暗視野顕微鏡法におけるクラミドモナスの三次元トラッキング

荒井 祐介^{*1} 若林 憲一^{*2} 吉川 雅英^{*3}
奥 寛雅^{*1} 石川 正俊^{*1}

Three-Dimensional Tracking of *Chlamydomonas* in Dark Field Microscopy

Yusuke Arai^{*1}, Ken-ichi Wakabayashi^{*2}, Masahide Kikkawa^{*3},
Hiromasa Oku^{*1} and Masatoshi Ishikawa^{*1}

Recently, flagella and cilia have gathered attention since their important role in mammal cells and relation to genetic diseases of human were revealed. *Chlamydomonas* is one of the model organism of flagella and phototaxis research. The purpose of our research is to track a freely swimming individual *Chlamydomonas* cell to observe its flagella and whole body movement with dark field microscopy to investigate the phototactic reaction of *Chlamydomonas*. In this paper, a method for three-dimensional tracking of *Chlamydomonas* using high-speed visual feedback in dark field microscopy is proposed. The method was implemented to an existing microscope tracking system. It demonstrated successful three-dimensional tracking of a swimming *Chlamydomonas* for several tens of seconds. The precisions of the 3D position measurement were estimated as $\pm 1 [\mu\text{m}]$ (XY) and $\pm 10 [\mu\text{m}]$ (Z).

Key Words: Tracking, Motile Cell, Microscope, Visual Feedback

1. 序 論

1.1 背景

生物医学分野では、光学顕微鏡を用いて運動する対象を観察する場合がよくある。例えば遺伝子工学で非常によく用いられる大腸菌や、生殖で重要な精子のように、顕微鏡視野内でみかけ上高速に運動するものも観察の対象となる。それらの遊泳速度は非常に速く、一秒間に自身の体長の50倍もの距離を移動するものもある[1]。これは人間のスケールに置き換えると、1.7[m]の人が時速約300[km]で移動することに相当する。このような動きを伴う微生物を観察してダイナミクスの詳細を解析するためには、微生物を追跡し、視野内にフォーカスが合った状態で常に捉え続けることが重要である[2]。しかし、顕微鏡の視野は有限であり、さらにはフォーカスが合う範囲である被写界深度[3]が非常に浅い。そのため、これらを顕微鏡で観察しても対象がすぐに視野から外れたり、フォーカスが外れてしまい、個

体の継続的な観察は不可能であった。

この問題点を解決するために、移動する観察対象の物体に自動的にフォーカスを合わせるための研究が数多くなされてきた。F.C.A. Greonらは、焦点位置を移動しながら複数枚の画像を計測し、その画像に含まれる空間周波数の成分を計測することで合焦位置を判断する手法を提案した[4]。しかし、この手法ではオートフォーカスに最短でも1秒程度の時間が必要であり、一秒間に体長の何倍もの距離を移動する微生物をリアルタイムに追跡するには遅過ぎる。

また、島津らは、二台の高速メガピクセルビジョンシステム[5]を用いて対象の奥行き位置を推測する技術を開発した[6]。これは、観察対象や観察方法に大きく依存することなくリアルタイムにトラッキングできるというメリットはあるものの、1台の高速ビジョンに入る光量が減ることで視野が暗くなってしまうというデメリットを抱えている。

そこで、奥らは高速ビジュアルフィードバックを用いてこのような遊泳対象を視野中央に二次元的にトラッキングする微生物トラッキング顕微鏡を研究・開発した[7]。この手法は対象を細胞に限定し、細胞を平行光で照明した際にその背後にできる干渉パターンを計測することで、焦点面と細胞の奥行き方向の位置関係を1枚の画像から推定するものである。さらに、平行光照明下における単眼高速オートフォーカス手法としてDepth From Diffraction (DFDi)法を提案し[8]、これと二次元トラッキングとを組み合わせることで細胞の三次元トラッキングを実現し

原稿受付 2013年4月19日

^{*1}東京大学大学院情報理工学系研究科

^{*2}東京工業大学資源化学研究所

^{*3}東京大学大学院医学系研究科

^{*1}Graduate School of Information Science and Technology, The Univ. of Tokyo

^{*2}Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology

^{*3}Graduate School of Medicine, The Univ. of Tokyo

■ 本論文は有用性で評価されました。

■ J-STAGE では本論文の電子付録として動画が閲覧できます。

た [8]. しかし, DFDi 法は明視野顕微鏡法の下で利用することを想定されたものであり, 他の観察法にそのまま適用することはできない. 特に, 試料の染色などを必要とせずにより微細な細胞を観察できる点で有用な暗視野顕微鏡法に関しては, 未だ三次元トラッキングをするための手法は確立されていない.

