

高速ビジュアルフィードバックを用いたホヤ精子のトラッキング

Tracking of Ascidian Spermatozoa using High-speed Visual Feedback

尾川 順子 (東大・情報理工/JSPS) 石川 貴彦 (東大・工) 奥 寛雅 (東大・情報理工)
柴 小菊 (東大・理) 吉田 学 (東大・理) 石川 正俊 (東大・情報理工)

Naoko OGAWA, Univ. of Tokyo/JSPS, Naoko_Ogawa@ipc.i.u-tokyo.ac.jp
Takahiko ISHIKAWA, Univ. of Tokyo Hiromasa OKU, Univ. of Tokyo
Kogiku SHIBA, Univ. of Tokyo Manabu YOSHIDA, Univ. of Tokyo
Masatoshi ISHIKAWA, Univ. of Tokyo

We propose a novel automatic tracking system capable of tracking fast-moving, small objects under extreme conditions by using high-speed visual feedback for assessing sperm chemotaxis. The system shows remarkable performance and versatility, good enough for practical use in biology. Experimental results showed that we successfully achieved continuous stable tracking of swimming ascidian spermatozoa with quality sufficient for assessing sperm motility, indicating the feasibility of our system to tracking almost any type of cell.

Key Words: High-Speed Tracking, Visual Feedback, Spermatozoa, Ascidian

1. まえがき

多くの運動性細胞にはある種の化学物質に近付いたり、あるいは遠ざかったりする現象が見られる。これを走化性という。特に脊索動物ホヤの精子は顕著な走化性を示す。ホヤ精子の走化性の研究は近年の生物学において大きく注目されているテーマの一つであり [1,2], 精子の運動性やモータンパク質の動態の解明だけでなく、不妊治療への応用も期待されている。

精子の走化性の評価には、精子の位置、姿勢、鞭毛の形状などを顕微鏡下で詳細に継続観察する必要がある。しかし一般にこのような遊泳する細胞の顕微鏡下継続観察は、生物学における長年の課題であった。細胞の運動がきわめて速い場合、すぐに視野から外れてしまうためである。このため従来は低倍率での観察を余儀なくされ、広い作業領域内での詳細な観察は非常に困難であった。この問題に対し、著者らは「微生物トラッキング顕微鏡」を提案した [3]。このシステムでは、高速ビジュアルフィードバックにより対象をトラッキングし、遊泳中の対象を高倍率のまま常に視野中心に保持することができる。本システムによりこれまでゾウリムシの運動計測や人工的な運動制御などが実現されてきた [4,5]。

しかし実際には、本システムでトラッキングできる対象の速度やサイズに限界があり、ホヤ精子のトラッキングには適用できないことがわかった。これはホヤ精子トラッキングがきわめて極限的なタスクであり、厳しい条件が満たされなければならないためである。例えばホヤ精子は1秒間に頭部直径の150倍の距離を泳ぐが [6], これはゾウリムシの30倍である。またホヤ精子頭部の直径はおよそ2-3 μm と小さく、光学系の回折限界ぎりぎりのサイズである。さらに、精子の顕微鏡像のコントラストは非常に低いという問題もある。

そこで本稿では、ビジュアルフィードバックに基づく前システムのコンセプトを継承しつつ、さらに極限的な状況でも安定したトラッキングが可能な次世代微生物トラッキングシステムを開発した。サブシステムの刷新により、ホヤ精子トラッキングを始めとする生物学分野での実用にも十分に耐えるシステムとなった。ほとんどの運動性細胞の遊泳速度はホヤ精子よりも遅いため、ほぼあらゆる運動性細胞の観察にも本システムが有効であると考えられる。本稿では提案するシステムがホヤ精子を十分な性能で安定して継続観察できることを示し、実用応用の可能性を示す。

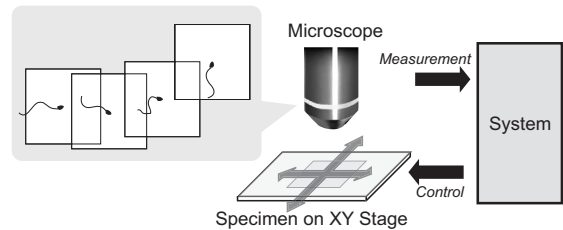


Fig. 1 Tracking of motile cells.

