総説

高速ビジョンによる微生物トラッキング顕微鏡

奥 寛雅¹, 尾川順子², 石川正俊¹¹東京大学大学院情報理工学系研究科²宇宙航空研究開発機構 月・惑星探査プログラムグループ

This paper describes a noble microscope system that can track a swimming microorganism in the center of view field using high-speed visual feedback. The target specimen was tracked by moving its container by a computer controlled XYZ-stage. Target position was extracted from images captured at 1000 fps by a high-speed vision system mounted on the microscope.

In this paper, the reason why such high-speed visual feedback is essential for the visual tracking function is discussed. Successful tracking of a freely swimming paramecium and a spermatozoa demonstrated validity of the tracking microscope.

tracking / motile cell / visual feedback / high-speed vision / microscope

1. はじめに

光学顕微鏡は、微小な空間で起こるダイナミックな生命活動を観察できるという大きな利点をもっており、生命研究において重要な計測手段の1つである。しかし、計測範囲に以下で述べる制限があるため、その操作は簡単ではない。

顕微鏡が計測できるのは、顕微鏡視野内で、かつその被写界深度内の領域であり、物体空間中でこれに対応するのは、直径数百ミクロン、厚み数ミクロンという非常に微小な円柱状領域の内部である。その微小さゆえに人間が見たい対象をこの領域内に移動させることは簡単ではない。特に対象が遊泳などにより移動を伴う場合には、対象が容易に計測範囲から外れてしまうため、継続的な計測はほぼ不可能になってしまう。

筆者らは、画像情報に基づいて光学系などを制御し、人間が観測しやすい映像を動的に生成するダイナミックイメージコントロールを提唱している。これを応用することで、顕微鏡計測範囲の制限はシステムとして解決できることが見込まれる。そこで、これまで顕微鏡応用を1つの主要なテーマとして研究してきた。中でも特に、運動する対象を継続的に観察可能なトラッキング顕微鏡を開発している。この顕微鏡は視野中心に運動対象を捕捉する機能をもつものであり、

これまで遊泳するゾウリムシやホヤ精子の運動計測に適用してきた。本論文では、トラッキング顕微鏡の仕組みとその計測可能性について、ゾウリムシとホヤ精子に適用した実例を交えて紹介する。

2. 高速ビジョン

最初に、ダイナミックイメージコントロールを支える基盤技術として高速ビジョンについて紹介する。高速ビジョン¹⁾は、画像センサの後段に画像処理部を直結したもので、センサにより取得した画像から対象の位置などの特徴を瞬時に抽出する装置である。画像の取得から処理・結果の出力までを1/1000秒で行うことができ、これまでロボット制御²⁾や3次元計測³⁾などでその有用性が実証されている。類似の装置として、高いフレームレートで動画画像計測を行う高速度カメラがあげられるが、これは記録した画像を後から人間が観察するためのものであり、画像処理部分がない点が高速ビジョンとは異なる。

3. 運動対象とトラッキング

遊泳する細胞など、移動を伴う対象を顕微鏡で計測する場合、対象が視野を占める割合と、対象を継続的

Microorganism Tracking Microscope Using High-Speed Vision System

Hiromasa OKU¹, Naoko OGAWA² and Masatoshi ISHIKAWA¹¹Graduate School of Information Science and Technology, The University of Tokyo²JAXA Space Exploration Center, Japan Aerospace Exploration Agency

に計測できる時間との間には、**図 1**に示すトレードオフの関係が存在する。対象を詳細に計測するためには、対象を視野全体で捕らえることが重要だが(**図 1a**)、従来は視野の一部での計測(**図 1b**)を余議なくされていた。この問題は対象を常に視野中心に補足することで解決できる。これを実現する顕微鏡をトラッキング顕微鏡とよんでいる。

このような顕微鏡システムは今から 40 年近く前の 1971 年に H. C. Berg によってすでに発表されている⁴⁾。これは *E. coli* を対象としたもので、顕微鏡に光ファイバと光電子増倍管、電動ステージを組み合わせ、対象を 3 次元的に追従するものであった。しかし、固定された 6 点の明るさのみで対象位置を計測していたために、対象が複雑な形状であったり高速に動いていると対応できないなどの問題点があった。

