

高速ビジョンによるトラッキングを用いた 3次元空間内での微生物運動制御

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) 石川 正俊 (東大・情報理工)

Motion Control of Microorganism using High-Speed 3-D Tracking System

*Takeshi HASEGAWA, Univ. of Tokyo

Naoko OGAWA, Univ. of Tokyo/JSPS

Hiromasa OKU, Univ. of Tokyo Masatoshi ISHIKAWA, Univ. of Tokyo

Abstract—Our goal is to utilize microorganisms as micro-robots by using galvanotaxis (locomotor response to electrical stimulus). To reach this goal, motion control in three-dimension must be achieved. Our group has proposed a novel three-dimensional tracking system incorporating the Depth-From-Diffraction method, the lock-on tracking and high-speed vision. In this paper, we control the motion of a paramecium cell in three-dimension using this tracking system.

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

1. まえがき

近年マイクロスケール領域で計測・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。

微生物の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る。これまで主にゾウリムシを対象に、電場に対して微生物がその運動方向を変える「走電性」をアクチュエーション手段として利用した研究が行われている [1-4]。

これらの研究は各視覚システムの焦点面内 2 次元運動制御にとどまっている。微生物のマイクロロボットとしての応用を考えたとき、例えばその作業領域を拡張していく上で、単に微生物を移動させる場合ですら 3 次元的な移動が起こることは容易に想像される。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。

走電性を用いて微生物の 3 次元運動制御を実現するためには、その 3 次元位置のリアルタイム計測と 3 次元空間内の任意の方向への電場形成の二つを実現する必要がある。しかし従来の視覚システムでは対象の 2 次元位置しか計測できず、奥行きを含んだ 3 次元空間

内での制御を行うには微生物の 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、単眼視で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 [5]。これは 3 軸を持った可動ステージと画像処理系を組み合わせ、対象を常に画面中心に捉える Lock-on トラッキングによって焦点面内の動きをトラッキングし、同時に Depth From Diffraction と呼ばれるフォーカシング手法によって顕微鏡光軸方向の動きをトラッキングしたものである。前稿では、この計測システムを更に改良して汎用性を高めると共に、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した [6]。本稿ではこの計測システムを利用し、図 1 のように 3 次元空間内でゾウリムシを走電性によって制御した結果について報告する。

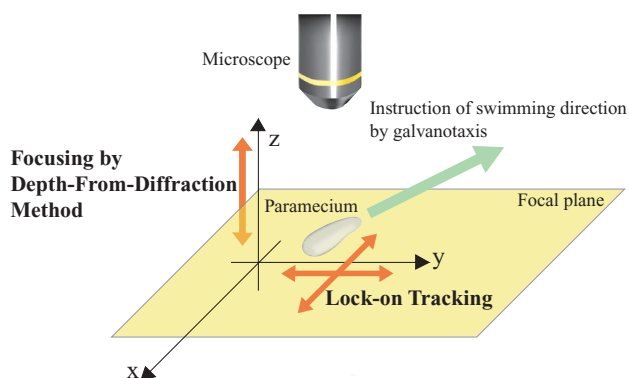


Fig.1 Motion control of a Paramecium cell in the three-dimensional space using the tracking system.

2. ゾウリムシと走電性

ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は原生生物の一種で、体長約 200–250 μm 、幅約 50 μm ほどの楕円体形をしている。細胞表面には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。この負の走電性をアクチュエーション指令として利用することで、ゾウリムシを制御することが可能になる。

3. 3次元位置計測

ゾウリムシなどの微生物は顕微鏡の視野・被写界深度に比して非常に高速に運動する。そのため継続的な位置計測を行うためには、高速な視覚システムによる観察、及び微生物を捉え続けるトラッキングアルゴリズムが有用である。