2. 精子のトラッキング

2.1 トラッキングとは

前述したように、従来の顕微鏡システムで細胞運動を観察する場合、高倍率での継続観察が難しいという問題があった。この問題に対処するために、本研究ではトラッキングを導入する。

本稿ではトラッキングを「対象が常に視野中心に来るように視野を移動させる」として扱う。これは図1に示すように、対象が視野中心に来るように対象が載ったステージを移動させることによって実現できる。これにより従来の顕微鏡では実現できなかった高倍率での継続観察が可能となる。この手法は著者らの従来システムにおいて実装され [3], 過去の類似研究 [7] と比較して高い汎用性を実現した。

対象のトラッキングしやすさを評価するにあたって重要な指標となるのが、対象直径に対する遊泳速度である。対象の絶対速度と違い、拡大された顕微鏡画像における実質的な速度を示している。対象を視野いっぱい拡大して観察している場合、もし対象がその直径と同じ距離を移動したとすると、視野から外れてしまいトラッキングは失敗する。例えば、一般に微生物は1秒間に体長の50倍の距離を泳ぐことがあるので [7], 視野いっぱい拡大していた場合、1/50秒後には視野からいなくなってしまうことになる。言い換えれば、この指標はシステムが何フレームにわたって対象を捉えられるかを示していることになる。次節ではこの指標を用いて精子トラッキングの難しさを議論する。

2.2 精子トラッキングの難しさ

ホヤ精子のトラッキングは以下のような困難な条件を抱えており、きわめて極限的なタスクである。

(1) 遊泳スピードの超高速性：前節で議論したように、トラッキングにおいて対象サイズに対する遊泳スピードは重要な指標である。従来システムは、ほとんどの微生物は1秒間に直径の50倍の距離を泳ぐ[7]という知見をもとに設計され、1秒間に体長の5~10倍の距離を泳ぐゾウリムシのトラッキングに成功した[3]。しかしホヤ精子の遊泳速度はそれをはるかに上回る。ホヤ精子は1秒間に頭部直径の150倍の距離を遊泳するが、この驚異的な速度は他の生物の精子よりもずっと早い。これを人間のサイズに換算すると、身長2mの人間がマッハ1の超音速で移動している場合に相当する。このようなきわめて高速な対象を十分な倍率でトラッキングすることは非常に困難なタスクであり、対象を見失わないためには高フレームレートのビジョンシステムが必要である。

(2) 頭部の首振りの高速性：ホヤ精子はおよそ50Hzで周期的に鞭毛を動かすことによって遊泳するが[6]、この鞭毛打によって精子頭部が周期的に首振り運動する。よって、頭部位置を正確に計測するには、この首振り周波数よりも十分に高いフレームレートでの観察が必要となる。

(3) 回折限界に迫る小ささ：ホヤ精子の頭部直径はおよそ2-3 μm 、鞭毛の直径はおよそ0.4 μm であるが、これらは光学顕微鏡の回折限界に迫るサイズである。加えて高倍率での観察では被写界深度が浅くなるために、観察が一層難しくなる。

(4) 画像のコントラストの低さ：一般的に生物試料は光の吸収が少ない。さらに、試料がきわめて微小な場合は照明光がほとんど吸収されないため、画像コントラストが非常に低くなり、明視野観察法などによって精子を観察することは不可能である。低コントラスト画像にも有効な手法としては位相差観察法などがあるが、精子画像のコントラストはきわめて低いと、著者らの従来システムでは位相差観察法を用いても精子を認識できないことが判明した。精子を認識するにはより感度の高いビジョンシステムの採用が必要である。

以上をまとめると、精子のトラッキングはきわめて極限的な状況であり、上記の問題点をすべて克服するシステムが必要である。次節では、精子トラッキングのために新たに構築した新トラッキングシステムについて述べる。