これに対し、画像センサを利用すると、大きさや形状・速度が異なる対象について同一のシステムでトラッキングを実現でき、汎用性に優れる。また 1 枚の像から対象の位置と画像とを同時に計測でき、微弱になりがちな光量を有効に利用できる。さらに高速ビジョンを用いると、短時間でトラッキングに必要な情報を計測できるため、対象を視野全体で補足することができる⁵⁾。

4. トラッキング顕微鏡

以上の考察に基づき、これまで数種類のトラッキング顕微鏡を構築してきた。ここでは最新の例として、後述するホヤ精子トラッキングを目的として構築したトラッキング顕微鏡の構成を説明する⁶⁾。

図 2a, bにそれぞれトラッキング顕微鏡のシステム

図 1 運動対象が視野を占める割合と観察時間との間のトレードオフ。(a) 対象を視野全体で詳細に計測可能だが、ごく短時間後に視野から外れてしまうために継続的な計測はできない。(b) 対象が視野を占める割合を小さくすることで継続的な観察が可能になるが、その代わり詳細な計測はできなくなる。

構成と外観写真とを示す。このシステムは光学顕微鏡、高速ビジョン、XYZ 自動ステージ、市販の PC 2 台からなる。高速ビジョンとステージの詳細は**表 1**に示す。

対象は遊泳可能な状態を保つような容器に入れられ、その容器は XYZ 自動ステージに固定される。対象の像は顕微鏡上の高速ビジョンで毎秒 1000 枚取得され、画像処理用 PC に転送される。この像から対象の位置が 1 ms 以内で抽出され、制御用 PC に転送される。同時に、画像処理用 PC は画像を記録することもできる。制御用 PC は対象が常に顕微鏡視野中心にくるようにステージを制御する。ステージの位置と視野内の対象の位置から、対象がプレパラート上の座標系でどのように動いたかがわかるため、対象の軌跡も記録される。

なお、ビームスプリッターを用いて他のカメラで同時に対象の像を計測することも可能である。

トラッキング顕微鏡は対象の運動に従って視野を移動できるため、ステージの可動範囲内すべてを高い解像度で計測可能である。たとえば光学倍率が 20 倍のときには高速ビジョンは実空間で 1 μm の解像度があるので、ステージの可動範囲である 25 mm 平方の領域を 25000 × 25000 画素、1000 fps のビジョンセンサで計測していることと等価である。

図 2 トラッキング顕微鏡システム接続図 (a) と外観写真 (b)。文献 6 の図を改変。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> ではカラーで掲載)

表 1 高速ビジョンとステージの仕様

高速ビジョン Profile Imager[12] (浜松ホトニクス)	— 画素数 232 × 232 (@1000 fps) — グレースケール、8-bit 階調
XYZ 電動ステージ 特注 (ヒーハイト精工)	— ストローク 25 mm (X, Y), 10 mm (Z) — 繰返位置決め精度 ± 1 μm — AC サーボモータ駆動

5. 実際のトラッキング結果の例

5.1 ゾウリムシの運動計測

遊泳するゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) を2次元的に追跡した結果^{*1}を図3に示す⁵⁾。ゾウリムシは150 μm 程度の体長をもち、1 mm/s程度の遊泳速度で泳ぐ。この実験では20倍の対物レンズを用いており、このときの高速ビジョンの視野幅は256 μm であったが、およそ6000 μm^2 の領域の運動を約80秒間にわたって計測できた。照明条件や光学倍率の変更にもソフトウェアの変更のみでトラッキングできることも確かめられている⁵⁾。

5.2 カタユレイボヤ精子の走化性計測

現在、東京大学大学院理学系研究科附属三崎臨海実験所の吉田学講師、柴小菊研究員と共同で、カタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) 精子の走化性の計測を目的として、トラッキング顕微鏡による精子運動の計測実験を進めている。