そこで, 本研究では暗視野顕微鏡法において, 遊泳する細胞であるクラミドモナス [9] の奥行位置を 1 枚の画像からリアルタイムに推定する画像処理手法を提案する. 本手法は, 対象となる細胞が焦点面から光軸に沿って移動する際の暗視野像変化に関して, 焦点面付近で細胞周辺の画素値の分散と移動方向との間に相関があることを利用して奥行位置推定を行うものである. また, 実際に既存のトラッキング顕微鏡システムに組み込むことで, 三次元トラッキングが可能かを確認するとともに, 提案手法を含めたトラッキングシステム全体の位置計測精度も実験により確認する.

1.2 本研究の有用性

クラミドモナスは藻の一種であり, 鞭毛のメカニズムや走性の研究を目的とするモデル生物として用いられることが多い [10]. そのため, 様々な観察法の下で合焦した状態で継続して観察する手法が求められている.

鞭毛のメカニズムは古来から多くの科学者の関心事であったことに加え, 近年人間の遺伝病にも関係していることが判明し, 科学的に興味深いだけでなく医学的にもその重要性が認識され急速に注目を集めている対象である. また, クラミドモナスは光刺激に反応して特定の方向に移動する走光性 [11] という性質をもっていることから走光性に関する研究対象としても重要である. クラミドモナスの走光性を計測する場合にはその眼点という組織を観察できることが重要であり, 鞭毛や眼点を詳細に観察するためには, 観察法として暗視野顕微鏡法が適している. 以上の理由により, 暗視野顕微鏡法において遊泳するクラミドモナスを三次元トラッキングができることは有意義であり, 本研究では特にクラミドモナスを対象として三次元トラッキング手法を研究・開発した.

2. 暗視野顕微鏡法における三次元トラッキング

細胞の三次元トラッキングのためには, 対象の三次元位置, つまり画像面内の二次元的な位置に加え一次元の奥行き方向位置の認識が重要となる. 画像内の位置は画像処理によって細胞像位置を抽出することで容易に推定可能であるが, 奥行き方向の位置推定は単純には行えず, ここに研究が必要となる.

ここでは, 暗視野顕微鏡法で観察した際の細胞のデフォーカス像の特徴と奥行位置推定のためのアプローチを述べる. まず, 比較のため Fig. 1 に明視野観察でゾウリムシを観察した結果 (a) と, クラミドモナスを位相差法で観察した結果 (b) および暗視野顕微鏡法で観察した結果 (c) を示す.

おのおのの画像において, 中央が合焦時のもの, 左側が対象を対物レンズから遠ざける方向 (以下 z 正方向とする) にデフォーカスした際の像, 右側が反対に対物レンズに近付ける方向 (同負方向) にデフォーカスした場合の像である. (a) ではデフォーカスすると細胞の周囲に明るい縞と暗い縞が現れ, その順序がデフォーカスする方向に依存していることが分かる. DFDi 法

Fig. 1 Comparison of defocused images depending on the observation method, bright field (a), phase contrast (b), and dark field (c)

はこれらの縞を検出して対象の奥行き方向位置を推定する手法である. 一方, (b) の位相差観察や (c) の暗視野観察法では, デフォーカスの方向による多少の違いはあるものの, 回折縞の明暗が逆転するような認識しやすい特徴は存在しない.

そこで暗視野顕微鏡法における細胞デフォーカス像が奥行き位置推定に有効な特徴を持つかどうかを調べるために, 奥行き位置を変えながら複数のクラミドモナスの像をスキャンし, 記録した. そこから得られた知見は以下のとおりである.

- z 正方向にデフォーカスすると細胞の中心部分が最も明るくなっている. すなわちデジタル画像における画素値が細胞中心では外側よりも大きい値をとる.
- z 正方向から負方向へとスキャンしていくと, 最も明るい部分が徐々に中心から外側へと移って行き, 遂には細胞の外周部が最も明るくなる.

以上の特徴と, デジタル画像では明暗を単純に画素値の大小で表すことができることより, 暗視野観察で得られた画像内に存在するある細胞周辺の画素値の分散は, z 正方向では小さい値をとり, そこから負方向に行くに従い一定の割合で大きくなると考えられ, これが奥行き推定の手がかりとなることが予想される.

デフォーカスによるボケを含む画像を対象とする多くの先行研究では, ボケるという現象を合焦画像にボケのカーネルを畳み込むモデルで記述しており, この時のボケのカーネルはデフォーカスの方向にはよらないとしている. この記述は物体の異なる位置から発せられる光が互いに相関がなく, 非干渉的であるとする仮定に基づいている. しかし, 顕微鏡下で照明された物体は完全に非干渉的とはいえず, この仮定は完全には成り立たないため, 物体中にはないフーリエ成分が像の中に現れてくるような場合が十分考えられる [12]. 特に細胞は半透明であるため光の屈折も含んだ複雑な振る舞いを見せる場合が多く [8], これがクラミドモナスの暗視野像でデフォーカス像に非対称性が存在する理由として考えられる.