3. システム構成

システムの外観を図2に示す。精子はXYステージ上に固定されたプレパラート内に入れられ、プロファイルイメージャと呼ばれる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に位置するようにXYステージが自動的に制御される。これらのプロセスは1ms以内で実行される。

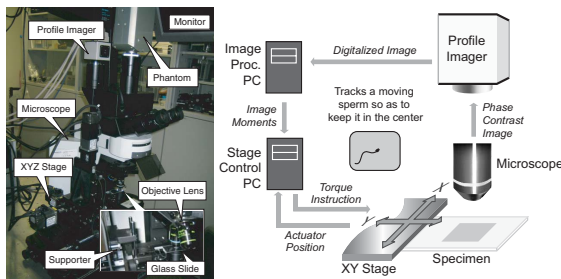


Fig. 2 A Photograph of the tracking system and its configuration.

Table 1 Specifications of the vision system, Actual settings used are shown in parentheses.

画像サイズ	512 × 512 (232 × 232)
フレームレート	2,421 fps (1,000 fps)
チップサイズ	13.0 × 14.3 mm
画素サイズ	20 μm □

3.1 ビジョンシステム

上述したように、高速で遊泳する対象を高倍率でトラッキングし、首振りする頭部の位置を正確に計測するためには、ビジョンシステムに高フレームレートが要求される。さらに、ステージを制御するためには対象情報がリアルタイムで取得できなければならない。これらの要件を満たすシステムとして今回「プロファイルイメージャ」(浜松ホトニクス)と呼ばれるCMOSイメージャを採用した[8]。最大フレームレートは2,421 frames/s、最大解像度は512 × 512画素であり、従来システムに用いられていたI-CPVシステム[9]よりも向上している。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1kHz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。感度はI-CPVよりも向上したため、一般に高速撮像システムで用いられるイメージンセンシファイアは必要ない。プロファイルイメージャの諸元を表1に示す。

本トラッキングシステムではプロファイルイメージャを正立顕微鏡(BX50WI, オリンパス)に設置し、倍率40倍で位相差画像を撮像した。また実験者のモニタリング用およびより高精細な画像データの取得のため、高速カメラ(Phantom v4, Vision Research Inc.)による同時撮像を行っている。

3.2 画像処理

プロファイルイメージャが撮像した画像は、1msごとに画像処理用PC(Windows XP, Xeon 2.80 GHz)に取り込み、画像処理を行う。PC内では画像処理用と画像描画用の2つのスレッドを走らせている。画像処理用スレッドはWindowsマルチメディアAPIを用いて1kHz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。この時点では精子の頭部のみが抽出されており、システムは頭部を対象としてトラッキングすることになる。頭部2値画像から抽出された対象画像から画像モーメントを計算する。複数の精子が画面内に存在する場合の対処については、高速画像に適した手法であるセルフウィンドウ法[10]を用いてセグメンテーションとフレーム間マッチングを行っている。得られた画像モーメントデータは共有メモリ(Interface, LPC-4931)を介してステージ制御用PCと共有している。

3.3 XYステージの制御

精子を載せたプレパラートはXY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。ステージは本来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。精子などの運動性細胞は一般に「壁効果」によりスライドガラス表面に沿った2次元平面を遊泳する傾向があるため[11]、今回はX, Y軸のみ(ストローク25mm)を使用して2次元トラッキングを行っている。

ステージ制御プログラムでは2スレッドが走っているが、それぞれ共有メモリからの画像モーメントデータ取得とステージ

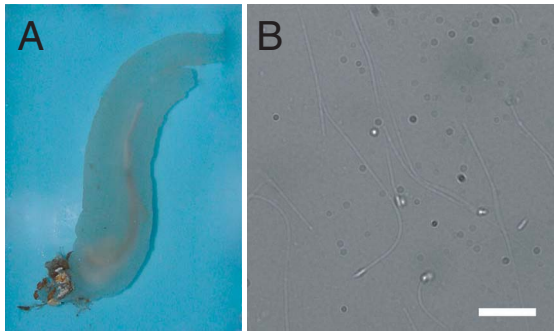


Fig. 3 (A) The ascidian (*Ciona intestinalis*) and (B) its spermatozoa. The scale bar denotes 10 μm .

