な数を設定する必要がある。中間層のユニット数は少なすぎるとデータに含まれる非線形性を吸収するのに十分な柔軟であるモデルにならない。また、ユニット数を多くしすぎると過学習の危険がある。加えて、活性化関数 f を決定する必要がある。活性化関数には入力値の総和がどのように活性化するか決定する役割があり、シグモイド関数を用いられることが多い。

(3) 訓練データを用いて学習

本研究では、誤差逆伝播法[23]を用いて、ニューラルネットワークに学習させ、最適な重みを決定している。誤差逆伝播法を用いた学習は以下の手順で行うことができる。

1. 初期値として、すべての重みを乱数により決定する。
2. ネットワークに訓練データを入力し、出力値を計算する。
3. 出力値 y と教師信号 t との差から、2 乗誤差 E を定義する。出力ユニットの教師信号を t とすると E は

$$E = \frac{1}{2}(y - t)^2 \quad (4.1)$$

と表すことができる。

4. 誤差をフィードバックし、誤差が最小になるように重み w を調整する。更新する前の重みと更新後の重み、その変更量 Δw は係数 α を用いて、

$$\Delta w = -\alpha \frac{\partial E}{\partial w} \quad (4.2)$$

と表すことができる。誤差逆伝播法では、 E の偏微分を求めるために、連鎖率を用いて展開し、計算を行うことで効率良く計算を行っている。この Δw を用いて重みを更新することを繰り返すことで、誤差は 0 に近づく。また、バ

イアス b も同様にして更新される。

誤差逆伝播法は、中間層の各ユニットに連結されているユニットとだけ情報の受け渡しが行われるため、並列演算に向けた計算機上で効率的に実装できることが利点として挙げられる。

(4) ニューラルネットワークの働きの評価

学習データの他に用意していたテスト用データを用いて評価を行う。

ニューラルネットワークは、中間層のユニット数を多くすると任意の関数を近似できることが証明されている。

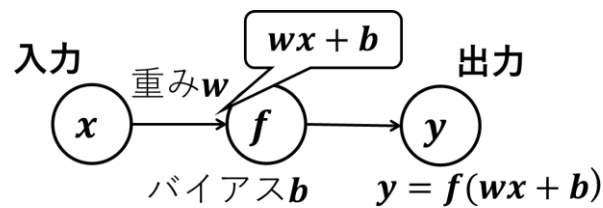


図 10 ニューロンモデル

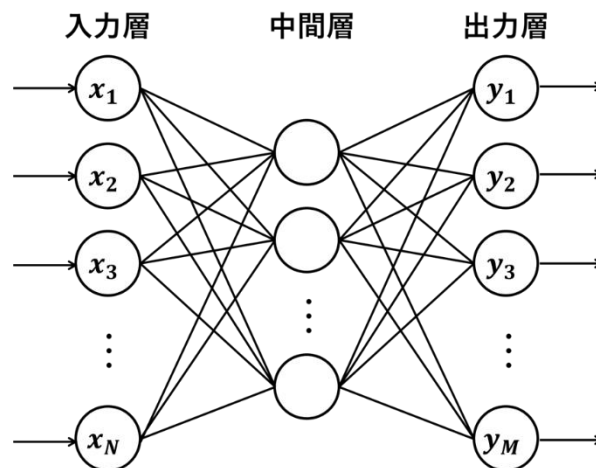


図 11 階層型ニューラルネットワーク

4.1.2 ランダムフォレスト

ランダムフォレストは、L. Breiman によって 2001 年に集団学習アルゴリズムの一種であるバギングの改良として開発されたアルゴリズム [24] であり、分類にも回帰にも用いられる。複数の決定木をランダムに構築し、それらの結果を組み合わせることで予測を行う。集団学習によって予測精度を向上させているため、非線形な予測アルゴリズムである。本研究で構築するランダムフォレストモデルには、分類にも回帰にも対応している決定木アルゴリズムである CART(Classification and Regression Trees)を用いている。CART では、不純度によってノードを 2 分割する。回帰木における不純度の指標には平均二乗誤差が用いられ、訓練データと予測値の平均二乗誤差が最小になる分割を選択する [25]。以下に、一般的なランダムフォレストモデル構築の流れを示す [21]。

(1) 入力と出力する項目の決定と、入力データの標準化

ニューラルネットワークと同様に、本研究では 16 分割光検出器から得られた 16 個の信号電圧が入力とし、粒子の 3 次元位置が出力とした。また、入力データを 0 から 1 の範囲に変換する。

(2) 適切なランダムフォレストの設定

作成する決定木の数、1 つ 1 つの決定木を作成する際に使用する特徴量の数、頂点での最小標本数を設定する。これらパラメータはグリッドサーチなどで決定することが一般的である。ここでグリッドサーチとは、あらかじめ探索するパラメータ値を設定し、パラメータの探索空間を格子状(グリッド)に区切り、すべての格子点(パラメータの組み合わせ)でモデルの学習を行い、正答率を求め、最も良い組み合わせを選択する方法である。本研究では、正答率は交差確認法で求めた。

(3) 訓練データを用いて学習

以下にランダムフォレストに学習させる手順 [21][25]を示す。

1. 入力データ X から大きさ N の標本集合 X_s をブーストトラップサンプリング(重複を許したサンプリング)を行うことで取り出す。
2. CART の学習アルゴリズムを用いて、標本から決定木を成長させる。その際、重複を許さずに抽出した特徴量を用いてノードを分割する。

3. ステップ 1～2 を作成する決定木の数分だけ繰り返す。
4. 決定木ごとに予測を行い、値の平均値を出力する。

(4) ランダムフォレストの働きの評価

訓練データの他に用意していたテスト用データを用いて評価を行う。

ランダムフォレストは、学習する特徴量をランダムに選択して学習するため、ノイズがある教師データに対して頑健であることが知られている。

4.1.3 サポートベクターマシン

サポートベクターマシンによる回帰(以下 SV 回帰と称する)は、分類のために導入されたサポートベクターマシンの特徴を利用している[26][27]。サポートベクターマシンによる分類(以下 SV 分類と称する)では、「マージン最大化」の基準を設けて訓練データの集合から分類境界を学習する。分類境界を挟んで 2 つのクラスがどのくらい離れているかをマージンと呼び、図 12 のように分類においてはなるべく大きなマージンを持つ分類境界を求める。これを「マージン最大化」と呼ぶ。SV 分類では、マージン以上のデータに関して、データの損失は 0 としている。

一方 SV 回帰について述べる。線形回帰の場合、回帰直線から訓練データが離れるとその二乗誤差を考慮するが、SV 回帰の場合、図 13(a)のように回帰直線から残差の絶対値が ε 以下であればそれを考慮しない。また、図 13(b)は ε -不感応関数と呼ばれ、求める回帰関数を式 4.3 とすると、式 4.4 のように表すことができる。

$$f(x) = w^T \cdot x + b \quad (4.3)$$

$$L\varepsilon(y_i) = \begin{cases} 0 & (|f(x_i) - y_i| < \varepsilon) \\ |f(x_i) - y_i| - \varepsilon & (|f(x_i) - y_i| \geq \varepsilon) \end{cases} \quad (4.4)$$

ここで、 y_i は入力 x_i に対する出力である。残差の絶対値が ε より大きくなるにつれて、 ε を超えた分に対して線形に損失が増えていく。これがマージン以上のデータに関して、データの損失は 0 とする SV 分類の考えを回帰問題に適用したものと解釈することができる。回帰関数は式 4.5、式 4.6 に示される最適化問題を解くことで求められる。

$$\text{目的関数：} \quad \min_{w, \xi_i, \xi_i^*} \frac{1}{2} \|w\|^2 + C \sum_{i=1}^n (\xi_i + \xi_i^*) \quad (4.5)$$

$$\begin{aligned} \text{製薬条件：} \quad & \{w^T \cdot x_i + b\} - y_i \leq \varepsilon + \xi_i \\ & y_i - \{w^T \cdot x_i + b\} \leq \varepsilon + \xi_i^* \\ & \xi_i \xi_i^* \geq 0 \quad (i = 1, 2, \dots, n) \end{aligned} \quad (4.6)$$

目的関数の C は第一項のモデルの複雑性と第二項の損失関数のバランスを決めるパラメータを表す。また、 ξ_i 、 ξ_i^* はモデル出力を制限するための緩和変数を表す。以下に、一般的なサポートベクターマシンモデル構築の流れを示す。