3. 提案手法

以上の考察に基づいて、画素値の分散と奥行位置との関係を線形モデルで表現できると仮定し、その係数を最小二乗法によってあらかじめ求めることで、細胞の奥行位置を推定する手法を提案する。具体的には、細胞の画素値の分散および共分散を各成分とする二次正方分散共分散行列の固有値から線形回帰によって細胞の奥行を推定する手法である。

3.1 具体的な奥行位置の算出方法

はじめに、細胞中心まわりの画素値の分散、すなわち二次モーメントの導出法を述べる。まず細胞の中心位置を求めるため、適当な閾値で二値化した細胞画像の重心を式 (1), (2) により求める。以下では、 x, y をそれぞれ対象画素の x 座標と y 座標の値とし、 $I(x, y)$ を対象画素の画素値、 $I_B(x, y)$ を二値化した後の各画素の画素値とする。

$$\bar{x} = \frac{\sum_x \sum_y x I_B(x, y)}{\sum_x \sum_y I_B(x, y)} \quad (1)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_x \sum_y y I_B(x, y)}{\sum_x \sum_y I_B(x, y)} \quad (2)$$

ここで、 $\bar{x}, \bar{y}$ は二値化した画像における細胞の重心の x, y 座標の値であり、和をとる x, y の範囲は二値化後に細胞であると判断された領域である。二値化した画像から重心を求めたのは、画素値をそのまま用いて重心を求めると、細胞の中心まわりの分散を調べたいのにもかかわらず重心が中心位置から細胞内の明るい部分へと寄ってしまい、期待する値を算出できないからである。

これらの値を用いることにより、重心まわりの二次モーメント $M_{xx}, M_{yy}, M_{xy}, M_{yx}$ を式 (3)~(5) よりそれぞれ算出する。

$$M_{xx} = \sum_x \sum_y (x - \bar{x})^2 I(x, y) \quad (3)$$

$$M_{yy} = \sum_x \sum_y (y - \bar{y})^2 I(x, y) \quad (4)$$

$$M_{xy} = M_{yx} = \sum_x \sum_y (x - \bar{x})(y - \bar{y}) I(x, y) \quad (5)$$

ここで、和をとる x, y の範囲は細胞の重心まわり 21×21 ピクセルの正方形としている。これは、平均的な大きさのクラミドモナス一個体が完全に収まる範囲であり、かつ合焦位置から z 軸正方向に少しずれた場合暗視野像が多少広がりをもつことを考慮し、少し大きめに設定している。

さらに、照明の強度へ依存しないようにするために式 (3)~(5) で求められる値を重心まわりの 0 次モーメント M_{00} で割ることで正規化する。0 次モーメントは式 (6) により求められる。

$$M_{00} = \sum_x \sum_y I(x, y) \quad (6)$$

すなわち、正規化した二次モーメントは以下のように表せる。

$$M'_{xx} = \frac{M_{xx}}{M_{00}} \quad (7)$$

$$M'_{yy} = \frac{M_{yy}}{M_{00}} \quad (8)$$

$$M'_{xy} = M'_{yx} = \frac{M_{xy}}{M_{00}} = \frac{M_{yx}}{M_{00}} \quad (9)$$

また、クラミドモナスはよく回転運動を行うことがあるが、クラミドモナスがほぼ球形と見なせる場合には回転運動の影響を無視できるため、これらの値をそのまま画素値の分散として用いることができる。しかし、だ円形に近い場合、細胞の回転により xy 座標間に相関が発生してしまい、回転不変の分散の値を得ることができなくなってしまう。そこで、楕円形をしたクラミドモナスの長軸相と短軸の一方が x 軸あるいは y 軸となるような、 xy 座標間の相関を取り除いた空間に写像することを考える。具体的には、 $M'_{xx}, M'_{yy}, M'_{xy}, M'_{yx}$ を各成分とする二次正方分散共分散行列の固有値を画素値の分散として、この値から奥行位置を推定する。分散共分散行列は式 (10) のようになる。

$$\Sigma = \begin{pmatrix} M'_{xx} & M'_{xy} \\ M'_{yx} & M'_{yy} \end{pmatrix} \quad (10)$$

本手法ではこの行列の二つの固有値 λ_1 と λ_2 のうち、小さいほうの値を独立変数、奥行位置を従属変数として線形回帰を行う。小さいほうの値を利用したのは、細胞同士の衝突などによる急激な分散の変化の影響を抑えるためである。回帰の式は、具体的には式 (11) のようになる。

$$z = \beta_0 + \beta_1 \min(\lambda_1, \lambda_2) + \epsilon \quad (11)$$

式 (11) から、以下の手順で奥行推定式を決定する。

まず、固定した細胞を光軸方向にそって上下に走査しながらその像を計測し、その奥行位置と画像から得られた固有値 $\min(\lambda_1, \lambda_2)$ との組を複数の個体について抽出する。次に、これらの計測値と最小二乗法により切片 β_0 と係数 β_1 を求める。最後に、式 (11) において $\epsilon = 0$ とすることで奥行位置推定式が得られる。

