

## 2018年度 永守財団 研究助成 研究報告書

所属機関名	名古屋大学
職位または役職	准教授
氏名	青山 忠義

### 1. 研究題目

高速電動ミラー制御による視野拡張型トラッキング顕微鏡の開発

### 2. 研究目的

近年、バイオ・医療の研究分野における細胞や運動性微生物の解析のため、マイクロ対象を追跡する顕微鏡システムが開発されている。しかしながら、これまでに開発されたトラッキング顕微鏡システムは視野範囲が狭く、追跡対象の周囲環境の撮影範囲が限定的である。さらには、単一の対象しか追跡できず、複数の運動性微生物の同時観察が不可能である。本研究では、高速電動ミラーによる視線制御と高速ビジョンによる多視点同時撮影により、広範囲の顕微鏡観察を可能とする視野拡張型顕微鏡の概念に基づき(図1)、図2に示すような複数のマイクロ対象追跡とその周囲環境の同時撮影を行う視野拡張型トラッキング顕微鏡を開発する。具体的には、以下の研究項目に取り組む。

#### 1. 対象追跡とその周囲環境の同時撮影を行う高速電動ミラー制御法の開発

マイクロ追跡対象の位置情報を 1000 コマ/秒で取得する高速視覚情報処理に基づき、追跡対象とその周囲を同時撮影する高速電動ミラー制御法を開発する。

#### 2. 視野拡張型トラッキング顕微鏡の性能評価

顕微鏡システム評価に用いられる代表的な運動性微生物であるゾウリムシを追跡対象として、開発システムの性能評価を行う。

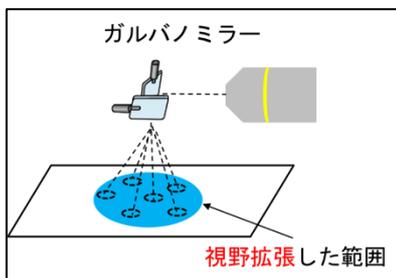


図1 視野拡張型顕微鏡

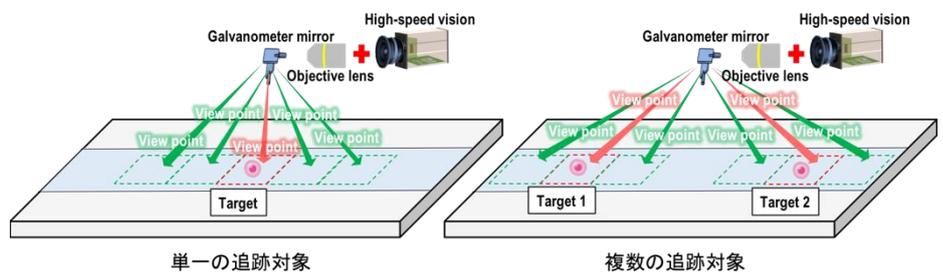


図2 本研究のコンセプト

### 3. 研究内容及び成果

本研究では、我々が提案している視野拡張顕微鏡システムのコンセプトに基づき、複数のマイクロ対象を同時に追跡し、追跡対象の周囲環境も観察可能な視野拡張トラッキング顕微鏡システムを提案した。その上で、提案したコンセプトに基づき、ガルバノミラー、高速ビジョンシステム、顕微鏡から構成される視野拡張トラッキング顕微鏡を構築した。図3に構築したシステムの構成とその外観を示す。

構築したシステムは、正立顕微鏡(BX51,OLYMPUS)、簡易顕微鏡ユニット(KTL-N21B-1, 協和光学)、高速ビジョンシステム(IDP Express, Photron/広島大学)、1自由度ガルバノミラー(6210HSM 6 mm532 nm, Cambridge Technology)、制御コンピュータ(Windows 7 Enterprise, 64-bit OS, Intel Core i7, CPU950, 3.07 GHz, DDR3, 12 GB) から構成される。顕微鏡対物レンズの倍率は20倍であり、作動距離は33 mmである。ガルバノミラーは制御コンピュータからのアナログ電圧指令により、 $\pm 10^\circ$  の範囲で駆動する。視線変化にともなう輝度変化を防ぐため、照明は落射照明を使用している。構築システムは実時間で対象追跡および視野拡張画像を取得するため、1視点につき、333 fps のフレームレート（視線移動のための時間が2 ms, 露光時間が1 ms）で動作するように設計している。

提案システムの有効性を検証するため、マイクロ流路内の対象追跡とその周囲環境の同時撮影実験を行った。図4に示すように、曲面ステージに添付した幅260  $\mu\text{m}$ 、深さ100  $\mu\text{m}$ のマイクロ流路を使用する。本実験では、ゾウリムシを計測対象とし、ゾウリムシを含む液体をマイクロ流路内に注入する。ゾウリムシの全長は90~150  $\mu\text{m}$ 、全幅は40  $\mu\text{m}$ 程度であり、その移動速度は1.5 mm/s程度あることが知られている。ゾウリムシの移動速度は運動性微生物の中でも速いことで知られており、顕微鏡トラッキングシステムの評価によく用いられる。本検証実験では、異なる位置に存在する2体のゾウリムシを対象とし、2体のゾウリムシの同時追跡とそれらの周囲環境の撮影実験を行った。撮影領域は、通常の顕微鏡の撮影範囲の3倍広域となる領域である。図5は、2つの追跡対象であるゾウリムシそれぞれのスナップショットである。これらの図から、提案システムが異なる位置に存在する複数のゾウリムシをそれぞれ同時追跡可能であり、それらの周囲環境も撮影できていることが確認できる。異なる位置に存在する複数対象の同時追跡は世界で初めて実現された事例であり、国際会議で Best Paper Award を受賞するなど、高い評価を受けている。