3.1 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 7 μm 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。今回のシステムでは高速視覚システムとして Profile Imager (浜松ホトニクス) と呼ばれる CMOS イメージャを利用した [9]。最大フレームレートは 2,421 frames/s、最大解像度は 512 \times 512 画素である。この 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。今回は 232 \times 232 画素の部分読み出しを行い、フレームレートは 1 kHz とした。画像はグレースケールで撮像、12 ビット AD コンバータで 8 ビット画像にデジタル変換されて、1 ms ごとに画像処理用 PC (Windows XP, Xeon dual core dual CPU 3.0 GHz) に取り込まれる。3次元座標推定のための画像処理用スレッドは Windows マルチメディアタイマ API を用いて 1 kHz で実行される。得られたデータは共有メモリ (Interface, LPC-4931) を介してリアルタイム OS を搭載した制御用 PC (ART-Linux, Pentium 4, 3.2GHz) と共有している。

3.2 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、輪郭近傍の画素が顕微鏡光軸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] を利用した。

まず Profile Imager から取り込んだ画像の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。複数の対象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 2)。

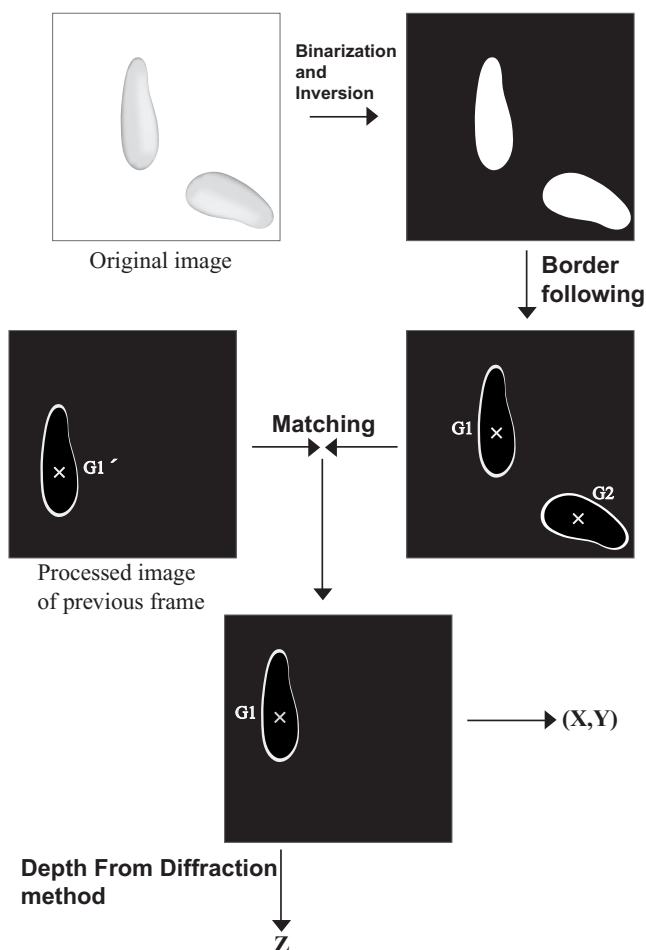


Fig.2 Image processing algorithm.

3.3 光軸方向のトラッキング

光軸方向のトラッキングには、Depth From Diffraction という手法を用いた [5]。ゾウリムシを焦点面を合わせて観察し、その位置から焦点面を上下にずらすと、図 3 のように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、顕微鏡光軸方向の変位を推定する。

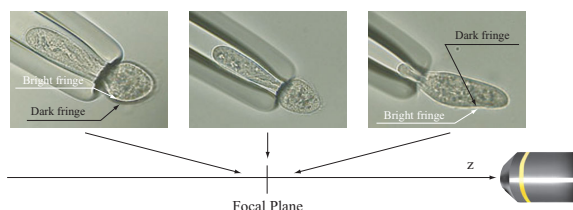


Fig.3 Diffraction patterns of a Paramecium cell.

