

高速ビジョンによる3次元トラッキングを用いた 電場形成下での微生物運動計測

Observation of Microorganism Galvanotaxis using High-speed Three-dimensional Tracking System

長谷川 健史(東大・工) 尾川 順子(東大・情報理工/JSPS)
奥 寛雅(東大・情報理工) 正 石川 正俊(東大・情報理工)

Takeshi HASEGAWA, Univ. of Tokyo
Naoko OGAWA, Univ. of Tokyo/JSPS
Hiromasa OKU, Univ. of Tokyo Masatoshi ISHIKAWA, Univ. of Tokyo

Our goal is to utilize microorganisms as micro-robots by using galvanotaxis (locomotor response to electrical stimulus). To reach this goal, observation of three-dimensional galvanotaxis must be achieved. Our group has proposed the technique for autofocusing cells by using the diffraction pattern that appears, which we call Depth-From-Diffraction method. In this paper, we propose a novel three-dimensional tracking system incorporating the Depth-From-Diffraction method and the border-following algorithm to observe galvanotaxis of Paramecium cells. Experimental results shows that the system successfully captured the first ever three-dimensional galvanotactic motion of Paramecium cells.

Key Words: High-Speed Tracking, Visual Feedback, Microorganism, Galvanotaxis

1. まえがき

近年ミクロな領域で計測・制御を行う機会が増加している。そのため、操作者を補助しその負担を軽減する自律的かつ多機能なマイクロロボットの実現が求められている。だがその実現のためには、センサとアクチュエータの小型化という大きな問題を解決しなくてはならない。一方、微生物はその進化の過程で高性能なセンサとアクチュエータを体内に獲得してきた。この微生物の機構を利用する事が出来れば、微生物をマイクロロボットとして利用出来る可能性がある。我々はこの観点から、微生物を高機能なマイクロロボットとみなして制御することを目指している[1]。

マイクロロボットとしての応用を考える上で、アクチュエーション手段の確立は重要であり、これまで主にゾウリムシを対象に走電性という性質を用いた制御が研究されている[2, 3, 1, 4, 5]。しかしこれらの研究は顕微鏡焦点面内の2次元運動制御にとどまっており、より高性能で自由度の高いタスクを実現するためには、3次元空間内での運動が制御できることが望ましい。そのためには微生物の3次元的位置をリアルタイムで計測する必要があるが、従来の顕微鏡では対象の2次元位置しか計測できなかった。顕微鏡で得られるのは焦点面の平面画像のみであるため、ゾウリムシが3次元的に動くと、焦点面に対して直交する成分を含んだ運動を行うことになり、ゾウリムシの3次元位置を計測する新たな手法が必要になる。そこで我々は高速な視覚システムと画像特徴量を用いて、3次元空間を自由遊泳する微生物を対象に、単眼視かつリアルタイムにその運動を計測するシステムを開発した[6]。

本稿ではこのシステムをさらに改良して汎用性を高めるとともに、世界で初めてゾウリムシの走電性による運動を3次元計測した結果について報告する。

2. ゾウリムシと走電性

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は体長約 200–250 μm 、幅約 50 μm ほどの楕円体形をしている。細胞表面にほぼ一様に生えた繊毛を動かして水を押し、その反作用で水中を遊泳する[7]。この繊毛運動は、細胞の膜電位の変化とそれに伴うイオ

ン濃度変化によって制御される。もし細胞外部に電場をかけると、膜電位の変動により繊毛運動が変化し、運動に影響が生じる。具体的には、緩やかに螺旋を描きながら陰極に向かって泳ぐようになる。これを負の走電性という。この運動を3次元的に計測した研究例はこれまでに見当たらない。本稿では次節に述べる手法を用いて、ゾウリムシの走電性による運動を3次元で計測する。

3. 3次元運動計測

顕微鏡の狭い視野と被写界深度の内部で対象を継続的に観察するには、対象を常に視野中心、焦点面内に捕捉するトラッキングが有用である。以降では、焦点面内の2次元トラッキングと焦点面垂直方向の奥行きトラッキングに分けて考える。