Fig. 2 Recognition algorithm flowchart of cell populations. Photo cell is yeast. Adapted from Ref. [13] Fig. 4. with permission

3.2 境界追跡による細胞認識

細胞の奥行き推定をするためには、最初に個々の細胞の中心位置を認識する必要がある。そのために境界追跡によって細胞個体を認識し、その画像中での位置を抽出するアルゴリズムを用いた [13]。

Fig. 2 に細胞個体を認識するアルゴリズムの流れ図を示す。取得した像 (A) は利用者が指定する閾値で二値化される (B)。次に画面の左上からラスタスキャンをしながら物体を示す画素を探索し、発見した画素を起点に細胞の境界を探索する。一つの細胞の境界を検出したところで、発見した境界内部を探索済みとし、その細胞と対応付けたラベルを割り振るとともに、その面積や重心位置を記録する。再度未探索の領域から同様の作業を行い、画面全体を探索し終えたら、画面内の物体すべての面積と位置のリストが得られる。細胞奥行き位置の推定は、このアルゴリズムから得られる細胞位置情報を基に行った。

4. トラッキング顕微鏡システム

本章では実験で用いる、顕微鏡トラッキングシステムの詳細を述べる。

本システムは光学顕微鏡、高速ビジョン、XYZ 自動ステージおよび 2 台の計算機から構成される。これらをの構成を **Fig. 3** に示す。

対象は遊泳可能な状態を保つようなプレパラートに保持され、そのプレパラートは XYZ 自動ステージに固定される。対象の視野内における位置は容器を自動ステージによって移動することで制御し、常に視野中心、被写界深度内にくるようにすることでトラッキングを実現する。

対象を含む培養液はスライドガラス上に滴下され、その上から端にワセリンを少量塗布したカバーガラスを載せたプレパラートを作成する。ワセリンは、スライドガラスとカバーガラス間の支えとなって微小な間隙を維持し、対象が自由に泳げる空間を確保する。間隙は十分小さいため、培養液自体の粘性により培養液全体がプレパラートに対して相対的に静止しているとみなせる状態になり、容器の移動に伴う培養液の攪拌などが起こらないようになっている。

対象の像は暗視野顕微鏡（対物レンズ倍率 20 倍）により拡大されて高速ビジョンに投影される。高速ビジョンとして浜松ホトニクス製の Profile Imager [14] を用いた。このビジョンはグ

レースケール 8bit 階調、画素数 232×232 の画像を 1,000 [fps] で取得することができるものである。これが光学顕微鏡に取り付けられ、対象の拡大像を撮像する。

撮像された画像は画像処理用の計算機にリアルタイムに転送される。画像処理用の計算機は、送られてきた画像を処理して対象の位置の抽出や奥行き位置の推定を行い、さらに画像をそのままメモリ内に保存することで高フレームレートの動画を録画する高速カメラとしての機能も担う。抽出した対象位置は制御用の計算機に送信される。

制御用計算機は送られてきた対象位置に基づいて、その対象が視野中心にくるように XYZ 自動ステージ位置を制御する。最終目標である微生物トラッキングのためには、細かく運動する対象にあわせて滑らか、かつ高速にプレパラートを移動させる必要があり、AC サーボモータを用いた FA 用ステージを採用した。各軸のストロークは 25 [mm] (X,Y), 10 [mm] (Z) で、繰り返し位置決め精度はすべて $\pm 1 [\mu\text{m}]$ である。本ステージを含む上記システムを用いて構築した位置制御器は、およそ 50 [Hz] までほぼフラットな応答を持つことが予備実験より分かっている [16]。

また、本システムは上記の自動ステージとは別に、手動で動かすことのできるステージも備えている。両ステージは独立に動かすことができ、システムによる自動トラッキングを行っていない時には、手動ステージによりフォーカスの合い具合を微調整することもできる。

5. 実 験

提案手法を実装したトラッキング顕微鏡システムを用いて実験を行った。まず、奥行き位置推定式の未定係数を具体的に決定するための実験を行った。それに基づき、トラッキングシステム全体の位置計測精度評価実験と、実際に動きまわる対象を暗視野顕微鏡法の下で三次元トラッキングする実験を行った。本節ではそれぞれの実験の詳細について述べる。

5.1 奥行き位置推定式決定実験

3 節式 (11) の未定係数を具体的に求めることにより、奥行き位置推定式を決定する。静止しているクラミドモナスについて、電動ステージを制御して奥行き位置をスキャンしながら撮像・記録した画像系列を計測したものを複数個体分用意し、サンプルとした。一個体について、記録した各画像から算出した固有値を横軸に、奥行き位置を縦軸にプロットしたものを **Fig. 4** に示す。