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したところ、光軸方向変位の絶対値の情報を持った特徴量と、焦点面の上か下かの情報を持った特徴量を抽出することがわかった [6]。これらの特徴量から推定された目標点にステージを移動させることで、光軸方向のトラッキングを行った。

4. システム構成

システムの概要を図 4 に示す。ゾウリムシは XYZ-ステージに固定された電極付チャンバーの中に入れている。炭素棒を電極として図 5 のように配置し 1 軸の電場を発生させられるようにした。電極間距離は 1 cm、電極間電圧は 5 V とした。焦点面に対して 3 次元運動を行わせたいので、チャンバーは顕微鏡の焦点面に対して 15 度の角度をつけて取り付けられている。電極間にかげられた電圧による遊泳方向指令を受けて、ゾウリムシは走電性による運動を行う。その 3 次元位置は、Profile Imager からの画像をもとに画像処理用 PC で推定される。この位置をもとにリアルタイム OS を搭載した制御用 PC (ART-Linux, Pentium 4, 3.2GHz) が、対象を視野中心・焦点面に位置するように XYZ-ステージ (Hephaist, CSZ-080-01) を動かす。チャンバー内に電圧をかけゾウリムシに遊泳方向指令を出す。これらのプロセスは 1 ms で実行される。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。電極に電圧をかけるための DA ボード (Interface, PCI-3338) は制御用 PC に接続されている。

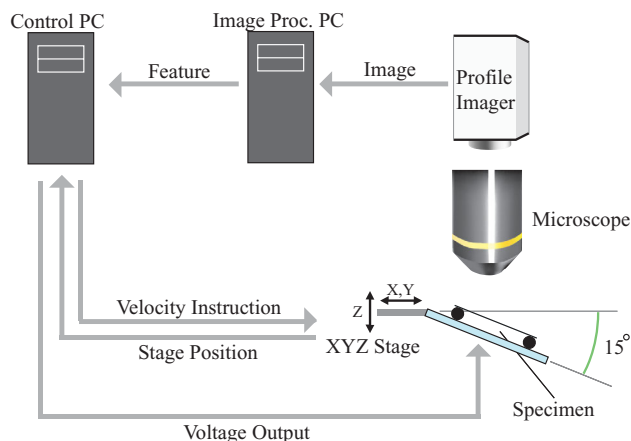


Fig.4 System configuration.

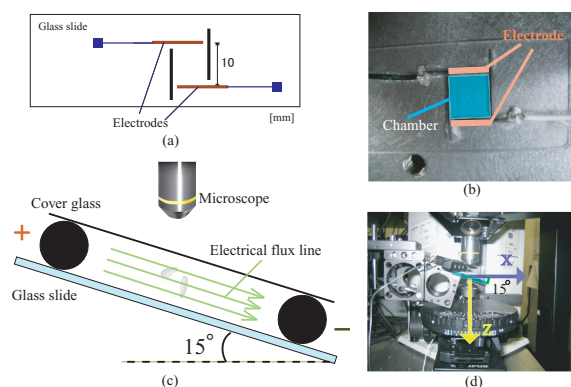


Fig.5 (a)(b) Chamber with a pair of electrodes for Paramecium. (c)(d) Cross-sectional view of the chamber and the microscope.

5. 実験

先に述べた 3 次元計測システムを利用して、ゾウリムシの 3 次元空間内での位置制御実験を行った。今回使用したのはゾウリムシの *Paramecium caudatum* の 27aG3 株である。培養液として大塚製薬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。継代後 4-5 日の株から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。

今回制御タスクとして、一定領域内の鉛直方向 1 次元トラップ制御を行った。図 6 のように Z 軸の $-125\mu\text{m}$ から $+125\mu\text{m}$ までの空間を定め、ゾウリムシがトラップ領域外に出たらトラップ領域内に戻すように電圧を反転させた。

実験の結果、ゾウリムシをトラップ領域内に閉じ込めることに成功した。制御の最長継続時間は 33 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 7 に示す。

ゾウリムシの軌跡をデータから再構成したものを図 8-10 に示す。図 8 中の矢印は走電性による遊泳方向指

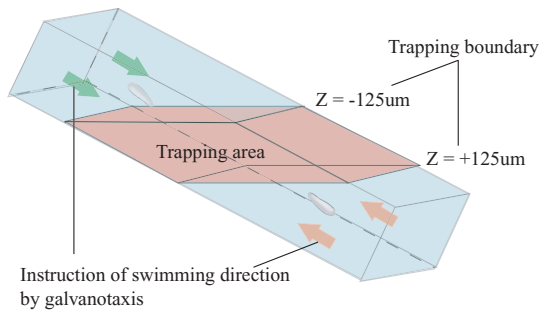


Fig.6 Three-dimensional trapping task.

