

マヨネーズの観察と、AIを活用した油滴の粒径分布のラベルフリー解析

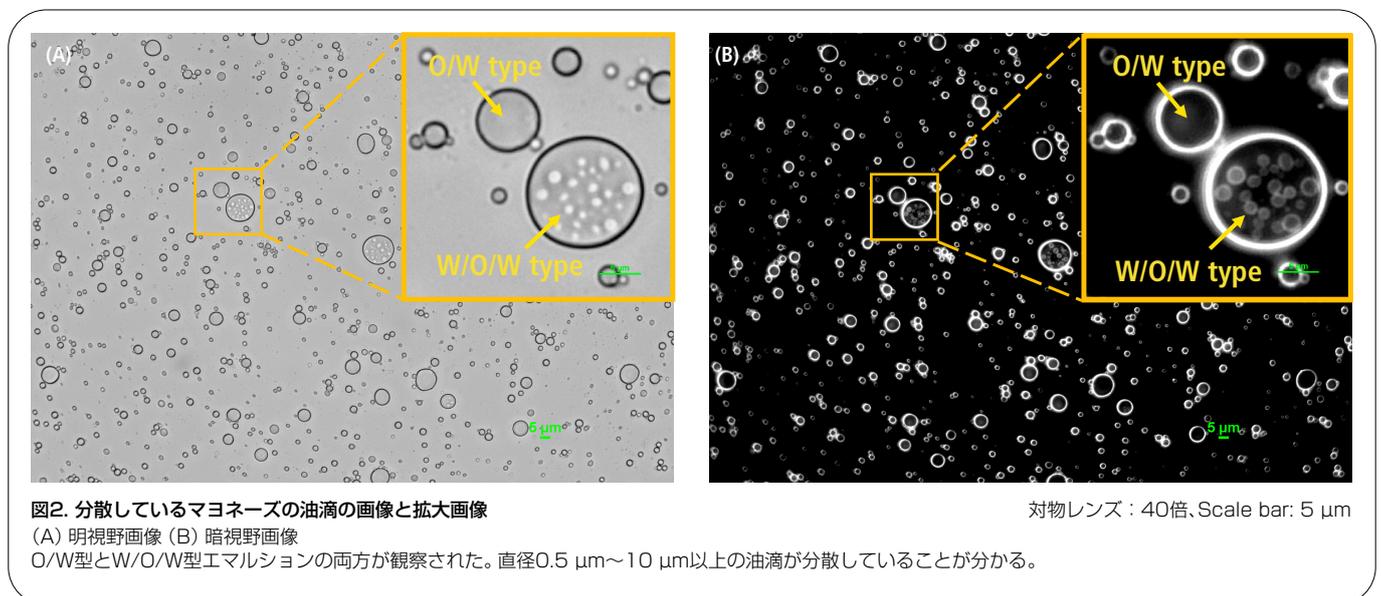
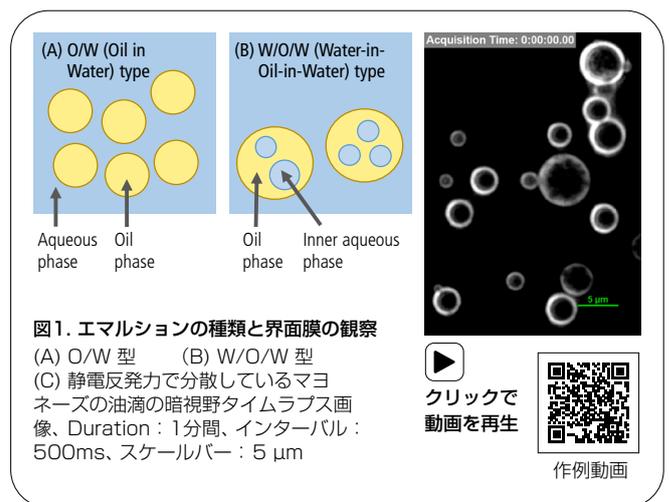
乳化技術は、マヨネーズ、マーガリン、化粧品クリームなど、幅広い産業分野で活用されています。マヨネーズは卵黄に含まれるレシチンやリポタンパク質が乳化剤として働き、水相に油が分散した水中油滴型 (O/W type; Oil in Water) のエマルジョンです。液滴のサイズは食品の味やエマルジョンの長期安定性に影響するため、液滴の粒径分布解析や膜の観察は、乳化剤の開発や安定性試験に利用されています。液滴は透過光で観察可能ですが、明視野画像は液滴と背景のコントラストが低いため、輝度値に基づく従来の二値化法では液滴の領域を識別することが困難です。本アプリケーションノートでは、ラベルフリーで液滴を観察する方法と、ディープラーニングベースの Segment.ai を用いて液滴を識別し、マヨネーズの粒径分布を解析した例を紹介します。