(1) 入力と出力する項目の決定と、入力データの標準化

ニューラルネットワーク、ランダムフォレストと同様に、本研究では 16 分割光検出器から得られた 16 個の信号電圧が入力とし、粒子の 3 次元位置が出力とした。また、入力データを 0 から 1 の範囲に変換する。

(2) 適切なサポートベクターマシンの設定

まず、SV 回帰に非線形性を与えるカーネル関数を選択する。本研究においては式 4.7 に示す RBF(radial basis function)カーネルを用いた。

$$K(x_i, y_i) = \exp(-\gamma \|x_i - x_j\|^2) \quad (4.7)$$

次に、パラメータとして C と γ を設定する。これらのパラメータはグリッドサーチで決定することが一般的である。

(3) 訓練データを用いて学習

訓練データを用いて、式 4.5、式 4.6 に示される最適化問題を解くことで回帰関数を求める。

(4) サポートベクターマシンの働きの評価

訓練データの他に用意していたテスト用データを用いて評価を行う。

サポートベクターマシンは、残差に不感帯を設けるため、ノイズの影響を受けにくいことが知られている。

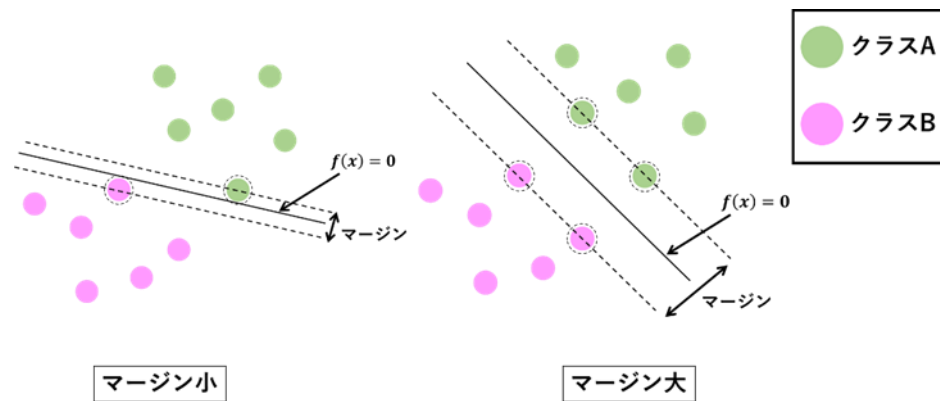


図 12 分類境界とマージン

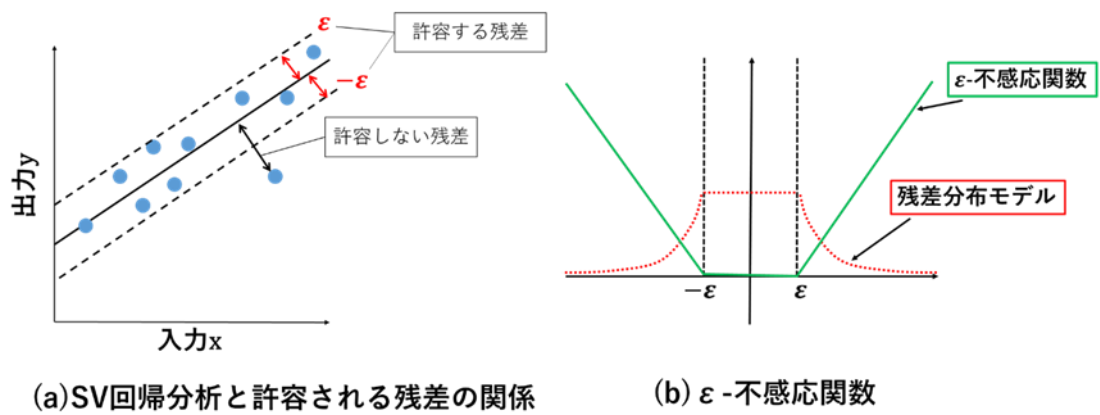


図 13 SV 回帰と残差の関係

4.2 検討方法

光ピンセット捕捉下粒子の粒子位置推定法に最適な機会学習手法の検討を目的として行った実験について述べる。本検討実験では、16 分割光検出器を使用することを想定し、実際に得られる信号に疑似した信号を顕微鏡画像から作成し、検討を行った。以下に手順を述べる。

(1)粒径ごとの拡大倍率の決定

粒径 $1\mu\text{m}$ より大きいサイズの粒子は操作する際に取りこぼすことが少なく、粒径 $1\mu\text{m}$ 以下になると取りこぼしが発生しやすくなるため、本研究では捕捉対象を粒径 $1\mu\text{m}$ の粒子としている。実際に得られる顕微鏡画像は、図 14(a)のように対象粒子は非常に小さく映っており、このままの倍率で 16 分割をしても対象粒子の特徴を捉えることができない。そこで、本研究では図 14(b)のように CCD カメラで撮影した実際の顕微鏡画像を 64 倍にした顕微鏡画像を用いて疑似信号を作成した。粒子は光軸方向に移動すると、ピント位置を境に観察像の中心部分の明暗が反転するので、この位置を $z=0$ とする。粒子は光軸方向に移動すると、図 15 のように見え方が変わる。このように、粒子観察像がピンボケしたようになっていても、64 倍の倍率であれば 16 分割した際に特徴を捉えることができるになっている。

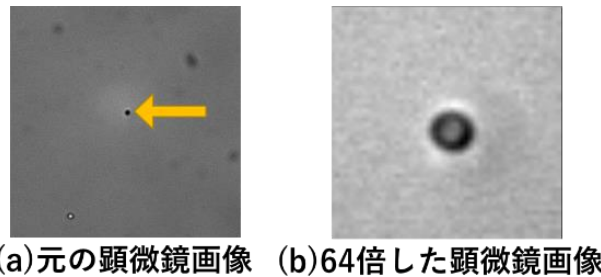


図 14 対象粒子($r=1\mu\text{m}$)の顕微鏡画像

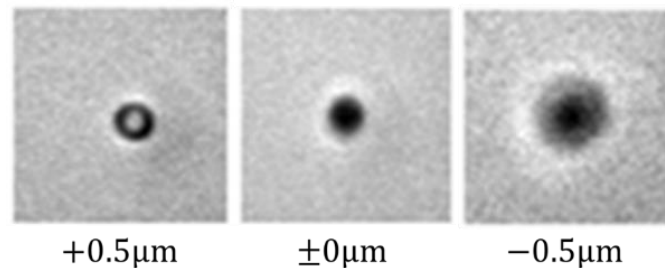


図 15 ピント位置付近の粒子観察像

(2)学習データセット(粒子画像)の決定

光ピンセット捕捉下粒子の3次元位置推定に用いる学習データとして様々な3次元位置の顕微鏡画像のデータセットを作成した。まず初めに、ピンポイント位置から光軸方向での刻み幅を図16に示すようにし、粒子位置を光軸方向にそれぞれ変化させて顕微鏡画像を取得した。さらに、取得画像を64倍に拡大した画像をもとに、面内での粒子位置をオフセットさせて粒子位置が異なる顕微鏡画像を作成した。図17に面内方向における画像取得の粒子位置を示した。本研究は光ピンセットで捕捉されている粒子を想定しており、光ピンセットの集光位置は画像の中心に存在すると考え、画像の中心部の画像データの割合を多くした。総データ数は1944枚となった。

