

2019 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 大学院工学研究科
職 位 または 役 職	准教授
氏 名	青山 忠義

1. 研究題目

高速アクチュエータを用いた視線および焦点面制御に基づく三次元視野拡張顕微鏡システムの開発

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。そのため、従来のトラッキング顕微鏡システムでは、追跡対象周りの流れ場や走化性因子の状態などを観察できないことに加え、運動性微生物同士のインタラクションの観察ができず、追跡対象の走性を解析することが困難であった。そこで、我々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、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の開発を進めている。これまで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であった。本申請課題では、従来の視野拡張顕微鏡に対して、高速アクチュエータによる深さ方向の視野拡張機能を加えた三次元視野拡張顕微鏡システムを開発する。具体的には、以下の項目に取り組む。

1. 高速アクチュエータによる焦点位置制御法を実装した三次元視野拡張顕微鏡システムの開発
2. 三次元視野拡張顕微鏡システムの性能評価

3. 研究内容及び成果

本研究では、昨年度まで研究開発を進めてきた視野拡張顕微鏡システムを発展させ、三次元視野拡張顕微鏡システムを提案した。さらに、提案した三次元視野拡張顕微鏡システムにマイクロマニピュレータを実装し、マイクロインジェクションを通したシステムの基本検証を行った。図 1 および 2 に開発したシステムの構成と外観を示す。

構築したシステムは、倒立型顕微鏡 (IX73, OLYMPUS), 簡易型顕微鏡ユニット (KTL-N21B-1, 協和光学), 対物レンズ (LWD95mm 10X, 協和光学), 高速ビジョン (MQ003MG-CM, Ximea), 二軸ガルバノミラー (6210HSM 6mm 532nm, ケンブリッジテクノロジー), 焦点可変レンズ (ETL) (Fast Electrically Tunable Lens EL 10-30-C-VIS-LD-MV, Optotune) 制御用 PC (Windows 10 Home 64bitOS, DESKTOP-U04CFTQ, Intel Core(TM) i9-9900KF CPU3.60GHz, DDR32GB メモリ), D/A ボード PCX-340416 (インタフェース), 光原装置 (LA-HDF158AS, HAYASHI WATCH-WORKS CO., LTD), マイクロインジェクター (FemtoJet 4i, Eppendorf), マイクロインジェクター (CellTram 4r Air, Eppendorf), マイクロマニピュレータ (TransferMan4r, Eppendorf) で構成されている。高速ビジョン最大 500 fps で 640×480 ピクセルの撮影が可能である。垂直上方向から LED 照明によって照らされたマイクロ対象を対物レンズの先に配置されたガルバノミラーを用いて視線を移動させながら撮影する。ミラーの角度に従って発生する光路長の変化に対し、焦点可変レンズを駆動させることによって焦点位置の調整し全ての視点において合焦点画像を得る。

システムの基本動作実験として、ガルバノミラー角度を $-10 \sim 10$ [deg] の範囲においてミラー角度を 0.1 [deg] ごとに変化させ、微細方眼フィルムの撮影を行い、ミラー角度に応じて焦点位置を変化させ、観察対象の鮮明画像の取得が可能であることを確認した。図 3 にミラー角度に対する微細方眼フィルムの取得画像を示す。

最後に、提案システムのマイクロマニピュレーションへの応用に向け、ブタ胚の操作実験を行った。図 4 に検証実験での呈示画像を示す。この基礎実験の結果を生殖工学者と議論し、本システムの呈示画像の解像度やフレームレートは微細操作に支障がないことが確認された。