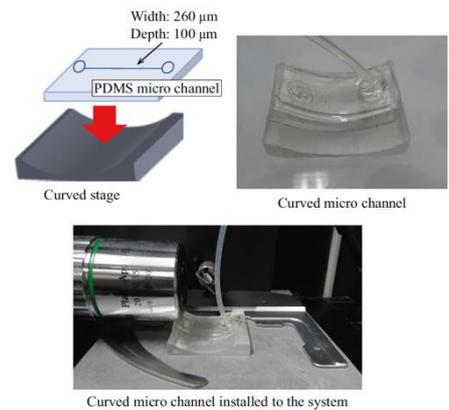


図4 実験環境

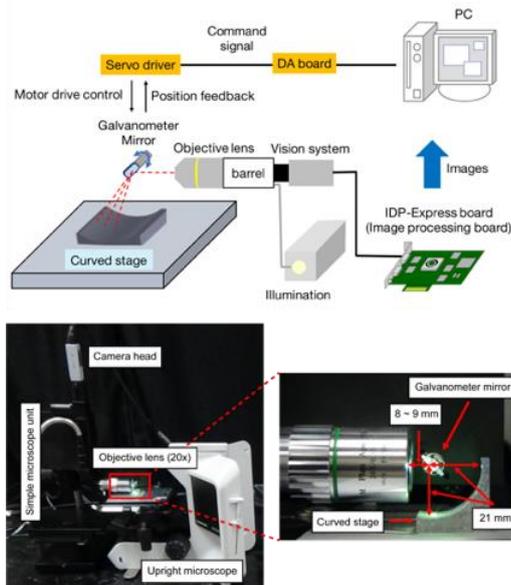


図3 構築システムの構成と外観

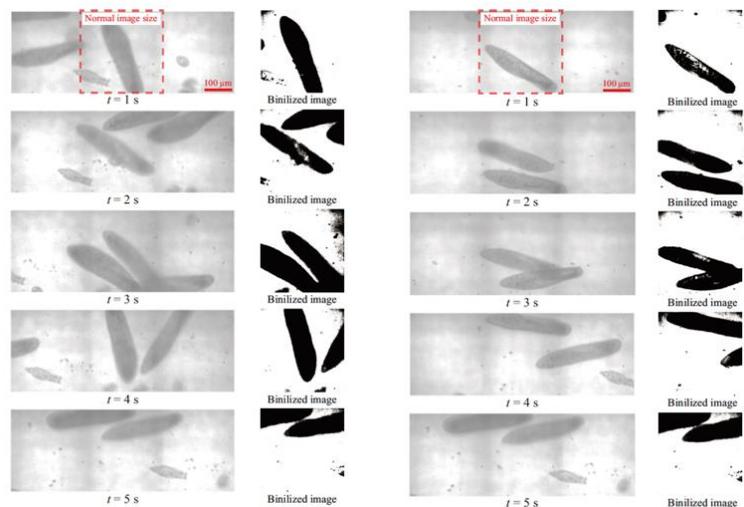


図5 2体のゾウリムシの同時追跡実験

## 4. 今後の研究の見通し

2018年度の研究では、高速電動ミラーによる視線制御と高速ビジョンによる多視点同時撮影により2次元の視野範囲を拡張する顕微鏡システムを用いて、複数のマイクロ対象追跡とその周囲環境の同時撮影を行う視野拡張トラッキング顕微鏡の開発を行った。しかしながら、開発を進めてきた視野拡張トラッキング顕微鏡では、顕微鏡撮影の狭い焦点深度に起因して、観察対象の深さ方向の移動に対応することが困難となっている。

今後の研究では、2018年度の研究で行ってきた2次元平面の視野を拡張する顕微鏡システムに対して、高速アクチュエータによる焦点位置調整機能を実装することで、深さ方向の視野拡張機能を加えた3次元視野拡張顕微鏡システムを開発する予定である。今後の本研究で開発する3次元視野拡張型顕微鏡システムは、運動性微生物の周囲環境の観察、複数の運動性微生物の同時計測による微生物間の運動性評価を可能とする視野拡張トラッキング顕微鏡の改善につながるシステムであり、運動性微生物の走性を解析する革新的技術となり得る。

## 5. 助成研究による主な発表論文、著書名

## 国際会議(査読付)

- S. Takeno, T. Aoyama, M. Takeuchi, Y. Hasegawa and I. Ishii, “Microscopic Image Presentation Apparatus for Micro Manipulation based on the View Expansion Microscope System”, 2018 IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, pp. 326-327, 2018.
- T. Aoyama, S. Takeno, M. Takeuchi, Y. Hasegawa and I. Ishii, “Microscopic Tracking System for Simultaneous Expansive Observations of Multiple Micro-targets Based on View-expansive Microscope”, 2019 IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics, pp. 501-506, 2019.

**(Best Paper Award)**

- S. Takeno, T. Aoyama, M. Takeuchi and Y. Hasegawa, “View-Expansive Microscope with Focus Adjustment Using Galvanometer Mirror and Electrically Tunable Lens”, 2019 IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science. (2019年12月発表予定)
- S. Yamada, T. Aoyama, S. Takeno, M. Takeuchi, and Y. Hasegawa, “Three-dimensional View-expansive Microscope Based on Focal Point Adjustment and Viewpoint Movement”, 2019 IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science. (2019年12月発表予定)

## 国内会議(査読付)

- 青山忠義, 竹野更宇, 竹内大, 長谷川泰久, 石井抱, “高速視線移動により複数の運動性微生物の追跡とそれらの周囲環境の撮影を同時実現する顕微鏡システム”, 第24回ロボティクスシンポジウム, pp.178-179, 2019.