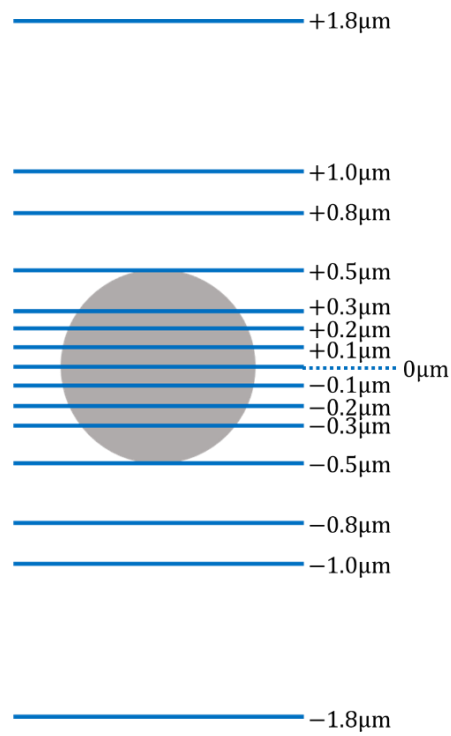


図 16 光軸方向における画像取得の刻み幅

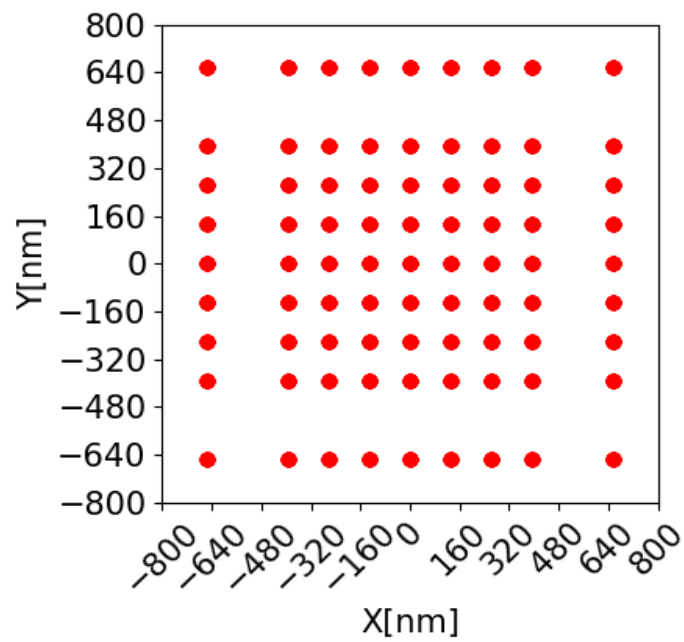


図 17 面内方向における画像取得の粒子位置

(3)特徴量の抽出

作成したデータセットのすべての画像を 16 分割にし、1 分画ごとに画素値を積分した値を抽出することで、図 18 に示すように 1 枚の画像から 16 次元の疑似信号を作成した。

(4)モデルの作成

説明変数を疑似信号、目的変数を粒子位置とし、機械学習手法を用いて粒子位置推定法を構築した。本研究では、複数の出力の間に存在する相関関係を考慮した多出力の推定モデルをニューラルネットワークとランダムフォレストそれぞれを用いて構築し、比較を行った。その後、単出力の推定モデルをニューラルネットワーク、ランダムフォレスト、サポートベクターマシンそれぞれを用いて構築し、比較を行った。なお、単出力モデルのみにサポートベクターマシンを用いたのは、サポートベクターマシンが出力の間に存在する相関関係を考慮することが難しく、従来のサポートベクターマシンを用いた多出力モデルでは独立している単出力モデルを組み合わせモデルを構築されているためである[28]。



図 18 顕微鏡画像から作成したデータセット

第5章 結果

4 章では、提案手法に最適な機械学習手法の概要と検討実験手順について述べた。5 章では、検討実験の結果と考察を述べる。初めに 1 つの推定器から粒子位置の 3 次元座標を出力する多出力モデルの検討結果について述べ、次に 1 次元座標のみを出力する推定器を 3 つ組み合わせて粒子位置の 3 次元座標を得る単出力モデルの検討結果について述べる。

5.1 多出力モデル

本研究では、多出力の粒子位置推定モデルをニューラルネットワークとランダムフォレストを用いて構築した。初めにニューラルネットワークの検討結果を示し、次にランダムフォレストの検討結果を示す。

5.1.1 検討結果

ニューラルネットワーク

本研究では入力層、1 層の中間層、出力層の 3 層からなるニューラルネットワークを用いた。設定したニューラルネットワークの主なパラメータ値を表 1 に示す。これらパラメータはグリッドサーチにより最適化されている。次に、テストデータを用いて検証を行った結果を示す。図 19 には面内方向(x 方向)に関して横軸に正解値、縦軸に推定値をとったグラフ、図 20 には光軸方向(z 方向)に関し同様のグラフを示す。面内方向の位置推定では、特徴を捉えることができているが、光軸方向の位置推定では特徴を捉えることができず、推定精度が悪い。

表 1 ニューラルネットワークの設定パラメータ

パラメータ名	値や関数名
hidden_layer_sizes : 中間層のユニット数	26
activation : 活性化関数	logistic
solver : 最適化手法	lbfgs
alpha : L2ペナルティ(正則化の項)	0.0001
max_iter : 反復の最大回数	100000
learning_rate : 重み更新のための学習率スケジュール	constant
random_state : 乱数生成の状態	20

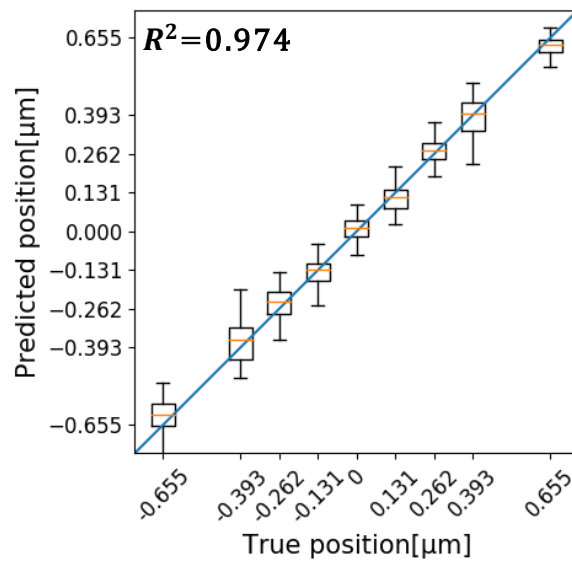
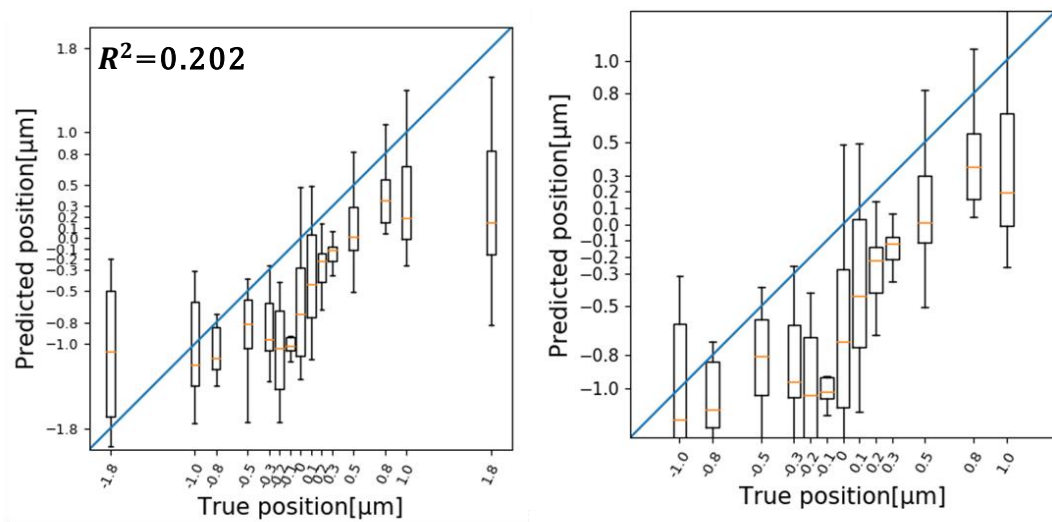


図 19 面内方向(x 方向)位置推定(ニューラルネットワーク)



(a) 推定結果：表示範囲-1.8～1.8 (b)推定結果：表示範囲-1.0～1.0

図 20 光軸方向(z 方向)位置推定(ニューラルネットワーク)

ランダムフォレスト

本研究で設定したランダムフォレストの主なパラメータ値を表 2 に示す。ランダムフォレストの提案者は、回帰のランダムフォレストにおいて、分割に用いる最適な特徴量は、データセットの特徴量を p としたとき、 $p/3$ を推奨している。本研究において p は 16 であるため、推奨値は 5 となる。また、葉を構成するのに必要な最小サンプル数として、5 を推奨している[21]。しかし、これらパラメータは扱う問題によって最適値は変わるため、調整が必要なパラメータとして扱うべきである。そのため、これらパラメータをグリッドサーチにより最適化した結果を表 2 に示す。また、決定木の本数もランダムフォレストで調整すべきパラメータである。これは OOB(out-of-bag)エラー率によって調整を行う。ランダムフォレストはブーストトラップサンプリングを行うため、学習データの中で、学習フェイズで使われなかったデータ(OOB データ)が存在する。この OOB データを構築したランダムフォレストに適応し、OOB エラー率と決定木の数との関係から最適な決定木の数を設定した。決定木の数とエラー率の関係を図 21 に示す。図 21 の結果では、決定木の数が 50 であればエラー率に関係がないことが分かる。そこで、決定木の数を 50 とし、ランダムフォレストモデルを構築した。