3.1 焦点面内のトラッキング

焦点面内で動く対象をトラッキングする場合、対象の重心座標が分かれば良い。今回は画面内に複数の対象が存在し各々の重心を求める必要があること、輪郭近傍の画素が焦点面垂直方向のトラッキングに重要であることから、複数対象の輪郭を検知出来る境界線追跡[8]を利用し、画面上の複数のゾウリムシの画像モーメント、重心位置、周囲長、輪郭情報などを画像処理によって取得した。

3.2 焦点面垂直方向のトラッキング

焦点面における画像から垂直方向の変位を推定する手法はいくつかあるが、複眼視のために大掛かりなシステムが必要な場合や、空間周波数を利用するために画像全体を走査する処理が高速性を損なう場合がある。今回は単眼視かつ高速に微生物の垂直方向の変位を推定できる Depth From Diffraction を利用することにした[6]。

ゾウリムシを焦点を合わせて観察し、その位置から焦点面を上下にずらすと、対象の輪郭近傍に明暗の回折縞が現れる。具体的には、対象が焦点面よりも対物レンズに近い位置にあるときは輪郭外側に明るい縞、内側に暗い縞ができ、対象が焦点面よりも対物レンズから遠い位置にあるときは縞の明暗のパター

ンが逆転する．一般に多くの細胞は培養液中で光の吸収がほとんど無く，位相物体としての性質を持つ事から，このような回折縞が生じるのである．この回折縞に，対象と焦点面の位置関係に関する情報が含まれていることから，Depth From Diffraction ではこの明暗の回折縞の分布を計測することで，焦点面垂直方向の変位を推定する．

3.3 画像特徴量を用いた焦点面垂直方向の変位推定

Depth From Diffraction では，細胞内外の回折縞パターンを用いて垂直方向の変位を推定する．前報では並列プロセッサに特化したアルゴリズムを提案したが[6]，本稿では一般的な視覚システムに適用可能なより汎用的なアルゴリズムを提案する．

輪郭近傍の回折パターンは輪郭に沿ってあらわれるため，輪郭のすぐ外側とすぐ内側の輝度パターンを比較することにする．輪郭上の画素の明るさを輪郭に沿って平均したものを b_0 とする．また，輪郭の法線方向（ゾウリムシから離れる方向を正とする）にユークリッド距離で n 画素離れた点の明るさを，同様に輪郭に沿って平均化したものを b_n とする．停止しているゾウリムシを対象に，垂直方向の変位（Z position）をさまざまに変えて b_n のパターンを測定したところ，回折像が明瞭に観察できる上下 $\pm 80\mu\text{m}$ 程度の範囲内では， $b_2 - b_{-1}$ という特徴量が変位の絶対値の情報を持っており，また b_{-4} と b_{-3} が焦点面の上下かの情報を持っていることがわかった．

これらの特徴量のプロットを4個のゾウリムシについて平均したものを，図1に示す． $b_2 - b_{-1}$ は奥行き $z = -20\mu\text{m}$ 近傍で最小になっていることがわかる．運動計測においては必ずしも焦点が合っていないなくても，焦点面からのオフセットが一定であればよい．そこで $z = -20\mu\text{m}$ を目標にステージの変位を制御することにした．具体的には $b_2 - b_{-1}$ の値から，図1を2次関数でフィッティングした曲線を逐次参照して変位の絶対値を推定した．また焦点面より上にいるか下にいるかの判定には， b_{-4} と b_{-3} が共に一定値を下回った場合を上，それ以外を下として，ステージの移動方向を定めた．この推定された目標点にステージを移動させた．トラッキングのレンジとして $-70\mu\text{m}$ から $+30\mu\text{m}$ を取った．

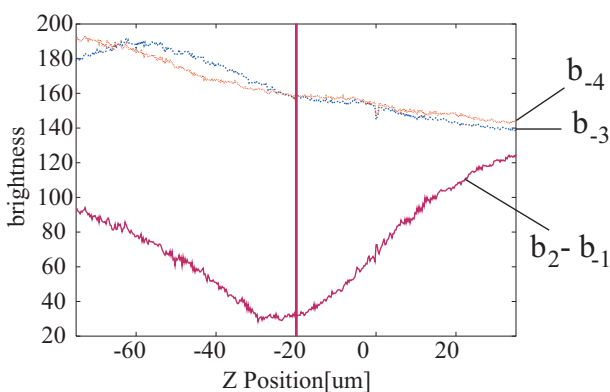


Fig. 1 Image features for estimation of Z position.