この結果は線形モデルになるという仮説と大きく異なっているように見える。しかし、焦点面付近である $-5 [\mu\text{m}] < z < 5 [\mu\text{m}]$ の範囲に限って見ると、**Fig. 5** のように概ね線形に分布している。

よってこの範囲において線形回帰することとする。なお、**Fig. 5** の上部において離散的な値をとっている箇所があるが、これは 200~300 [nm] 程度と極々細い鞭毛が見える範囲であり、その鞭毛が見え隠れするためこのような挙動をしていると推測できる。

記録した画像から焦点面付近の線形となっている範囲を抜き出し、最小二乗法を用いて奥行き位置推定式の切片 β_0 と係数 β_1 を求めた。その後、複数の個体から導出した各値の平均をとり、推定式を決定した。

次に、提案した手法がトラッキングに十分な推定精度を持ち、暗

Fig. 3 System connection diagram

Fig. 4 Eigenvalue(horizontal axis) versus depth position of *Chlamydomonas* (vertical axis)

Fig. 5 Close-up plot near the focal plane

視野顕微鏡法におけるクラミドモナスの奥行位置推定手法として妥当であるかを確認した。ある静止しているクラミドモナスについて、電動ステージによって奥行位置を $-12 [\mu\text{m}] < z < 12 [\mu\text{m}]$ まで等速で移動しながら 6,000 フレームの画像を記録し、それぞれの画像について提案した手法を用いて奥行位置を推定した。実際の奥行位置を真値とし、それと推定した奥行位置との関係を Fig. 6 に示す。なお、単一の個体から得たデータであり、図中の実線は焦点面を表す直線、一点鎖線は奥行位置と推定値が一致する場合の直線である。

これから、次のことが分かる

- 全体を見ると放物線のような形を示しているが、局所的に見ると $-5 [\mu\text{m}] < z < 5 [\mu\text{m}]$ では概ね線形に分布している。
- $-5 [\mu\text{m}] < z < 5 [\mu\text{m}]$ 以外の範囲の多くでは実際の奥行位置と推定値との間で無視できない程度の差がある
- 奥行位置 z が正の値の時は推定値の多くも正の値をとっているが、約 $-7.5 [\mu\text{m}] > z$ になると奥行位置が負にもかかわらず推定値が正の値をとる。

焦点面付近に限るとほぼ線形に分布しているので、ある程度良い精度で奥行推定ができる。それ以外の範囲では正しく推定できていないとは言えないが、対象をトラッキングするためだけでは焦点面付近での推定さえできれば問題はなく、必ずしも厳密な奥行位置を知る必要はない。例えば、対象が合焦する位置にあるのであれば移動せず、上であれば対象を一定の微小

Fig. 6 True depth position(horizontal axis) versus estimated depth position (vertical axis)

距離上に移動させる、という手順を繰り返せば最終的には対象が合焦する位置に来ることになる。この時重要なのは、合焦しているのか、上にあるのか、下にあるのかの3点を区別することである。より正確に区別するためには、焦点面からのずれを人が像に基いて手で修正しなければならない。Fig. 6 中の点線が補正した焦点面である。補正後には、 $-4 [\mu\text{m}] < z < 5 [\mu\text{m}]$ の範囲で線形となり、 $z > -5 [\mu\text{m}]$ で対象奥行位置と推定値との符号が一致する。

以上の考察から推定結果の特徴を考えると、 $z > -5 [\mu\text{m}]$ の範囲では対象が合焦しているのか、合焦していないのであれば、どちらの符号の向きにずれているのかを知ることができるため、トラッキングに最低限必要な情報を得ることができる。さらに、 $-4 [\mu\text{m}] < z < 5 [\mu\text{m}]$ の範囲では、ほぼ線形に推定値が分布しているため、対象の奥行位置と合焦する位置との差にほぼ比例した値が、トラッキングエラーとして得られることになる。つまり、真の誤差の定数倍がトラッキングエラーとなることになり、これはトラッキング制御系においてフィードバックゲインを変更することに等しい。多少のフィードバックゲイン変化はフィードバック制御系により吸収されてトラッキング動作には余り影響を与えないので、これは大きな問題にはならない。そのため、提案手法を用いることでトラッキング可能であると期待できる。

ただし、三番めに挙げた特徴である奥行位置の符号誤りはトラッキングにおいては大きな問題になる。なぜならば、符号が逆転してしまうと本来移動させるべき向きとは逆方向に対象を移動させることになり、対象が合焦する位置から大きく外れ、トラッキングが破綻するからである。これを避けるためには、対象が $z < -5 [\mu\text{m}]$ の領域に存在しないようにする必要がある。