制御とを担当しており、1 kHz で実行される。画像モーメントデータはスレッド間で mutex により排他的に共有される [12]。前者のスレッドは 1ms ごとに画像モーメントを取得し、0 次、1 次モーメントから画像重心を計算して [13]、対象の絶対座標を求める。同時に対象位置の画像中心からのズレをもとにステージの目標位置を計算し、PID 制御に基づいて速度指令をサーボアンプ (三菱電機, MR-J3) に送ることで、ステージを目標位置に制御する。これにより、対象は常に視野中心に保持され、トラッキングが行われる。

4. 実験

本システムのトラッキング性能を検証するため、ホヤ精子を用いた実験を行った。

本実験で使用したホヤの一種、カタユレイボヤとその精子を図 3 に示す。神奈川県油壺湾で採取されたカタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) の輸精管を切開して精子を取り出し、氷上で保管した。採取後 2 日が経過した精子 0.5 μl をまず 500 μl の人工海水 (462 mM NaCl, 9 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 48 mM MgCl₂, 10 mM HEPES-NaOH, pH 8.2) に溶解し、さらに人工海水で 10 倍に希釈した。精子懸濁液を 1 滴スライドガラスに取り、カバーガラスをかぶせた。スライドガラスは精子の接着を防ぐため、1% BSA (bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン) でコーティングしてある。これをステージに固定し精子をトラッキングした。

実験の結果、提案システムは安定して遊泳精子をトラッキングできることがわかった。精子の運動や鞭毛の形状がはっきりと観察できた。トラッキングの最長継続時間は 130 秒であった。

図 4 は、モニタリング用に高速カメラ Phantom を用いて 200 fps で同時撮像した精子像から作成した連続写真である。各画像は視認性を上げるため、ソフトウェア (MATLAB, MathWorks) によって元画像から対象を含む 256 \times 256 画素領域を切り出して固定パターンノイズを除去し、コントラストを強調してある。移動する背景に対し、運動する精子の頭部が視野中心に固定されていることがわかる。また鞭毛の運動の様子も明確に認識できる。鞭毛にややブレが見られるが、これはモニタリング用 Phantom のフレームレートが 200fps と低かったことが原因であり、トラッキングに影響はない。

ある試行における精子の軌跡をデータから再構成したものを図 5 に示す。この試行ではトラッキングは 130 秒間持続した。精子の特徴的な円運動が確認できる。また、カメラ視野 (116 \times 116 μm) よりもかなり広い領域を実質的にカバーできていることは注目すべきである。この実験では精子の運動範囲は比較的狭いが、走化性を示している精子はより広い軌道を描く [6]。そのため、

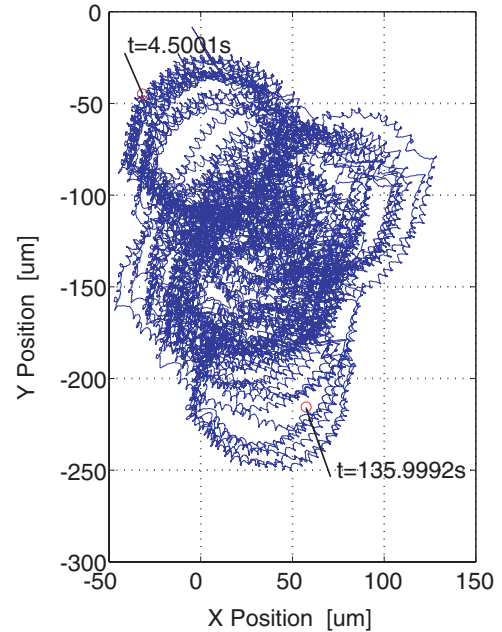


Fig. 5 Reconstructed trajectory of a swimming spermatozoon. In this trial, tracking successfully lasted for about 130 s. Circular motion of the spermatozoon was clearly observable.