表 2 グリッドサーチにより設定したランダムフォレストのパラメータ

パラメータ名	値や関数名
max_features : 分割に最適な特徴量	6
min_samples_leaf : 葉を構成するのに必要な最小サンプル数	5

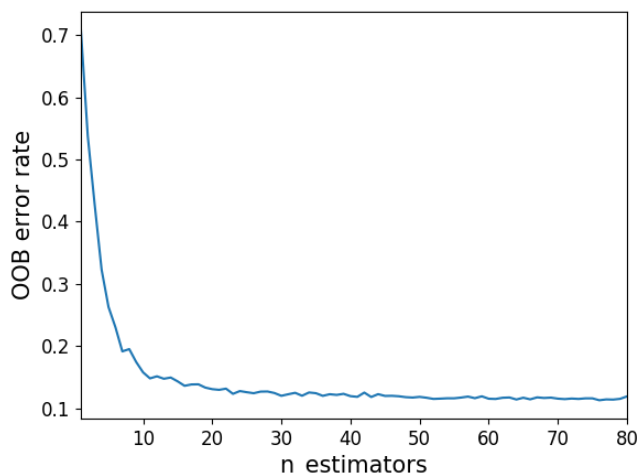


図 21 決定木とエラー率の関係

次に、テストデータを用いて検証を行った結果を示す。図 22 には面内方向(x 方向)に関して横軸に正解値、縦軸に推定値をとったグラフ、図 23 には光軸方向(z 方向)に関して同様のグラフを示す。ニューラルネットワークと同様に、面内方向の位置推定では、特徴を捉えることができていないが、光軸方向の位置推定では特徴を捉えることができていない。

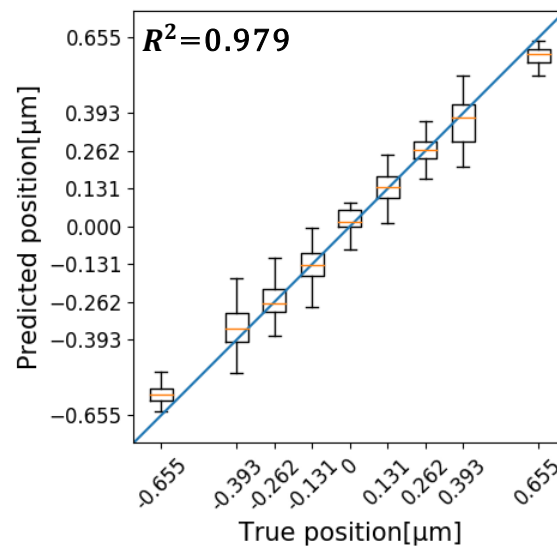
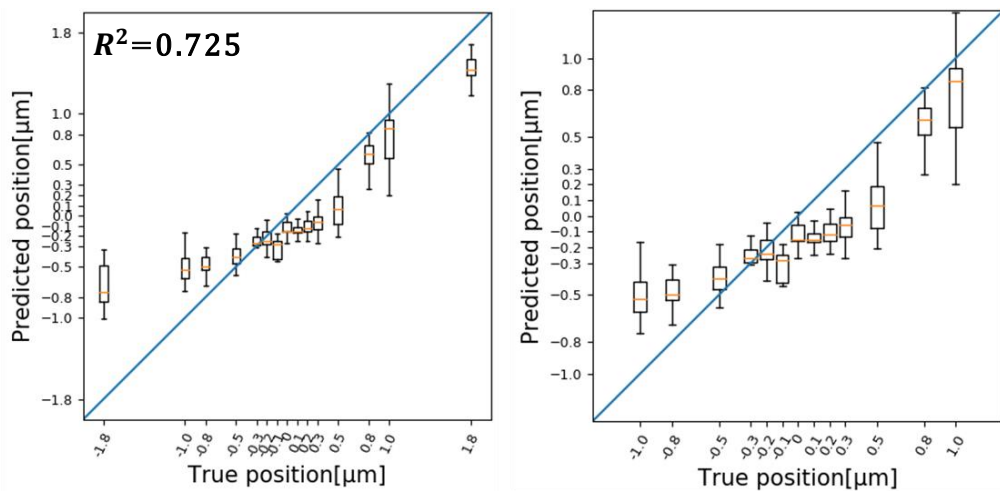


図 22 面内方向(x 方向)位置推定(ランダムフォレスト)



(a) 推定結果：表示範囲-1.8～1.8 (b)推定結果：表示範囲-1.0～1.0

図 23 光軸方向(z 方向)位置推定(ランダムフォレスト)

また、ここで 2 つの推定モデルの標準偏差を表 3 に示す。この標準偏差は、交差確認法を用いて検証を行った結果である。表 3 より、2 つの推定モデルを比較すると、面内方向においてはニューラルネットワークで構築した推定モデルの精度がよく、光軸方向においてはランダムフォレストで構築した推定モデルの精度がよいことが分かる。

表 3 各学習アルゴリズムにおける各方向の標準偏差
(多出力モデル)

Direction	Standard deviation[μm]	
	Neural Network	Random Forest
x	0.070	0.073
z	0.856	0.446

5.2 単出力モデル

本研究では、単出力の粒子位置推定モデルをニューラルネットワーク、ランダムフォレスト、サポートベクターマシンを用いて構築した。推定モデルは面内方向(x 方向)のみを出力する推定モデルと、光軸方向(z 方向)のみを出力する推定モデルの 2 つを構築した。初めにニューラルネットワークの検討結果を示し、次にランダムフォレストの検討結果を示したあと、サポートベクターマシンの検討結果を最後に示す。

5.2.1 検討結果

ニューラルネットワーク

多出力モデルと同様に、入力層、1 層の中間層、出力層の 3 層からなるニューラルネットワークを用いた。グリッドサーチの結果、面内方向と光軸方向で最適なパラメータが異なった。面内方向における推定モデルの設定した主なパラメータ値を表 4 に示し、光軸方向におけるパラメータ値を表 5 に示す。次に、テストデータを用いて検証を行った結果を示す。図 24 には面内方向(x 方向)に関して横軸に正解値、縦軸に推定値をとったグラフ、図 25 には光軸方向(z 方向)に関して同様のグラフを示す。ニューラルネットワークを用いて構築した多出力モデルと比較すると、光軸方向に関して特徴を捉えることができるようになったのが分かる。

表 4 ニューラルネットワークの設定パラメータ(面内方向)

パラメータ名	値や関数名
hidden_layer_sizes : 中間層のユニット数	17
activation : 活性化関数	logistic
solver : 最適化手法	lbfgs
alpha : L2ペナルティ(正則化の項)	0.0001
max_iter : 反復の最大回数	100000
learning_rate : 重み更新のための学習率スケジュール	constant
random_state : 乱数生成の状態	20

表 5 ニューラルネットワークの設定パラメータ(光軸方向)

パラメータ名	値や関数名
hidden_layer_sizes : 中間層のユニット数	17
activation : 活性化関数	tanh
solver : 最適化手法	lbfgs
alpha : L2ペナルティ(正則化の項)	0.0001
max_iter : 反復の最大回数	100000
learning_rate : 重み更新のための学習率スケジュール	constant
random_state : 乱数生成の状態	20