4. システム構成

システムの概要を図2に示す．ゾウリムシはXYZ-ステージに焦点面に対して斜めに固定された電極付チャンパー内に入れている．電極間に加えられる電圧により，ゾウリムシは走電性による運動を行い，Profile Imager と呼ばれる高速ビジョン

システムがこれを撮像して位置を計算する．これをもとに，対象が常に視野中心・焦点面内に位置するようにXYZ-ステージが自動的に制御される．これらのプロセスは2ms以内で実行される．

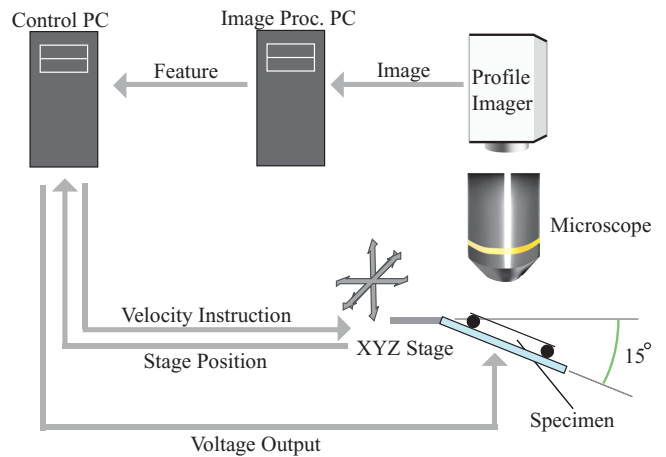


Fig. 2 System configuration.

4.1 電極付チャンパー

走電性によりゾウリムシを焦点面に対して3次的に運動させるためには，焦点面に垂直な方向に成分を持った電場をゾウリムシにかかる必要がある．今回は炭素棒によって作られたチャンパーを焦点面に対して傾けることで実現した(図3)．電極に電圧をかけるためのDAボード(Interface, PCI-3338)はリアルタイムOSを搭載した制御用PC(ART-Linux, Pentium 4, 3.2GHz)に接続されている．

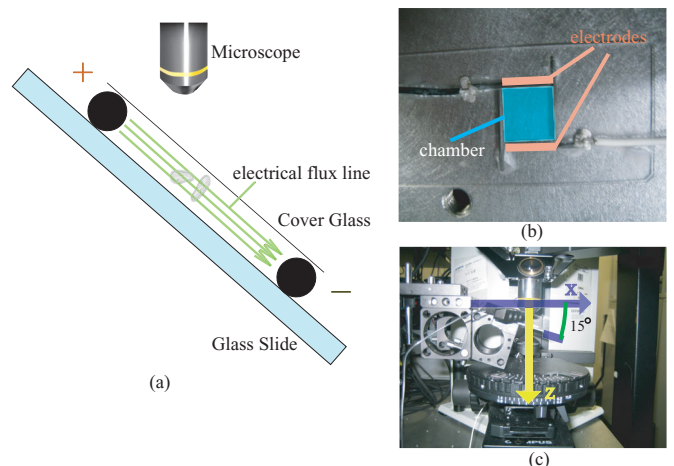


Fig. 3 Chamber with a pair of electrodes for Paramecium.