広いワーキングエリアを提供できる本システムは走化性の評価にとって非常に有用であると言える。

図 6 は図 5 から 14~16 秒の部分抜きだしたものである。鞭毛の周期運動による精子頭部の揺れがはっきりと観察できる。同じく 14~16 秒での精子の Y 変位の推移を図 7 に示す。微小な揺動がみられるが、この周期 (46.68 ± 11.55 Hz, $N = 13$) のオーダは報告されている鞭毛打周波数 (51.25 ± 3.08 Hz, $N = 8$) [6] とよく一致している。

添付動画には、Phantom カメラで撮像したビデオシーケンスと、実データから OpenGL を用いて再構成した精子軌跡 CG を示す。

これらの結果から、本システムがホヤ精子の安定継続トラッキングに有用であり、精子の運動性の評価に十分な質のデータが得られていることがわかった。これにより、ほとんどの運動性細胞の観察に対しても本システムが有用であると期待される。

5. むすび

本稿では、高速で微小な対象であってもトラッキングできる微生物トラッキングシステムを提案した。高速ビジュアルフィードバックにより、低コントラストで高速遊泳するホヤ精子を十分なクオリティでトラッキングすることに成功した。これにより、本システムが高い汎用性と実用性を持っていることが示された。

システム構成と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と思われる。また将来的には 3 次元トラッキングアルゴリズム [14] を実装することで、さらに精密な細胞運動計測が可能になると期待される。今後、本システムを用いて実際に走化性を評価していきたいと考えている。

• ㊦ OEL

[1] M. Yoshida, M. Ishikawa, H. Izumi, R. de Santisdagger, and M. Morisawa, "Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm," Proc. National Academy of Sciences of the

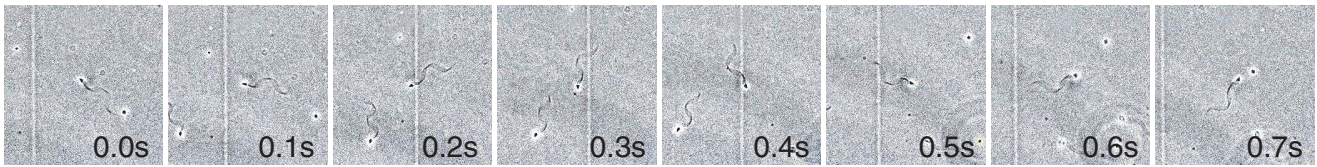


Fig. 4 Cropped image sequence of the spermatozoon, captured simultaneously by the high-speed Phantom camera at 200 fps for human monitoring (the contrast was enhanced and the FPN was removed).

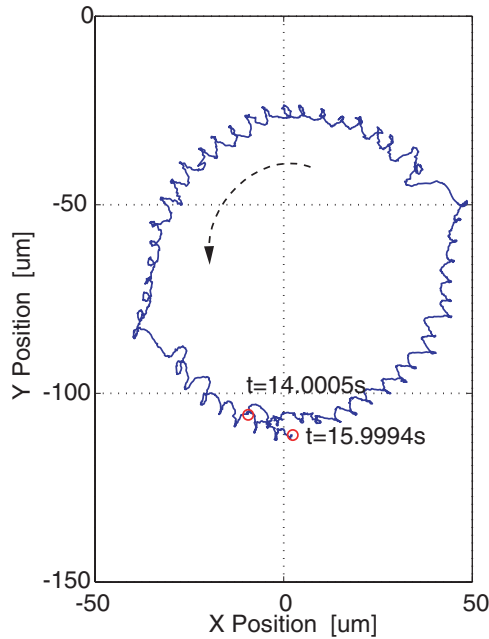


Fig. 6 Selected part of circular trajectory for 14 to 16 s. Swinging of the sperm head caused by periodic motion of the flagella was clearly observed.