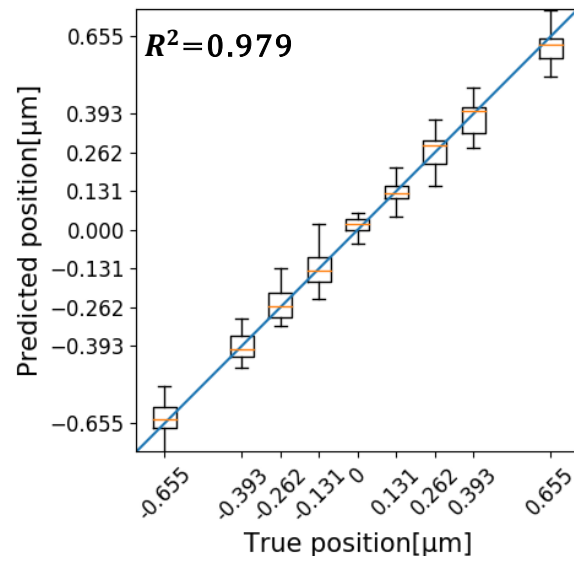
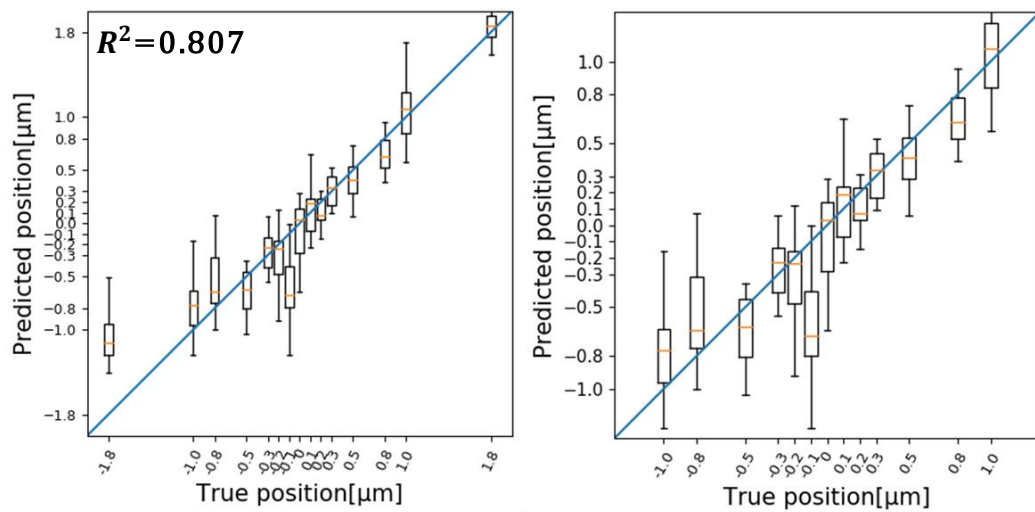


図 24 面内方向(x 方向)位置推定(ニューラルネットワーク)



(a) 推定結果：表示範囲-1.8～1.8 (b)推定結果：表示範囲-1.0～1.0

図 25 光軸方向(z 方向)位置推定(ニューラルネットワーク)

ランダムフォレスト

ニューラルネットワークを用いて構築した単出力モデル同様、グリッドサーチの結果、面内方向と光軸方向で最適なパラメータが異なった。面内方向における推定モデルの設定した主なパラメータ値を表 6 に示し、光軸方向におけるパラメータ値を表 7 に示す。また、決定木の数とエラー率の関係を面内方向に関しては図 26 に示し、光軸方向に関しては図 27 に示す。図 26 の結果より、面内方向の推定モデルの最適な決定木の数は 40 であり、図 27 の結果より、光軸方向の推定モデルの最適な決定木の数は 50 であったため、これらの値を用いた。

表 6 ランダムフォレストの設定パラメータ(面内方向)

パラメータ名	値や関数名
max_features : 分割に最適な特徴量	5
min_samples_leaf : 葉を構成するのに必要な最小サンプル数	4

表 7 ランダムフォレストの設定パラメータ(光軸方向)

パラメータ名	値や関数名
max_features : 分割に最適な特徴量	6
min_samples_leaf : 葉を構成するのに必要な最小サンプル数	5

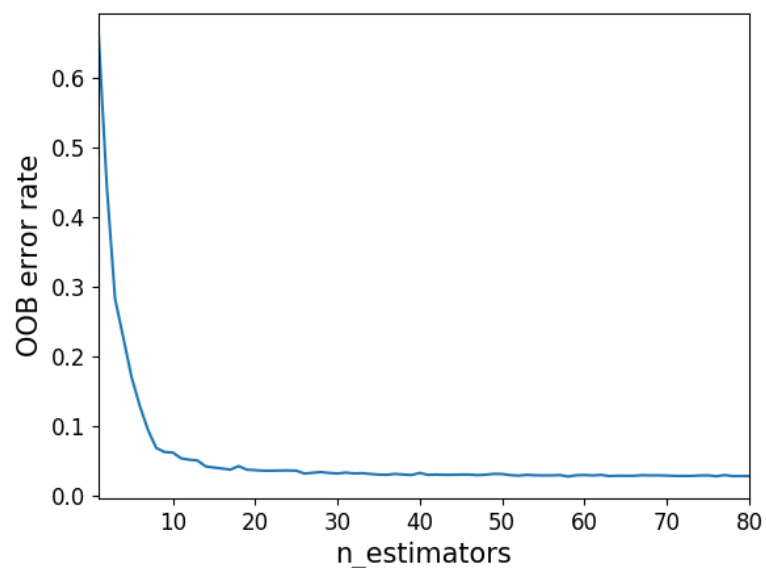


図 26 決定木とエラー率の関係(面内方向)

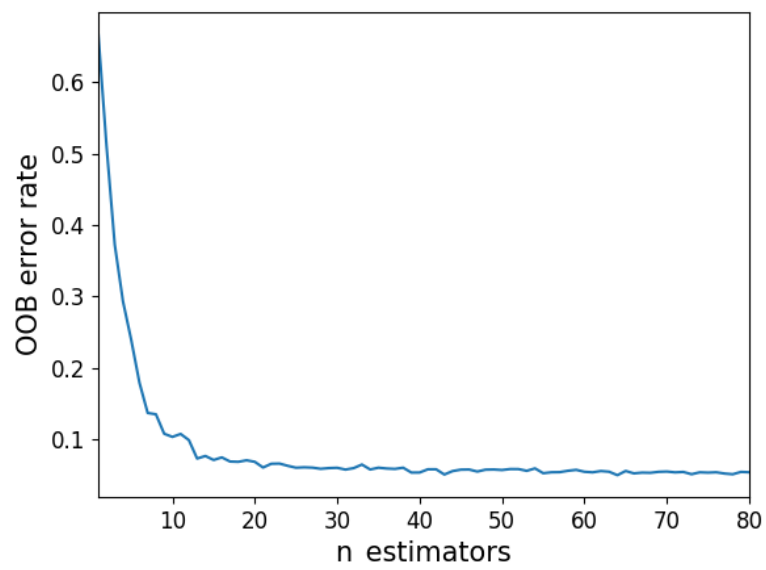


図 27 決定木とエラー率の関係(光軸方向)

次に、テストデータを用いて検証を行った結果を示す。図 28 には面内方向(x 方向)に関して横軸に正解値、縦軸に推定値をとったグラフ、図 29 には光軸方向(z 方向)に関して同様のグラフを示す。ランダムフォレストを用いて構築した多出力モデルと比較すると、光軸方向に関して大幅に精度よく特徴を捉えることができるようになった。

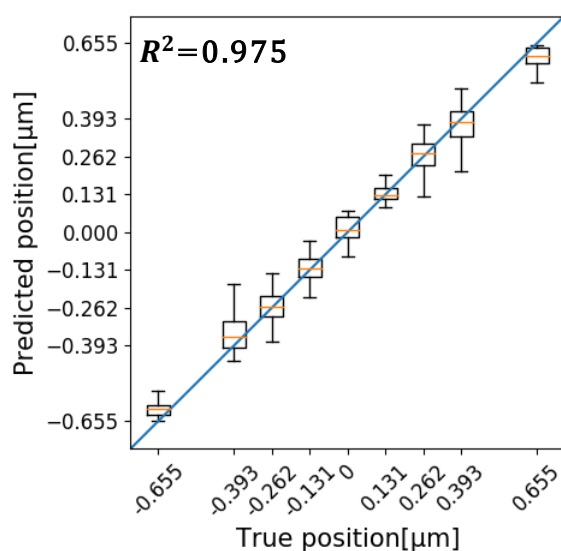
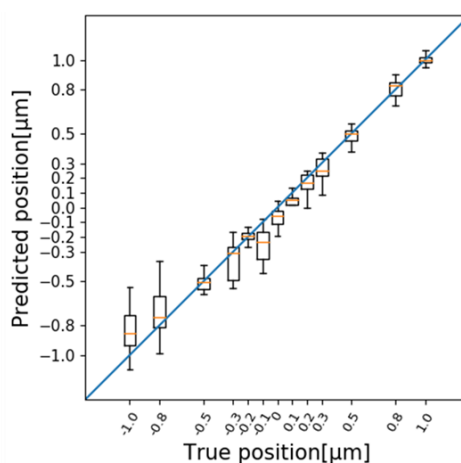
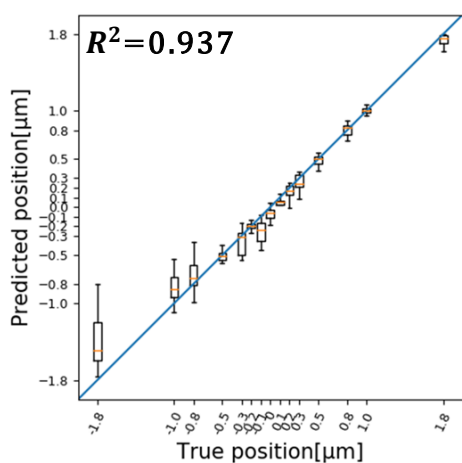