4.2 高速ビジョンシステム

微生物の一般的な運動速度がその体長に比して大きいのに対し，顕微鏡の被写界深度は非常に浅い．今回対象にしているゾウリムシの場合，その移動速度が1.0-1.5 mm/sであるのに対し，倍率10倍，開口率0.25の対物レンズでは被写界深度は7μm前後であり，僅か数msで焦点面から外れてしまう．そのため，走電性による3次元運動を正確に計測するためには，msオー

ダーで動作する高速な視覚システムが必要である。今回は Profile Imager(浜松ホトニクス)と呼ばれる CMOS イメージャを採用した[9]。前システム[6]に用いた視覚システム I-CPV[10]よりも解像度、感度ともに向上しており、イメージインテンシファイアが不要である。最大フレームレートは 2,421 frames/s, 最大解像度は 512 × 512 画素である。今回は 232 × 232 画素の部分読み出しを行い、フレームレートは 500 Hz とした。また画像はグレースケールで撮像され、12 ビット AD コンバータでデジタル変換されて、8 ビット画像として PC に送られる。

本トラッキングシステムでは Profile Imager を正立顕微鏡(BX50WI, オリンパス)に設置し、倍率 10 倍で明視野画像を撮像した。

4.3 画像処理全体の流れ

Profile Imager が撮像した画像は、2 ms ごとに画像処理用 PC (Windows XP, Xeon 2.80 GHz) に取り込まれ処理が行われる。画像処理用スレッドは Windows マルチメディアタイム API を用いて 500 Hz で実行される。まず取り込んだ画像から固定パターンノイズを除去した後、適当な閾値で 2 値化する。2 値化画像に対して境界線追跡を適用し、画面内の全ての対象の輪郭と 0 次・1 次モーメントを得る。複数のゾウリムシが画面内に存在する場合は、高いフレームレートにより、フレーム間での対象の移動距離がごく僅かである事を利用し、1 フレーム前の追跡対象の重心に最も近い対象をターゲットとした(図 4)。対象の輪郭近傍の画素の明るさを求め、Depth From Diffraction により焦点面垂直方向の変位を推定する。得られたデータは共有メモリ (Interface, LPC-4931) を介して制御用 PC と共有している。

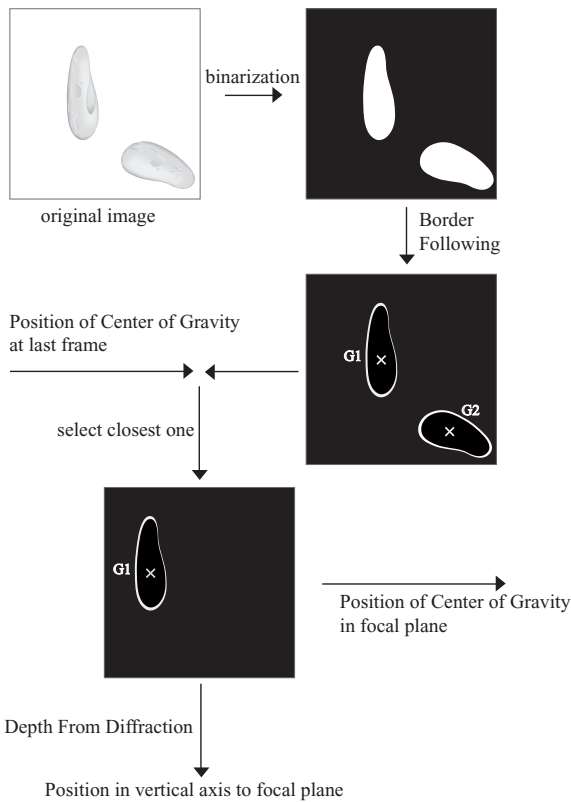


Fig. 4 Image processing algorithm.