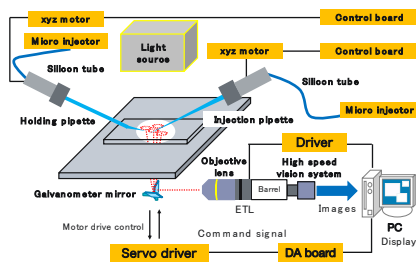


図 1 構築システムの構成

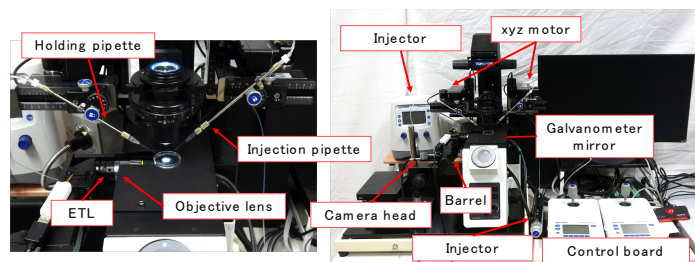


図 2 構築システムの外観

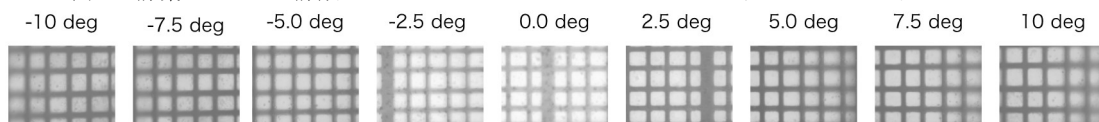


図 3 ミラー角度に応じた取得画像



図 4 胚の操作実験における呈示画像

4. 今後の研究の見通し

今後の研究では、2019 年度までに研究開発してきた 3 次元視野拡張顕微鏡システムを基盤技術とし、マイクロインジェクションへの応用へ向けた微細操作インタフェースの研究開発を行う予定である。顕微授精や遺伝子操作を行うマイクロインジェクションの操作は熟練を要し、操作性向上の必要性が指摘されている。今後の研究開発を通して、これまで熟練を要していたマイクロインジェクションが効率化されれば、医療分野における顕微授精(人工授精)が容易になり、胚培養士(顕微授精を行う医療技術者)に頼ることなく顕微授精が行われ、晩婚化による不妊治療に大きく貢献するだろう。

5. 助成研究による主な発表論文、著書名

学術論文(査読付)

- T. Aoyama, S. Takeno, M. Takeuchi, Y. Hasegawa, “Head-Mounted Display-Based Microscopic Imaging System with Customizable Field Size and Viewpoint”, *Sensors*, 20, 1967; doi:10.3390/s20071967, 2020.
- 藤城俊希, 青山忠義, 杷野一輝, 高須正規, 竹内大, 長谷川泰久, “実時間 3 次元画像呈示により奥行き方向の視認性を向上させるマイクロマニピュレーションシステム” 日本ロボット学会誌「レター」.(査読中)
- T. Fujishiro, T. Aoyama, K. Hano, M. Takasu, M. Takeuchi, and Y. Hasegawa, “Microinjection System to Enable Real-Time 3D Image Presentation Through Focal Position Adjustment”, *IEEE Robotics and Automation Letter*. (査読中)

国際会議(査読付)

- S. Takeno, T. Aoyama, M. Takeuchi, Y. Hasegawa, “View Expansion Microscope based on Viewpoint Movement using a Galvano Mirror and Focus Adjustment using an Electrically Tunable Lens”, *IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*, pp. 241-242, 2019.
- S. Yamada, T. Aoyama, S. Takeno, M. Takeuchi, and Y. Hasegawa, “Three-dimensional View-expansive Microscope Based on Focal Point Adjustment and Viewpoint Movement”, *IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science*, pp. 163-164, 2019.
- T. Aoyama, S. Takeno, K. Hano, M. Takasu, M. Takeuchi, and Y. Hasegawa, “View-expansion Microscope System with Real-time High-resolution Imaging for Simplified Microinjection Experiments”, *IEEE International Conference on Robotics and Automation*. (査読中)

国内会議(査読無)

- 青山忠義, 竹野更宇, 竹内大, 長谷川泰久, “自由な視点選択を伴う広範囲・高解像度撮影が可能な倒立顕微鏡を用いた微細操作システム”, *Robomech2020*, 1A1-L06, 2020.
- 藤城俊希, 青山忠義, 竹野更宇, 竹内大, 長谷川泰久, “細胞操作における奥行き方向の視認性向上に向けた操作対象の実時間 3 次元画像呈示インターフェース”, *Robomech2020*, 1P1-P05, 2020.
- 藤城俊希, 青山忠義, 杷野一輝, 高須正規, 竹内大, 長谷川泰久, “実時間 3 次元画像呈示により奥行き方向の視認性を向上させるマイクロマニピュレーションシステム” 日本ロボット学会学術講演会, *RSJ2020AC2I3-08*, 2020.
- 山田翔輝, 青山忠義, 末松 J. 信彦, 竹内大, 長谷川泰久, “自己駆動液滴の自律運動解析に向けた広範囲・高解像度画像解析システム”, *SICE SI2020*, 2020 年 12 月発表予定.
- 中岡優樹, 青山忠義, 藤城俊希, 竹内大, 長谷川泰久, “2 次元の広域画像と 3 次元の局所画像を同時呈示する微細操作システム”, *SICE SI2020*, 2020 年 12 月発表予定.