従来は走化性誘引物質を保持したキャピラリーを視野内に固定して、その周辺での精子の運動を計測していた⁷⁾が、これだと誘引物質から遠方でどのような挙動をしているのか、遠方から誘引源までどのように遊泳してきているのか、などの点が不明であった。そこで、トラッキング顕微鏡によって精子個体をトラッキングすることで、より広い空間における詳細な挙動を計測する試みを進めている^{6), 13)}。ホヤの精子は全長

図3 計測されたゾウリムシの像(a)とその軌跡(b)。軌跡中の円は1秒毎の位置を示す。この実験で用いた高速ビジョンは画像処理前の画像を外部に出力できなかったため、対象の像は顕微鏡に取り付けたCCDカメラで計測した。文献5の図を改変。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> ではカラーで掲載)

^{*1} 実験結果の動画は次のURLで公開されている。
<http://www.k2.t.u-tokyo.ac.jp/mvf/MicroorganismTracking/index-j.html>

約50 μm 、頭部長さ2-3 μm であり、鞭毛を1秒間に約50回という速い周波数で振りながら300 $\mu\text{m/s}$ 程の速度で泳ぐ。この遊泳速度は、頭部長さの150倍もの距離を1秒間に移動するということであり、仮に体長1.8 mの人間で考えると、ジェット旅客機並みの速度である972 km/hに相当する。

このように高速な対象もトラッキング顕微鏡で計測することができる。ここでは実際に走化性を計測した例を示す。図4aに示すような、誘引物質(SAAF)を含んだ寒天が容器の側面をなし、精子媒質中に誘引物質の1次元的な濃度勾配が形成されるようにしたプレパラートを用い、位相差法(20倍)を用いて精子の運動をトラッキング顕微鏡により計測した^{*2}。誘引源に向かって運動している精子の軌跡を図4bに、計測した精子像を図4cに示す。

6. 3次元トラッキング

これまで2次元でのトラッキングを紹介したが、3次元的に運動する対象の場合はすぐに焦点面から外れてしまって像がぼやけてしまい継続的な観測はできない。この問題を解決するためには、画面奥行き方向へもトラッキングをすることが必要になる。

これを実現する1つの手法として、ビームスプリッターで像を分割し、光軸方向に位置をずらした複数の

図4 (a) 走化性計測に用いたプレパラートの構造¹³⁾、(b) 誘引物質に対する応答の計測結果。Yが負の領域に誘引物質を含む寒天が存在する。比較のために視野の大きさをFOVと記した四角で示した。(c) トラッキングした状態で、高速ビジョン(1000 fps)により計測された精子像。コントラストを強調してある。頭部が常に画像中心に捕捉されていることがわかる。像の1辺は90 μm に相当する。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/> ではカラーで掲載)

^{*2} <http://www.k2.t.u-tokyo.ac.jp/mvf/SpermTracking/index-j.html>,
<http://www.k2.t.u-tokyo.ac.jp/mvf/3dTracking/index-j.html>

撮像面でのばけ量の相違から対象奥行き位置を計測する方法があり、1分子の運動計測^{8),9)}や微生物の3次元トラッキング¹⁰⁾への応用例が報告されている。この方法は汎用性が高いが、像を分割するために撮像素子あたりの光量が減ってしまうという欠点がある。像を分割せずに奥行き位置を推定する手法として、われわれはDepth From Diffraction (DFDi)という手法を開発した¹¹⁾。ケーラー照明などの平行光照明で球に近い形状の細胞を観察すると、焦点面から外れている細胞の周囲に回折縞が現れる。図5にゾウリムシの例を示す。この縞は細胞と焦点面との位置関係が反転すると明暗が反転し、また、細胞と焦点面との距離に応じて縞の幅が太くなる。つまり回折縞には細胞の奥行き位置情報が含まれている。DFDiは高速画像処理により細胞奥行き位置情報を回折縞から抽出することで、対象位置を推定する手法である。

実際に遊泳するゾウリムシにこの手法を適用して3次的にトラッキングすること^{*2)}も成功している¹¹⁾。この手法は通常の光学顕微鏡にカメラを1つ載せるだけで適用できるところに優位性があるが、照明方法が限定されてしまうところが難点である。