4.4 XYZ-ステージの制御

ゾウリムシを載せた電極付チャンバーは XYZ-ステージ (Hephaist, CSZ-080-01) に固定されており、ステージの制御はリアルタイム OS 搭載 PC (ART-Linux, Pentium 4, 3.2 GHz) から行う。ステージは XYZ の 3 軸制御が可能であり、各軸に精度 0.25 μm のエンコーダを備えている。

5. 評価実験・結果

本システムのトラッキング性能を検証するために実験を行った。今回使用したのはゾウリムシの *Paramecium caudatum* の 27aG3 株である。培養液として液体カロリーメイト・カフェオレ味を蒸留水で 400 倍に薄めたものを用いた。遠心分離機でゴミを取り除いた後に、電極付チャンバーにセットした。6 秒ごとに反転する 5 V の電圧を電極間に与え、その時のゾウリムシの運動を本システムで計測した。

実験の結果、本システムはゾウリムシの走電性による 3 次元運動をトラッキングによって詳細に計測することに成功した。トラッキングの最長継続時間は 28 秒であった。

モニタリング用の CCD カメラの映像から静止画を得たものを図 5 に示す。この映像から対象が常に画面中心に捉えられており、焦点面内でトラッキング出来ている事が分かる。

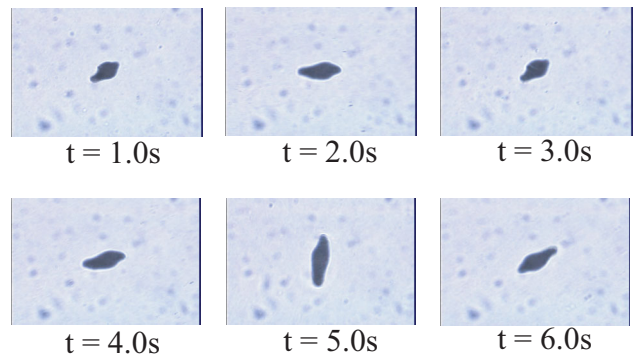


Fig. 5 Images from CCD attached to microscope.

ゾウリムシの軌跡をデータから再構成したものを図 6-8 に示す。図 6 中の矢印は走電性による遊泳方向の指令、6 秒おきに挿入されている線は電圧が反転した瞬間を示す。走電性による運動指令の変化に応じて、ゾウリムシが運動を変化させていることが分かる。また、図 fig:Step-Z-X.eps では、運動の焦点面に対する傾きが電場の傾きである 15 度にほぼ等しいことから、形成された電場方向に対して走電性を示している事が分かる。3 次元プロットされた図 8 から、ゾウリムシが 3 次元的に緩やかな螺旋を描いている事が分かる。動画として、トラッキング時の CCD カメラの映像と、CG により 3 次元プロットされたゾウリムシの軌跡を添付した。

これらの結果から、本システムがゾウリムシの走電性による 3 次元運動計測に有用であることがわかった。

6. むすび

本稿では、3 次元空間内を運動する微生物をトラッキングできる計測システムを開発し、走電性によって高速に運動するゾウリムシを計測した。

画像処理アルゴリズムにはまだ改善の余地があり、トラッキング性能をさらに向上させることは可能だと思われる。

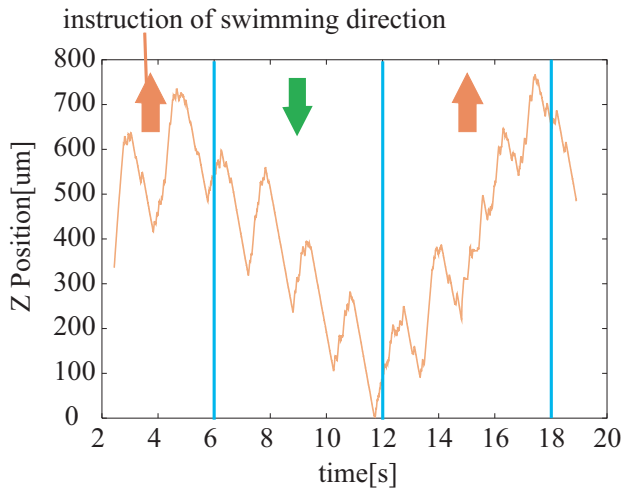


Fig. 6 Time sequence of z position.