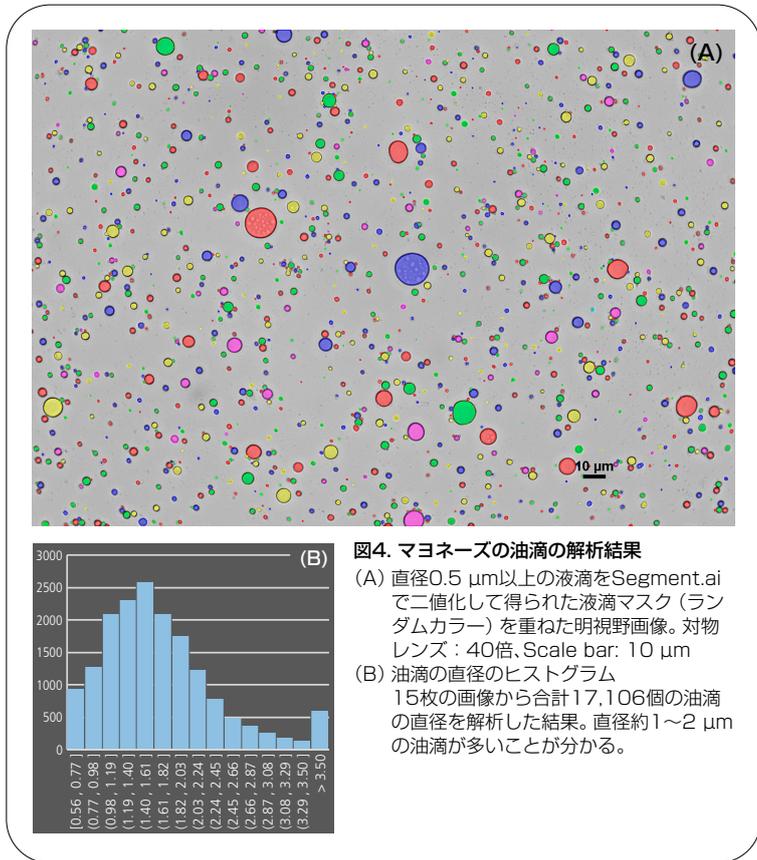
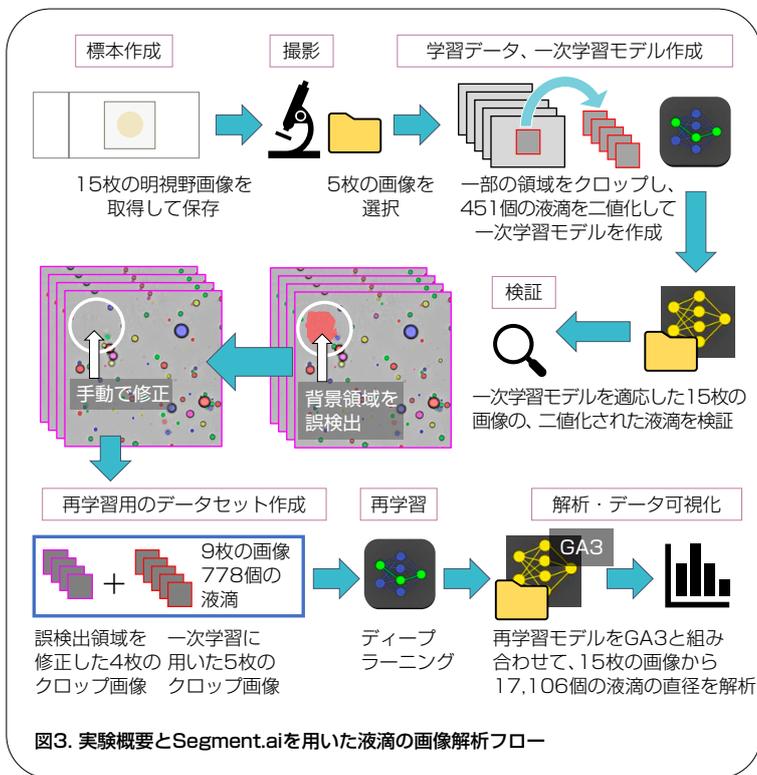
エマルジョンの安定性