以上より、本手法は暗視野顕微鏡法の下で細胞をトラッキングすることが可能な性能を有していると期待できる。

5.2 トラッキング実験

提案した手法を用いて、クラミドモナスを暗視野顕微鏡法下で三次元トラッキングすることができるかを確認することを目的とした実験を行った。同時に、暗視野顕微鏡法下で特に観察できる、クラミドモナスの眼点や鞭毛などの組織が詳細に観察できるかも確認した。

Fig. 7 Captured image sequence of swimming *Chlamydomonas* while tracking

対象の二次元位置は第 3.2 節で述べた細胞個体認識アルゴリズムによって取得し、奥行位置は提案手法を用いて推定した。推定した奥行位置から、対象が常に視野中心・被写界深度内にあるように電動ステージをフィードバック制御して三次元トラッキングを行った。具体的には、対象が常に視野中央、かつ焦点面上にくるように制御目標を与え、それに追従するように電動ステージを PID 制御を用いて制御した。この時、対象の高精細な観測と安定したトラッキングのためには、視覚フィードバックの高速性は非常に重要である [7] [15]。また、電動ステージの三軸の位置情報と、画像内での対象位置を計算機で同時に記録しているため、対象がスライドガラス上でどのように移動したのかを計測することができる。

実際に三次元トラッキングを試みた際に撮像した画像を、連続写真として **Fig. 7** に示す。対象が常に視野中心に位置しているため、平面内のトラッキングは問題なくできていることが確認できる。また、細胞内の組織も確認できるので、提案手法による奥行方向のトラッキングも成功していることが分かる。連続写真では分かりにくい、動画では鞭毛運動も詳細に確認することができ、眼点らしき組織も部分的に確認できる。ただ、多少のフォーカスのずれが見られることと、クラミドモナスが遊泳時に螺旋運動していることから、動画でも簡単に眼点を観察することはできない。クラミドモナスの動きとフォーカスのずれのタイミングから、ずれは恐らくクラミドモナスの鞭毛運動に起因していると考えられる。

また、**Fig. 7** を見ただけでは実際に細胞が奥行方向に移動しているか確認はできない。そこで、**Fig. 8** に約 50 秒間追跡した際のステージの X 位置と Z 位置および Y 位置と Z 位置の関係をそれぞれ示す。

この図から、対象は平面方向だけでなく、奥行方向にも移動していることが分かり、また追跡も行えていることが確認できる。計測対象の位置情報を 1 [ms] ごとに記録できるため、十分な時間分解能で遊泳軌跡を知ることができ、速度や曲率など様々な情報を定量的かつ高精度に得ることができる。複数の個体について数多くの試行を行った結果、トラッキング始動時の推定が成功した場合は 1 回の試行で 10 秒程度から 1 分半超程度に渡り、継続的に追跡することができた。また、トラッキングを行いながら録画した動画画像をクラミドモナスを専門に研究する研究者に見てもらい、実験に適用できる品質に達していること

Fig. 8 Relation between stage positions of lateral (XY) direction and axial (Z) position while tracking

を確認した。

5.3 位置計測精度評価実験

トラッキング実験の成功からトラッキングが可能であることは示されたが、その三次元位置計測の精度は不明である。そこで、三次元トラッキング顕微鏡システム全体が有する位置計測精度を評価することを目的とした実験を行った。

なお、トラッキング以前の問題として、ビジョンが計測している画像が含む歪みの誤差と、プレパラート内部の液体の流動による対象-プレパラート間の位置ずれ誤差が存在し、それも計測精度に影響を与えるが、これらの誤差はすべてトラッキング動作による位置誤差に対して十分小さいことが確認されている [16]。

位置計測精度を評価するためには、対象の正確な位置を真値とし、これと本システムによって計測された奥行位置を比較することが好ましい。しかし、プレパラート容器内の高速に動く微生物の位置を、1 [μm] 以下のオーダーで正確に知る手段は存在しない。そこで、自動ステージのエンドエフェクター内の微生物が動くかわりに、自動ステージ全体を人間が動かし、擬似的に微生物が動いているときと同様の動作を行わせて位置計測精度を評価することとした。この方式は、微生物が動く場合と幾何学的な関係は対応しているが、動力学的には異なる動作を行っていることになる。しかし、微生物の動きが微小であることを考えると実際の精度に準ずる値が得られると考えられる。

具体的には、静止している対象をトラッキングしている状態で、自動ステージの根本に取り付けられている XYZ の手動ステージを動かすことで自動ステージ全体を動かし、それにどのように応答するのかを計測することで評価を行った。手動ステージの位置は反射型のレーザ変位計 (LC2430, Keyence) で手動ステージに固定した光学鏡までの距離を計測することでその位置を計測し、これを比較すべき真値とした。静止している鏡を用いた予備実験からその計測値の標準偏差は 0.12 [μm] であった。