図 28 面内方向(x 方向)位置推定(ランダムフォレスト)



(a) 推定結果：表示範囲-1.8～1.8 (b)推定結果：表示範囲-1.0～1.0

図 29 光軸方向(z 方向)位置推定(ランダムフォレスト)

サポートベクターマシン

本研究で設定したサポートベクターマシンのパラメータ値を表 8 に示す。これらパラメータはグリッドサーチにより最適化されており、面内方向位置のみを出力する推定モデルも、光軸方向位置のみを出力する推定モデルも表 8 に示すパラメータが最適であった。また、テストデータを用いて検証を行った結果を示す。図 30 には面内方向(x 方向)に関して横軸に正解値、縦軸に推定値をとったグラフ、図 31 には光軸方向(z 方向)に関して同様のグラフを示す。ランダムフォレストを用いて構築した多出力モデルと比較すると、光軸方向に関して大幅に精度よく特徴を捉えることができたのが分かる。

表 8 サポートベクターマシンの設定パラメータ

パラメータ名	値と関数名
kernel : カーネルの種類	rbf
gamma : カーネル関数のパラメータ	1000
C : ペナルティ項の係数	100

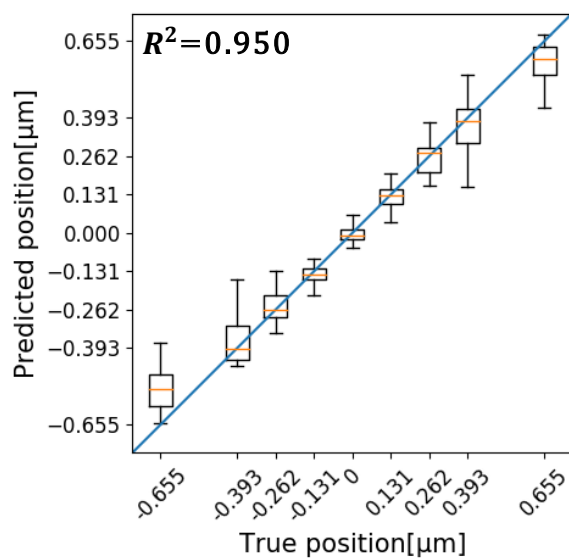
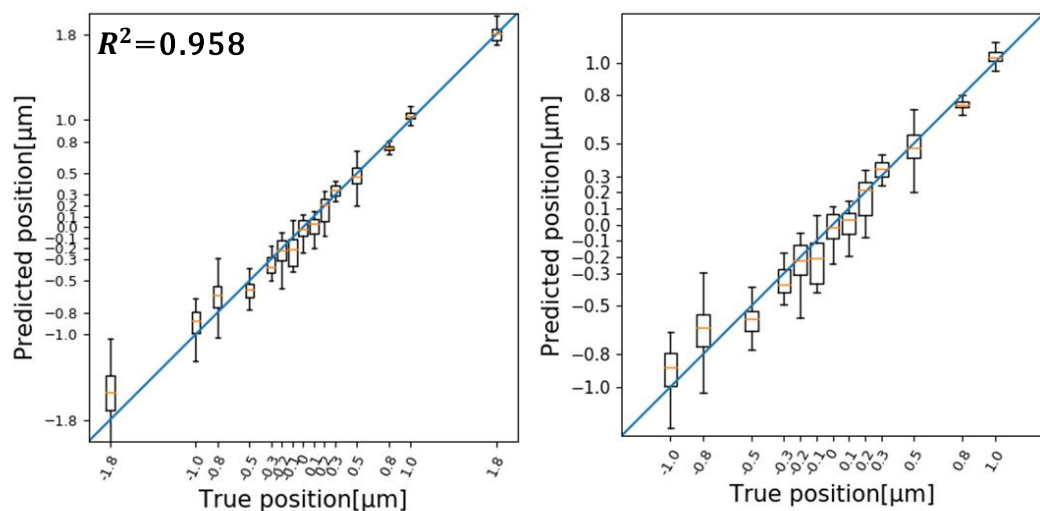


図 30 面内方向(x 方向)位置推定(サポートベクターマシン)



(a) 推定結果：表示範囲-1.8～1.8 (b)推定結果：表示範囲-1.0～1.0

図 31 光軸方向(z 方向)位置推定(サポートベクターマシン)

また、ここで 3 つの推定モデルの標準偏差を表 9 に示す。この標準偏差は、交差確認法を用いて検証を行った結果である。表 9 より、3 つの推定モデルを比較すると、面内方向においてはニューラルネットワークとランダムフォレストを用いて構築した推定モデルの精度がよく、光軸方向においてはサポートベクターマシンを用いて構築した推定モデルの精度がよいことが分かる。

表 9 各学習アルゴリズムにおける各方向の標準偏差
(単出力モデル)

Direction	Standard deviation[μm]		
	Neural Network	Random Forest	Support Vector Machine
x	0.065	0.065	0.084
z	0.363	0.207	0.192

5.3 考察

5.3.1 多出力モデルについての考察

2つの機械学習手法を比較すると、面内方向位置の推定精度がよかったのはニューラルネットワークを用いた推定モデルであり、光軸方向位置の推定精度がよかったのはランダムフォレストを用いた推定モデルであった。疑似信号作成に用いた顕微鏡画像では、面内方向には粒子の大きさが変わらず粒子が移動している。また、光軸方向には粒子の面内方向位置は変わらず、粒子の大きさや輝度而变化しながら粒子が移動している。これらの違いがそれぞれの方向に最適な機械学習手法が存在する要因であると考えられる。

また、一般的に光ピンセットで捕捉可能範囲は固定であり、光の波長程度(本研究では1064nm)である[29]。この範囲から離れすぎると、粒子を取りこぼす可能性が高くなると言えるが、経験上、光ピンセットを用いて粒子を捕捉試行する際、ビームの集光位置が粒子位置より半径分ずれていても捕捉可能である。本研究で用いた粒子の粒径は1 μ mであり、0.5 μ m以上のずれは取りこぼしの原因となる。表5.1.3より、ニューラルネットワークの光軸方向は0.5 μ m以上の標準偏差であり、粒子位置推定ミスによる取りこぼしが発生すると推測される。また、ランダムフォレストにおいても、0.5 μ mに近い標準偏差であることから、複数の出力の間に存在する相関関係を考慮した多出力モデルは粒子位置推定法に適さないと考えられる。

5.3.2 単出力モデルについての考察

ニューラルネットワークとランダムフォレストは、多出力モデルと単出力モデルのどちらにも用いた。2つの機械学習手法を用いた場合の多出力モデルに対する単出力モデルの推定精度向上率を表10に示す。面内方向、光軸方向のどちらも推定精度は向上していることが分かる。この結果から、面内方向の粒子移動と光軸方向の粒子移動に考慮すべき相関関係が存在する可能性は低く、単出力モデルが粒子位置推定法に適していると考えられる。

また、本研究は実時間での捕捉下粒子のブラウン運動制御に向けた粒子位置推定法を開発した。従って、推定時間は短い必要がある。3つの機械学習手法で構築したそれぞれの単出力モデルの位置推定に要した平均時間を表11に示す。ニューラルネットワークとサポートベクターマシンで構築した推定モデルがより短い時間で推定可能であることが分かる。この結果から、面内方向位置推定にはニューラルネットワーク、光軸方向位置推定にはサポートベクターマシンを用いた推定法を構築することで、粒子位置をよ