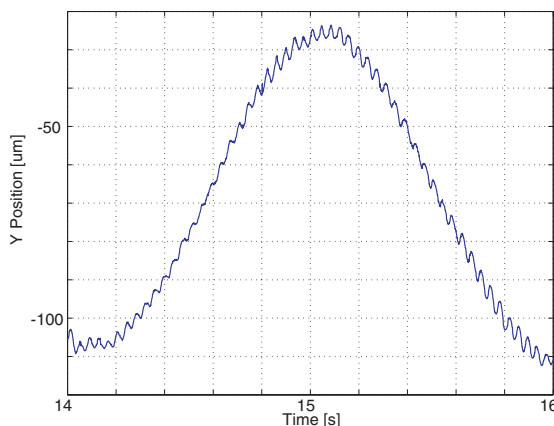


Fig. 7 Y position of the spermatozoon during 14 to 16 s period. Frequency of the small fluctuations agreed well with reported flagella beat frequencies.

- United States of America (PNAS), vol.100, no.1, pp.149–154, Jan. 2003.
- [2] M. Yoshida, M. Murata, K. Inaba, and M. Morisawa, “A chemoattractant for ascidian spermatozoa is a sulfated steroid,” *Proc. National Academy of Sciences USA (PNAS)*, vol.99, no.23, pp.14831–14836, 2002.
 - [3] H. Oku, N. Ogawa, K. Hashimoto, and M. Ishikawa, “Two-dimensional tracking of a motile micro-organism allowing high-resolution observation with various imaging techniques,” *Rev. Scientific Instruments*, vol.76, no.3, Mar. 2005.
 - [4] N. Ogawa, H. Oku, K. Hashimoto, and M. Ishikawa, “Microbotic visual control of motile cells using high-speed tracking system,” *IEEE Trans. Robotics*, vol.21, no.4, pp.704–712, Aug. 2005.
 - [5] N. Ogawa, H. Oku, K. Hashimoto, and M. Ishikawa, “A physical model for galvanotaxis of paramecium cell,” *J. Theoretical Biology*, vol.242, no.2, pp.314–328, Sept. 2006.
 - [6] K. Shiba, T. Máriań, Z. Krasznai, S.A. Baba, M. Morisawa, and M. Yoshida, “ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger modulates the flagellar wave pattern for the regulation of motility activation and chemotaxis in the ascidian spermatozoa,” *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol.63, pp.623–632, 2006.
 - [7] H.C. Berg, “How to track bacteria,” *Rev. Scientific Instruments*, vol.42, no.6, pp.868–871, Jun. 1971.
 - [8] 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.360–361, Feb. 2005.
 - [9] 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, “イメージイ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*, vol.5-1, pp.89–92, 2001.
 - [10] I. Ishii, Y. Nakabo, and M. Ishikawa, “Target tracking algorithm for 1ms visual feedback system using massively parallel processing,” *Proc. 1996 IEEE Int. Conf. Robotics & Automation (ICRA'96)*, vol.3, pp.2309–2314, Apr. 1996.
 - [11] Y. Magariyama, M. Ichiba, K. Nakata, K. Baba, T. Ohtani, S. Kudo, and T. Goto, “Difference in bacterial motion between forward and backward swimming caused by the wall effect,” *Biophysical Journal*, vol.88, no.5, pp.3648–3658, May 2005.
 - [12] W.R. Stevens, *UNIX Network Programming: Volume 2, Interprocess Communications*, Prentice Hall 2 edition, 1998.
 - [13] W.T. Freeman, D.B. Anderson, P.A. Beardsley, C.N. Dodge, M. Roth, C.D. Weissman, W.S. Yerazunis, H. Kage, K. Kyuma, Y. Miyake, and K. Tanaka, “Computer vision for interactive computer graphics,” *IEEE Computer Graphics and Applications*, vol.18, no.3, pp.42–53, May/June 1998.
 - [14] H. Oku, Theodoros, M. Ishikawa, and K. Hashimoto, “High-speed autofocusing of a cell using diffraction pattern,” *Optics Express*, vol.14, pp.3952–3960, May 2006.