静止している細胞を対象として、あるフレームにおいて推定された細胞位置を真値と比較することとする。評価は画像面内方向と画像奥行方向の二つに分けて行う。

まず、画像面内方向、特に Y 方向について、上記の通り実験を行った。その際の測定誤差を **Fig. 9** に、入力をレーザ変位計により得たステージ位置 $u_y(t)$ 、出力を細胞の測定位置 $v_y(t)$ と

Fig. 9 Measurement error of lateral (Y) direction. Input and measured position are shown in upper plot, and measurement error in lower

Fig. 10 Frequency response of lateral (Y) direction. Gain ($|G_y|$, upper) and Phase ($\angle G_y$, lower)

したときの周波数応答を **Fig. 10** に示す。ここで、周波数応答 $G_y(e^{j\omega})$ は、出力の離散時間フーリエ変換 V_y と入力 of 離散時間フーリエ変換 U_y とから次の関係を用いて求めた。

$$G_y(e^{j\omega}) = V_y(e^{j\omega})/U_y(e^{j\omega}) \quad (12)$$

Fig. 9 の上の図では、時系列ごとの細胞位置 (点線) とシステムが測定した細胞位置 (実線) を示し、下の図では、それらをとって測定誤差を示している。測定誤差はおおよそ $-1 [\mu\text{m}]$ から $1 [\mu\text{m}]$ の範囲におさまっており、大きく誤推定をしていないことが分かる。また、**Fig. 10** では、周波数応答のゲインと位相遅れを示している。クラミドモナスは $2, 3 [\text{Hz}]$ の螺旋運動をしており、その帯域でゲインが 1 、位相遅れが $0 [\text{rad}]$ に近いので、実際に細胞が動いている場合でも推定可能であると考えられる。また、今回は手動でステージを動かしたため、その動きにはただか $10 [\text{Hz}]$ 程度の周波数しか含まれていない。そのため、それ以上の帯域では入力信号に対してノイズが支配的であり、今回の実験ではおおよそ $10 [\text{Hz}]$ 以上の高周波成分の応答について確認することはできなかった。

Fig. 11 Measurement error of axial (Z) direction. Input and measured position are shown in upper plot, and measurement error in lower

Fig. 12 Frequency response of axial (Z) direction. Gain ($|G_z|$, upper) and Phase ($\angle G_z$, lower)

次に、画像奥行方向についても同様の実験を行った。画像面内方向と同様に結果を **Fig. 11** と **Fig. 12** に示す。

画像奥行方向では $-5 [\mu\text{m}] \sim 7.55 [\mu\text{m}]$ 程度の測定誤差を含んでおり、最大値をとった場合はクラミドモナスの体長 ($10 [\mu\text{m}]$) 弱分フォーカスがずれていることになる。しかし、測定誤差が大きくなるのはステージを急に動かした場合であり、それ以後はステージ移動中でも約 $-2 [\mu\text{m}] \sim 2 [\mu\text{m}]$ の範囲に誤差が収まっていることが確認できる。このことから、微生物が一般的な運動をしている時にはある程度良い精度で測定できると考えられる。

6. 結 論

本論文では、暗視野顕微鏡法において、遊泳するクラミドモナスの奥行位置をそのデフォーカス像が持つ特徴から推定する手法を提案した。その手法を、既存のトラッキング顕微鏡システムに組み込むことにより、奥行位置をほぼ合わせた状態で遊泳するクラミドモナスを三次元的にトラッキングすることに成功した。また、システム全体の位置計測精度評価実験も行い、奥行方向の計測では数 μm 程度の位置計測精度を実現していることを確認し、その有効性を示した。