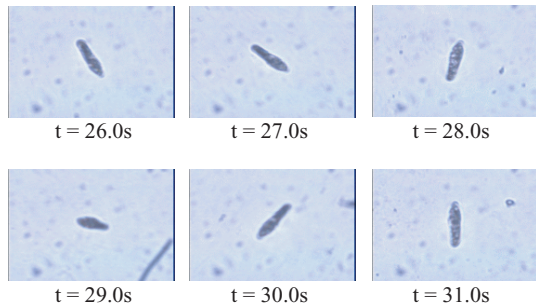


Fig.7 Images of the tracked cell captured by the CCD camera attached to the microscope.

令,挿入されている線は電場が反転した瞬間を示す.軌跡が細かく振動しているのは,ゾウリムシが螺旋を描きながら遊泳することに由来する.図9,10からゾウリムシが一定領域内にトラップされていることが分かる.

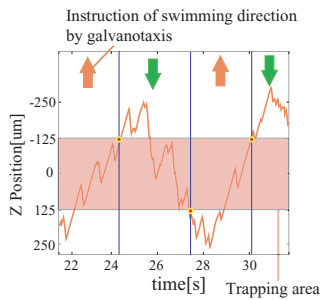


Fig.8 Time sequence of z position of the tracked cell.

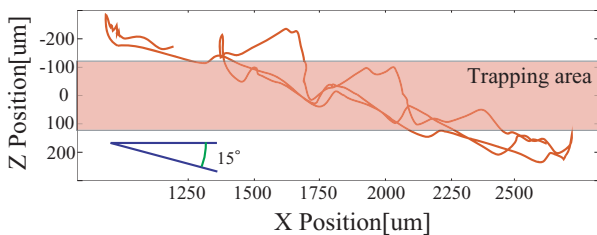


Fig.9 Cross-sectional view of the trajectory of the tracked cell.

これらの結果から,3次元空間内においてゾウリム

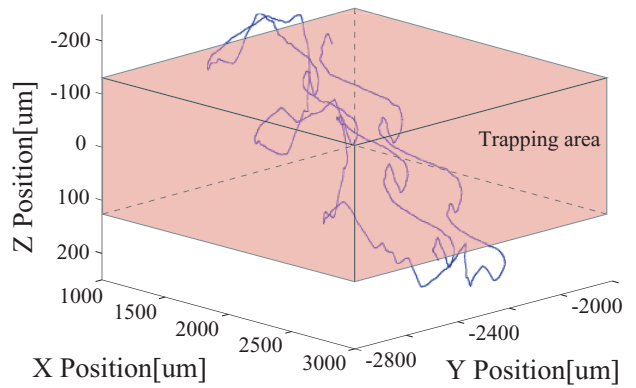


Fig.10 Three-dimensional trajectory of the tracked cell.

シの位置制御が行えた事が確認できた.

6. むすび

本稿では高速な視覚システムによるトラッキングシステムを利用し,3次元空間内において微生物の位置を制御した.今回は1軸のみの制御だが,今後電極配置を検討することで多軸での制御が可能になれば,より高度な制御を行う事が出来るようになると思われる.

謝辞

奈良教育大学の石田正樹准教授には,本研究で用いたゾウリムシを分譲していただいた.ここに御礼申し上げます.

- [1] R. S. Fearing, " Control of a Micro-Organism as a Prototype Micro-Robot ", Proc. 2nd Int. Symp. Micromachines and Human Sciences, Oct. 1991.
- [2] A.Itoh, " Motion Control of Protozoa for Bio-MEMS ", IEEE/ASME Transaction on Mechatronics, Vol.5, No.2, pp.181-188, 2000.
- [3] N.Ogawa, H.Oku, K.Hashimoto and M.Ishikawa, " Micro-robotic Visual Control of Motile Cells using High-Speed Tracking System ", IEEE Trans. Robotics, Vol.21, No.4, pp.704-712, Aug. 2005
- [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] H.Oku, Theodorus, 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.
- [6] 長谷川健史, 尾川順子, 奥寛雅, 石川正俊, " 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 ", 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2007 (ROBOMECH '07) 講演論文集, 2A2-O06, May, 2007.
- [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.