り高精度かつ高速に推定可能になることが考えられる。

最後に、単出力モデルにおける光軸方向位置推定について考察を行う。3 つ全ての機械学習手法で構築した単出力モデルにおいて、光軸方向位置が中心から離れた位置、特に $z=\pm 1.8\mu\text{m}$ の推定精度が低くなっている(図 25、図 29、図 31)ことが分かる。これは、粒子位置が光軸方向に大きくずれるとボケが大きくなり、はっきりとした粒子像が得られないため、推定が困難になっているためであると考えられる。しかし、実際の捕捉下の粒子がスポット位置から $z=\pm 1.8\mu\text{m}$ の位置までブラウン運動するとは考えられず、応用の際には問題がないと考えられる。このような結果が得られたため、元のデータセットより、 $z=\pm 1.8\mu\text{m}$ のデータを抜いてデータセットを更新し、3 つの機械学習手法すべてを用いて再び単出力モデルを構築した。元のデータセットを用いた単出力モデルに対する更新したデータセットを用いた単出力モデルの推定向上率を表 12 に示す。また、図 32 に更新したデータセットを用いサポートベクターマシンで構築した単出力モデルの光軸方向推定に関して、横軸に正解値、縦軸に推定値を取ったグラフを示す。表 12 から、データセットを更新したことで、推定精度は向上したことが分かるが、図 32 を見ると、粒子の半径分である $0.5\mu\text{m}$ 以上の推定ミスがなお存在することから、より推定精度の向上が必要であることが考えられる。

表 10 ニューラルネットワークとランダムフォレストの推定向上率

Direction	Improvement rate[%]	
	Neural Network	Random Forest
x	7.14	10.96
z	57.59	53.59

表 11 各機械学習手法における推定のために必要な平均時間

Machine learning method	Average required time for estimating a positon[sec]
Neural network	1.0×10^{-3}
Random Forest	2.8×10^{-2}
Support Vector Machine	1.0×10^{-3}

表 12 データセット更新後の各機械学習手法における推定向上率

Direction	Improvement rate[%]		
	Neural Network	Random Forest	Support Vector Machine
z	29.48	25.60	33.85

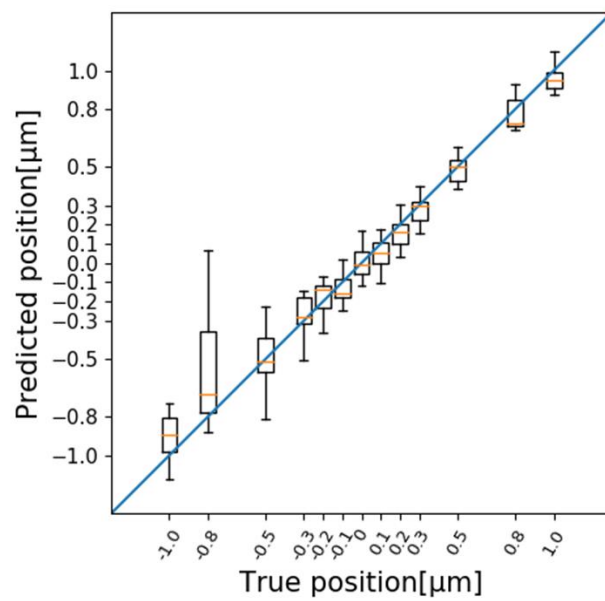


図 32 データセット更新後の光軸方向(z 方向)位置推定(サポートベクターマシン)

第6章 結論

集光レーザービームを用いて顕微鏡下で微小物体を捕捉・操作する光ピンセット技術において、捕捉対象物体が水中に存在する場合、捕捉下でも微小物体のブラウン運動は完全には抑制されていない。これが原因となり、時折、微小物体の取りこぼしが発生する。そこで、本研究では、捕捉対象を球形粒子とし、捕捉下のブラウン運動を抑制する制御に向けたブラウン運動解析のための機械学習を用いた粒子位置推定法を提案し、最適な機械学習手法の検討を行った。

提案する粒子位置推定では、まず、粒子の散乱光と集光レーザービームの干渉パターンを光ピンセットの光学系に導入した 16 分割光検出器で検出し、16 個の独立した信号電圧を取得する。そして、様々な粒子位置における信号電圧のデータセットをもとに機械学習を用いて学習させた推定モデルに信号電圧を入力し、粒子位置を推定する。

機械学習手法の検討実験では、多出力モデルと単出力モデルの 2 種類の推定モデルを構築した。また、多出力モデルの構築にはニューラルネットワークとランダムフォレストを用い、単出力モデルの構築にはサポートベクターマシンを加えて検討を行った。多出力モデルの場合、構築した推定モデルで推定を行うと光軸方向の標準偏差が取りこぼすことが多くなる粒子の半径分である $0.5\mu\text{m}$ を超えているか、 $0.5\mu\text{m}$ に近い値となった。また、多出力モデルに用いた機械学習手法を単出力モデルに用いると、推定向上率は面内方向には 7～11%程度、光軸方向には 53%～58%程度となった。このことから、複数の出力の間に存在する相関関係を考慮した多出力モデルは粒子位置推定法に適さないと考えられる。そして、単出力モデルの場合のみサポートベクターマシンを用いたが、ニューラルネットワークとランダムフォレストよりも光軸方向において標準偏差が低い結果となった。今後、推定時間も考慮すると、面内方向の推定に対しては、ニューラルネットワークを用い、光軸方向の推定に対しては、サポートベクターマシンを用いた単出力モデルを組み合わせることで、3次元方向位置すべての推定精度が高い推定法を構築できる可能性を示した。

謝辞

本研究は多くの方々からの御指導、御協力をいただき、進めることができました。本研究を行うにあたり、丁寧な御指導と研究環境を与えてくださった奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科計算システムズ生物学研究室 金谷 重彦 教授に深く感謝致します。他大学の学部生であった私に快く研究室にて勉強する機会を与えてくださったことが、私のこれまでの人生の中での大きな転機となりました。また、研究室ゼミでは的確な御意見を頂きました情報科学研究科 Md. Altaf-Ul-Amin 准教授、情報科学研究科 黄 銘 助教、情報科学研究科 小野 直亮 准教授、情報科学研究科 佐藤 哲大 客員准教授に深く感謝致します。

研究発表の際、貴重な御意見及び助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 佐藤 嘉伸 教授に厚く御礼申し上げます。

学部生の頃に分野外であった私を受け入れてくださり、様々な面から御助言、熱心な御指導いただきました情報科学研究科 杉浦 忠男 客員教授に深く御礼申し上げます。大学院入学前から、長い間、大変お世話になりました。

計算システムズ生物学研究室の皆様には、大学院生活全般にわたり様々な面で支えていただきました。皆様のおかげで充実した大学院生活を過ごすことができました。誠にありがとうございました。

最後に、大学院修了まで多大なる支援を頂いた家族に深く感謝し、ここに謝辞とさせて頂きます。

参考文献

- [1] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and Steven Chu, “Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles”, *Opt. Lett.* **11**, pp. 288-290, (1986)
- [2] 河田 聡, “第 3 章 ナノオプティクス・ナノフォトニクスによる駆動、制御”, *ナノオプティクス・ナノフォトニクスのすべて*, フロンティア出版, pp. 182-189, (2006)
- [3] 浮田 宏生, *マイクロメカニカルフォトニクスー光情報システムの応用ー*, 森北出版, pp. 58-90, (2002)
- [4] J. H. Poynting, “On the transfer of energy in the electromagnetic field”, *Phil. Trans. Royal Soc. London*, **175**, pp. 343-361, (1884)
- [5] P. Lebedev, “Untersuchungen über die Druckkräfte des Lichtes”, *Ann. Physik.* **311**, pp. 433-458, (1901)
- [6] R. A. Beth, “Mechanical detection and measurement of the angular momentum of light”, *Phys. Rev.* **50**, pp. 115-125, (1936)
- [7] A. Ashkin, “Acceleration and trapping of particles by radiation pressure”, *Phys. Rev. Lett.* **24**, pp. 156-159, (1970)
- [8] 西山 雅祥, 岡本 憲二, <技術ノート> 光ピンセット, *LTM センター誌* **7**, pp. 26-31, (2005)
- [9] W. H. Wright, G. J. Sonek and M. W. Berns, “Radiation trapping forces on microspheres with optical tweezers”, *Appl. Phys. Lett.* **63**, pp. 715-717, (1993)
- [10] 森村 正直, ブラウン運動の測定と解析, *J. Phys. Soc. Jpn.* **31**, pp. 18-25, (1976)
- [11] S. H. Lee, Y. Roichman, G. R. Yi, S. H. Kim, S. M. Yang, A. van Blaaderen, P. van Oostrum and D. G. Grier, “Charactering and tracking single colloidal particles with video holographic microscopy”, *Opt. Express.* **15**, pp. 18275-18282, (2007)
- [12] A. Yevick, M. Hannel and D. G. Grier, “Machine-learning approach to holographic particle characterization”, *Opt. Express.* **22**, pp. 26884-26890, (2014)