エマルジョンとは、互いに溶解しない液相の一方が他方の液相の中に微細な粒子として分散している系を指します。エマルジョンの液滴は静電反発力によって凝集を抑制し、分散状態を維持します (図1.(C))。エマルジョンは不安定であり、エマルジョン間の接触は界面膜を破壊して融合 (合一) させ、大きな液滴を形成します。膜強度が弱い液滴は、液滴が合一して乳化状態が劣化します。

暗視野顕微鏡を用いた液滴膜の観察

暗視野観察では、油相と水相の間にある液滴の膜が暗い背景に明るく輝くため、液滴の膜を高コントラストで観察できます。また、内水相を持つW/O/W型エマルジョンの観察にも適しています (図2.(B))。





実験概要

- (1) 35mmディッシュにマヨネーズと水を添加してピペッティングを行い、乳濁液を作成。5 μL の乳濁液をスライドガラス上に滴下し、カバーガラスをかぶせる。40倍の対物レンズとデジタルカメラDS-Fi3を装着した正立顕微鏡ECLIPSE Siで、15枚の明視野画像を取得。
- (2) 15枚の画像から、代表的な5枚の画像を選択。
- (3) 0.31 x 0.22mmの各明視野画像から、0.07 x 0.07mmの領域をクロップ。
- (4) Binary ToolbarのAuto detect機能を使用して、5枚のトリミングされた画像から451個の液滴を手動で塗って二値化し、一次学習用のデータセットを作成。
- (5) 5枚の学習用画像を「Train Segment.ai」を用いて1,000回学習させ、一次学習モデルを作成。
- (6) 作成された一次学習モデルを用いて、15枚の明視野画像の液滴をSegment.aiで二値化し、画像を目視で確認して精度を検証。
- (7) 背景領域を誤検出している代表的な画像を手動で修正し、0.07 x 0.07mmの領域をクロップして、再学習用の画像を4枚作成。
- (8) 再学習用のデータセットとして、一次学習で使用された5枚の画像と修正された4枚の画像を含む、合計9枚の画像を使用。
- (9) 合計9枚の画像を「Train Segment.ai」を用いて1,000回学習させ、再学習モデルを作成。
- (10) 「General Analysis3(GA3)」に再学習モデルを組み合わせ、液滴の直径を計測するためのGA3レシピを作成。
- (11) 「BatchGA3」を用いて、15枚の画像から液滴の直径を解析。
- (12) 液滴の直径の計測結果をMicrosoft® Excelに出力し、ヒストグラムを作成。

まとめ

- 暗視野観察法により、油滴の膜とエマルションの分散状態を高コントラストで観察できます。
 - Segment.aiを用いて、明視野画像からラベルフリーで液滴の粒度分布を計測できます。
 - 食品、化粧品などのエマルションの開発にSegment.aiが活用できます。
 - 今回の条件では、451個の液滴を手動で塗って一次学習用のデータセットを作成するのに要した作業時間は約30分でした。17,106個の液滴を全て手動で塗る場合、約19時間を要します。一次学習用と再学習用のデータセットの作成に要した約1時間に加え、ディープラーニングによる学習に4時間×2回を要し、合計9時間かかりました。ディープラーニングによる学習中は離席可能なため、Segment.aiを用いた場合、全ての液滴を手動で二値化した場合と比較して作業拘束時間を約1/19に削減できました。
- ※NVIDIA Quadro RTX 4000 8GB を使用
- 画像の取得、教師データの作成、学習モデルの構築、二値化、計測が1つの画像統合ソフトウェアNIS-Elements ARでシームレスに実施できます。

製品情報

正立顕微鏡 ECLIPSE Si

コンデンサーのスロットに暗視野スライダ*を装着し、斜光照明を使用することにより、標本で散乱した光を可視化できます。無染色でのエマルションやコロイド粒子の検査などに効果的です。スライダの着脱で暗視野と明視野を簡単に切り替えて観察できます。

*Siの暗視野スライダ対応の対物レンズは、NA0.65以下です。また、4倍以下の対物レンズは、暗視野観察非対応です。



顕微鏡AIモジュールNIS.ai (Segment.ai)

画像統合ソフトウェアNIS-Elements ARのNIS.aiモジュールは、ディープラーニングにより、画像処理や解析のワークフローを改善できます。NIS.aiのSegment.aiは、コントラストの低い液滴と背景とを識別できるため、従来の二値化では困難だった明視野画像からの定量解析が可能です。