7. おわりに

本論文では高速な画像処理技術に基づくトラッキング顕微鏡の原理とその応用としてゾウリムシとホヤ精子への適用を例にあげて紹介し、大域的な運動と詳細な像とを同時に計測できることを示した。

高速な画像処理技術は従来の顕微鏡では不可能な計測を可能にするものであり、本稿で紹介したような運動する細胞の計測の他にも、動く対象像のぶれ補正などさまざまな応用用途の可能性があるので、今後も積極的に顕微鏡応用の研究を進めていく予定である。

図5 細胞の焦点面からのずれに伴う回折縞の例。細胞膜の屈折率が周囲の媒質に比べて特に大きいために、細胞の焦点面からの変位とその方向に依存した明暗の縞が発生する。(本図は、冊子体ではモノクロ、電子ジャーナル <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/bio-phys/> ではカラーで掲載)

謝 辞

本研究の実施にあたっては、基礎的な生物の知識のご教示から試料のご提供まで多くの生物系研究者の方々に大変お世話になりました。この場を借りて改めて感謝の意を表します。

文 献

- 1) 石川正俊 (1998) 応用物理 **67**, 33-38.
- 2) Senoo, T., Namiki, A. and Ishikawa, M. (2004) *Proc. IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation* 1191-1196.
- 3) 渡辺義浩, 小室 孝, 石川正俊 (2007) 電子情報通信学会論文誌 D **J90-D**, 3233-3245.
- 4) Berg, H. C. (1971) *Rev. Sci. Instrum.* **42**, 868-870.
- 5) Oku, H., Ogawa, N., Hashimoto, K. and Ishikawa, M. (2005) *Rev. Sci. Instrum.* **76**, 034301.
- 6) Oku, H., Ogawa, N., Shiba, K., Yoshida, M. and Ishikawa, M. (2008) *Proc. Int. Conf. IEEE EMBC* 125-128.
- 7) Yoshida, M., Murata, M., Inaba, K. and Morisawa, M. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14831-14836.
- 8) Watanabe, T. M., Sato, T., Gonda, K. and Higuchi, H. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 1-7.
- 9) Toprak, E., Balci, H., Blehm, B. H. and Selvin, P. R. (2007) *Nano Lett.* **7**, 2043-2045.
- 10) 島津宝浩, 辻 徳生, 山本健吉, 石井 抱 (2006) 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 '06 講演論文集 2A1-C11.
- 11) Oku, H., Ishikawa, M., Theodorus and Hashimoto, K. (2006) *Opt. Express* **14**, 3952-3960.
- 12) Sugiyama, Y., Takumi, M., Toyoda, H., Mukozaka, N. and Ihori, A. (2005) *IEEE ISSCC Digest of Tech. Papers* **1**, 360-361.
- 13) 柴 小菊, 奥 寛雅, 尾川順子, 石川正俊, 吉田 学 (2008) 第60回日本動物学会関東支部大会 **36**.

奥 寛雅

奥 寛雅 (おく ひろまさ)

東京大学大学院情報理工学系研究科助教
研究内容: ダイナミックイメージコントロール, 特に顕微鏡の高機能化と高速光学デバイス開発.
連絡先: 〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1
E-mail: Hiromasa_Oku@ipc.i.u-tokyo.ac.jp

尾川順子 (おがわ なおこ)

宇宙航空研究開発機構月・惑星探査プログラムグループ宇宙航空プロジェクト研究員
研究内容: バイオロボティクス, 宇宙機の航法誘導制御.
連絡先: 〒229-8510 神奈川県相模原市由野台 3-1-1
E-mail: naoko.ogawa@isas.jaxa.jp

石川正俊 (いしかわ まさとし)

東京大学大学院情報理工学系研究科教授
研究内容: 超並列・超高速ビジョン, センサフュージョン, メタ・パーセプション.
連絡先: 〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1
E-mail: Masatoshi_Ishikawa@ipc.i.u-tokyo.ac.jp
URL: <http://www.k2.t.u-tokyo.ac.jp/>