- [13] A. G. Alkholidi, K. Sa, “Contemporary Issues in Wireless Communications in Free Space Optical Communications – Theory and Practices”, InTech, pp.159-212, (2014)
- [14] F. C. Chang, B. Sun, R. Dreyfus, J. Amato-Grill, K. Xiao, L. Dixon and D. G. Grier, “Flow visualization and flow cytometry with holographic video microscopy”, *Opt. Express*. **17**, pp. 13071-13079, (2009)
- [15] H. Shpaisman, B. J. Krishnatreya and D. G. Grier, “Holographic micrerefractometer”, *Appl. Phys. Lett.* **101**, 091102, (2012)
- [16] B. J. Krichnatreya, A. Colen-Landy, P. Hasebe, B. A. Bell, J. R. Jones, S. Sunda-Meya and D. G. Grier, “Measuring Boltzmann’s constant through holographic video microscopy of a single sphere”, *Am. J. Phys.* **82**, pp. 23-31, (2014)
- [17] F. Gittes and C. F. Schmidt, “Signals and noise in micromechanical measurements”, *Methods. Cell. Biol.* **55**, pp. 129-132, (1998)
- [18] A. Pralle, M. Prummer, E. L. Florin, E. H. K. Stelzer and J. K. H. Hörber, “Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light”, *Microsc. Res. Tech.* **44**, pp. 378-386, (1999)
- [19] M. Sarshar, W. T. Wong and B. Anvari, “Comparative study of methods to calibrate the stiffness of a single-beam gradient-force optical tweezers over various laser trapping powers”, *J. Biomed. Opt.* **19**(11), 115001, (2014)
- [20] R. Esper-Chain, A. M. Escuela, D. Fariña and J. R. Sendra, “Configurable Quadrant Photodetector: An Improved Position Sensitive Device”, *IEEE. Sensors. Journal.* **16**(1), pp. 109-119, (2016)
- [21] T. Hastie, R. Tibshirani and J. Friedman, 統計的学習の基礎—データマイニング・推論・予測—, 井尻 善久ら訳, 共立出版, pp. 443-695, (2014)
- [22] A. T. C. Goh, “Back-propagation neural networks for modeling complex systems”, *Artif. Intell. Eng.* **9**(3), pp. 143-151, (1995)
- [23] D. E. Rumelhart, G. E. Hinton and R. J. Williams, “Learning representations by back-propagating errors”, *Nature*. **323**(9), pp. 533-536, (1986)
- [24] L. Breiman, “Random Forests”, *Machine learning*. **45**(1), pp. 5-32, (2001)

- [25] S. Raschka, “Python 機械学習プログラミング 達人データサイエンティストによる理論と実践”, 福島 真太郎訳, インプレス, pp.290 -295 ,(2016)
- [26] A. J. Smola and B. Schölkopf, “A tutorial on support vector regression”, Stat. Comput. **14**, pp. 199-222, (2004)
- [27] 竹内 一郎, 烏山 昌幸, 機械学習プロフェッショナルシリーズ サポートベクトルマシン, 講談社, pp. 42-61, (2015)
- [28] E. Vazquez and E. Walter, “Multi-output support vector regression”, 13th IFAC Symp. System Identification, (2003)
- [29] K. Svoboda and S. M. Block, “Biological Applications of Optical Forces”, Annu. Rev. Biophys. Biomed. Struct. **23**, pp. 247-285, (1994)

付録

多出力モデル

グリッドサーチによるパラメータ最適化のソースコード(ニューラルネットワーク)

```
from sklearn.cross_validation import train_test_split
from sklearn.preprocessing import normalize
from sklearn.grid_search import GridSearchCV
from sklearn.neural_network import MLPRegressor
import numpy as np

#データの読み込み
#1-3 行目に xyz 位置、4 行目以降に 16 個の特徴量
data = np.loadtxt('data.csv',delimiter=',')
X = data[:,3:19]
Y= data[:,0:3]

#入力値の標準化
reX = normalize(X[0:1,:])
for i in range(2,X.shape[0]+1,1):
    x2 = normalize(X[i-1:i,:])
    reX = np.concatenate((reX,x2),axis=0)
    x2 = []

#データを訓練データとテストデータに分割する
#全体の 30%をテストデータにする
X_train,X_test,Y_train,Y_test
=train_test_split(reX,zY,test_size=0.1666,random_state=0)

#探索するパラメータを設定する
param_grid = {'activation': ['logistic','tanh','relu'],'solver': ['lbfgs','sgd','adam'],
               'hidden_layer_sizes': [24,25,26,27,28]}
```

```
#param_grid についてグリッドサーチ
mlp = GridSearchCV (MLPRegressor (max_iter = 100000, alpha = 0.0001,
                                learning_rate="constant", random_state=20) ,param_grid,cv=5)

#訓練データを学習させる
mlp.fit (X_train,Y_train)

#各試行でのスコアの確認
print (mlp.grid_scores_)

#最適化したパラメータの確認
print (mlp.best_params_)
```

多出力モデル

交差確認法のソースコード(ニューラルネットワーク)

```
from sklearn.model_selection import KFold
import numpy as np
from sklearn.preprocessing import normalize
from sklearn.neural_network import MLPRegressor
from sklearn.ensemble import RandomForestRegressor
import matplotlib.pyplot as plt
import math
import csv

#データの読み込み
#1-3 行目に xyz 位置、4 行目以降に 16 個の特徴量
data = np.loadtxt('data.csv',delimiter=',')
X = data[:,3:19]
Y= data[:,0:3]

#入力値の標準化
reX = normalize(X[0:1,:])
for i in range(2,X.shape[0]+1,1):
    x2 = normalize(X[i-1:i,:])
    reX = np.concatenate((reX,x2),axis=0)
    x2 = []

#データを 6 つに分割
kf = KFold(n_splits=6,shuffle=True)

#予測器の設定(最適化したパラメータを用いている)
estimator = MLPRegressor(max_iter = 100000, alpha =0.0001,
                           hidden_layer_sizes=26,activation="logistic",solver="lbfgs",
                           learning_rate="constant",random_state=20)
```

```

#x と z の正解値と推定値を入れる配列の初期化
Xtrue_plot = np.array ( [])
Ztrue_plot = np.array ( [])
Xpred_plot = np.array ( [])
Zpred_plot = np.array ( [])

#推定値の標準偏差を入れるリストの初期化
scoreX = list ()
scoreZ = list ()

#交差確認を行う
i=0
j=0

for train,test in kf.split (reX,Y) :
    estimator.fit (reX [train] ,Y [train] )
    Trueplot,Predplot = Y [test] ,estimator.predict (reX [test] )
    Xtrue_plot = Trueplot[:,0]
    Ztrue_plot = Trueplot[:,2]
    Xpred_plot = Predplot[:,0]
    Zpred_plot = Predplot[:,2]

    XpreSSE =pow ( (Xtrue_plot-Xpred_plot) ,2)
    XSSE = sum (XpreSSE) /324
    XSD = math.sqrt (XSSE)
    ZpreSSE =pow ( (Ztrue_plot-Zpred_plot) ,2)
    ZSSE = sum (ZpreSSE) /324
    ZSD = math.sqrt (ZSSE)

    scoreX.append (XSD)
    scoreZ.append (ZSD)

```

```
Trueplot= np.array ( [])  
Predplot= np.array ( [])  
Xtrue_plot=np.array ( [])  
Xpred_plot=np.array ( [])  
Ztrue_plot=np.array ( [])  
Zpred_plot=np.array ( [])  
  
i += 1  
j += 1  
  
#交差確認の結果を表示  
meanscoreX = np.mean (scoreX)  
print (meanscoreX)  
meanscoreZ = np.mean (scoreZ)  
print (meanscoreZ)
```