参 考 文 献

- [1] H.C. Berg: "How to track bacteria," Review of Scientific Instruments, vol.42, no.6, pp.868-871, 1971.
- [2] H. Oku, I. Ishii and M. Ishikawa: "Tracking a protozoan using high-speed visual feedback," Proc. of 1st Annu. Int. IEEE-EMBS Special Topic Conf. on Microtechnologies in Medicine and Biology, pp.156-159, 2000.
- [3] H. Merklinger: The ins and outs of focus: an alternative way to estimate depth-of-field and sharpness in the photographic image. Seaboard Publishing, 1990.
- [4] F.C.A. Groen, I.T. Young and G. Ligthart: "A comparison of different focus functions for use in autofocus algorithms," Cytometry, vol.6, no.2, pp.81-91, 2005.
- [5] I. Ishii, K. Kato, S. Kurozumi, H. Nagai, A. Numata and K. Tajima: "Development of a mega-pixel and milli-second vision system using intelligent pixel selection," 2004 1st IEEE Technical Exhibition Based Conf. on Robotics and Automation, pp.9-10, 2004.
- [6] 島津宝浩, 辻徳生, 山本健吉, 石井抱: "2 台の高速ビジョンによる顕微鏡下での 3 次元対象追跡システム", ロボティクス・メカトロニクス講演会講演概要集, 2006.
- [7] H. Oku, N. Ogawa, M. Ishikawa and K. Hashimoto: "Two-dimensional tracking of a motile micro-organism allowing high-resolution observation with various imaging techniques," Review of scientific instruments, vol.76, no.3, 034301, 2005.
- [8] Theodor H. Oku, M. Ishikawa and K. Hashimoto: "High-speed autofocusing of a cell using diffraction pattern," Optics Express, vol.14, no.9, pp.3952-3960, 2006.
- [9] 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻分子生理学研究室: クラミドモナスについて, <http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/users/seiri/research.html>.
- [10] 高橋裕一郎, 福澤秀哉: "モデル生物として注目される緑藻クラミドモナス", 蛋白質核酸酵素, vol.45, no.12, pp.1937-1945, 2000.
- [11] K. Wakabayashi, Y. Misawa, S. Mochiji and R. Kamiya: "Reduction-oxidation poise regulates the sign of phototaxis in *Chlamydomonas reinhardtii*," Proc. of the National Academy of Sciences, vol.108, no.27, pp.11280-11284, 2011.
- [12] 鶴田匡夫: 応用光学 I. pp.279-292, 培風館, 1990.
- [13] S. Makise, H. Oku and M. Ishikawa: "Serial algorithm for high-speed autofocusing of cells using depth from diffraction (dfd) method," Proc. of 2008 IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation, pp.3124-3129, 2008.
- [14] Y. Sugiyama, M. Takumi, H. Toyoda, N. Mukozaka, A. Ihori, T. Kurashina, Y. Nakamura, T. Tonbe and S. Mizuno: "A high-speed cmos image sensor with profile data acquiring function," IEEE Journal of Solid-State Circuits, vol.40, no.12, pp.2816-2823, 2005.
- [15] T. Hasegawa, N. Ogawa, H. Oku and M. Ishikawa: "A new framework for microrobotic control of motile cells based on high-speed tracking and focusing," Proc. of 2008 IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation, pp.3964-3969, 2008.
- [16] T. Yamano, H. Oku, H. Kiyokawa, M. Ishikawa and K. Masahide: "Observation of *Chlamydomonas* swimming behavior and flagella motion by 3-D tracking microscopy," PNAS, (投稿予定).

荒井祐介 (Yusuke Arai)

2011 年東京工業大学工学部情報工学科卒業。2013 年東京大学大学院情報理工学系研究科創造情報学専攻修了。顕微鏡トラッキングシステムにおける対象の奥行位置推定手法の研究に従事。

吉川雅英 (Masahide Kikkawa)

1992 年東京大学医学部医学科卒業。1995 年東京大学大学院医学系研究科博士課程。1997 年医学博士。1995-2001 年同大学助手。2001-2007 年米国テキサス大学サウスウェスタン医科大学細胞生物学助教授。2007-2009 年京都大学大学院理学研究科構造生物学特別講座特任教授。2009 年東京大学大学院医学系研究科生体構造学分野教授。現在に至る。生体分子モーターの構造生物学、鞭毛の構造と機能の解析などに従事。

石川正俊 (Masatoshi Ishikawa)

1977 年東京大学工学部計数工学科卒業。1979 年東京大学大学院工学系研究科計数工学専攻修士課程修了。同年通産省工業技術院製品科学研究所研究員。1989 年東京大学工学部計数工学科助教授。現在東京大学大学院情報理工学系研究科創造情報学専攻教授。2002, 2003 年度東京大学総長特任補佐。2004 年度東京大学副学長。2005 年度理事・副学長。超並列・超高速ビジョン、センサフュージョン、メタ・パーセプションなどの研究に従事。1998, 2001, 2008 年度本学会論文賞受賞。工学博士。

(日本ロボット学会正会員)

若林憲一 (Ken-ichi Wakabayashi)

1996 年東京大学理学部生物学科卒業。1998 年東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻修士課程修了。2001 年同博士課程修了。2001-2002 年基礎生物学研究所非常勤研究員。2002-2005 年コネチカット大学ヘルスセンター博士研究員。2005 年東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻助手。2007 年同助教。2012 年東京工業大学資源化学研究所准教授。現在に至る。真核生物鞭毛の構築と運動調節の研究に従事。博士(理学)。

奥 寛雅 (Hiromasa Oku)

1998 年東京大学理学部物理学科卒業。2000 年東京大学大学院工学系研究科計数工学専攻修士課程修了。2003 年同専攻博士課程修了。2003-2005 年科学技術振興機構研究員。2005 年東京大学大学院情報理工学系研究科システム情報学専攻助手。2007 年同助教。2011 年同講師。現在に至る。ダイナミックイメージコントロール、ダイナモフレズなどの研究に従事。2009 年度本学会研究奨励賞受賞, 2010 年度本学会論文賞受賞。博士(工学)。(日本ロボット学会正会員)