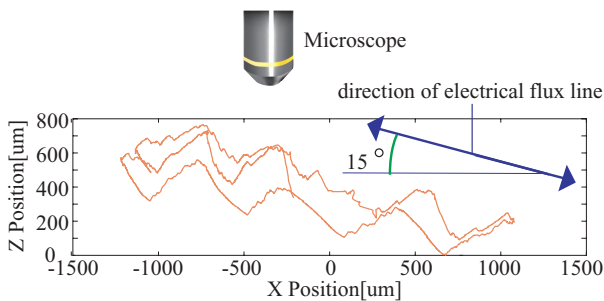


Fig. 7 Cross-sectional view of the trajectory of a cell.

この計測システムと走電性による制御を組み合わせることで、ゾウリムシの3次元での運動制御の基礎的な枠組みを作る事が可能になると考えられる。

文献

- [1] 尾川順子, 奥寛雅, 橋本浩一, 石川正俊, “オーガナイズドバイオモジュールの実現に向けたゾウリムシの応答計測”, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2003 (ROBOMECH '03) 講演論文集, 2P2-3F-E3, May, 2003
- [2] R. S. Fearing, “Control of a Micro-Organism as a Prototype Micro-Robot”, Proc. 2nd Int. Symp. Micromachines and Human Sciences, Oct. 1991.
- [3] A. Itoh, “Motion Control of Protozoa for Bio-MEMS”, *IEEE/ASME Transaction on Mechatronics*, Vol.5, No.2, pp.181-188, 2000.
- [4] K. Takahashi, N. Ogawa, H. Oku and K. Hashimoto, “Organized Motion Control of a Lot of Microorganisms Using Visual Feedback”, Proc. 2006 IEEE Int. Conf. Robotics Automation (ICRA2006), pp.1408-1413, May, 2006.
- [5] 山根淳, 尾川順子, 奥寛雅, 橋本浩一, 石川正俊. “ゾウリムシの運動制御のための電流制御型電気刺激デバイス”, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2004 (ROBOMECH '04) 講演論文集, 1A1-H-28, Jun, 2004.
- [6] H. Oku, Theodoros, K. Hashimoto and M. Ishikawa, “High-speed Focusing of Cells Using Depth-From-Diffraction Method”, Proc. 2006 IEEE Int. Conf. Robotics Automation (ICRA2006), pp.2626-2641, 2006.
- [7] 内藤豊. 単細胞動物の行動 その制御のしくみ. UP バイオロジー 85. 東京大学出版会, Dec. 1990.
- [8] 谷口慶治, 画像処理工学 基礎編, 共立出版, Nov, 1996.
- [9] Y. Sugiyama, M. Takumi, H. Toyoda, N. Mukozaka, A. Ihori, T. Kurashina, Y. Nakamura, T. Tonbe, and S. Mizuno, “A high-speed, profile data acquiring image sensor”, Dig. Tech. Papers of 2005 IEEE Int. Solid-State Circuits Conf. (ISSCC 2005), pp.360-61, Feb. 2005.

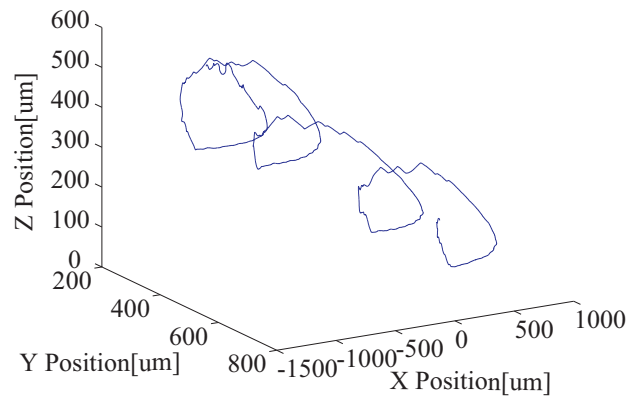


Fig. 8 Three-dimensional trajectory.

- [10] 豊田晴義, 向坂直久, 中村和浩, 宅見宗則, 水野誠一郎, 石川正俊, “イメージンテンシファイア機能付 1ms ビジョンシステム; I-CPV”, 高速度撮影とフォトニクスに関する総合シンポジウム 2001 講演論文集, pp.89-92, 2001.