

2020年度 永守財団 研究助成 研究報告書

所属機関	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

医療分野の人工授精や分子生物学分野の遺伝子操作のように、細胞内に DNA などを注入するマイクロインジェクションが行われている。マイクロインジェクションの典型的なプロセスを図に示す。インジェクション前後の細胞を混同しないよう、作業空間を3つに分け、作業空間1から2へ細胞を移動させ、インジェクションを行い、作業空間2から3へ細胞を移動させる。その際、作業空間1から2、作業空間2から3へ細胞を移動させるためには、広域な画像提示が必要であるのに対し、作業空間2におけるインジェクションでは、高解像度(高倍率)画像により、デプス方向の焦点位置も合わせた上で、細胞の極体や核の位置などを確認しながら微細作業を行うことが求められる。現在、対物レンズの倍率を手動で変更することで広域画像と高解像度(高倍率)画像の変換を行っている上、対物レンズに対応した光量の調整も手動で行っている。さらに、デプス方向の焦点位置調整も操作対象の焦点ボケを目視で確認しながら手動で行っている。そのため、マイクロインジェクションの操作には熟練を要し、操作性向上の必要性が指摘されている。このような背景から、本研究ではマイクロインジェクションの効率化・簡略化を図る微細操作システムの開発を目的とする。

我々の研究グループでは、1~2年目の永守財団研究助成において、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、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3次元視野拡張顕微鏡の開発を行ってきた。これまで開発を進めてきた視野拡張顕微鏡は、広域・高解像度・高深度撮影を満たす顕微鏡画像の実時間取得を可能とするものである。この広域・高解像度・高深度撮影を満たす顕微鏡の画像提示インタフェースを伴う微細操作システムを開発することで、マイクロインジェクションの効率化が可能であると考え、本研究課題の申請に至った。具体的には、I. 3次元視野拡張顕微鏡を用いた微細操作システムの開発、II. 開発システムの評価、の研究項目について取り組む。

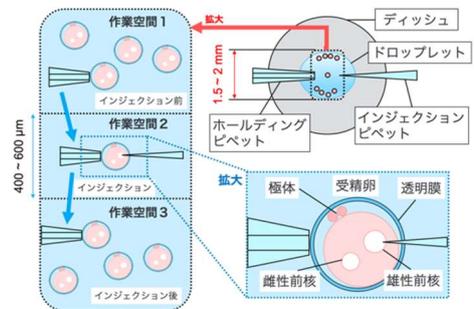


図 マイクロインジェクションのプロセス

3. 研究内容及び成果

本研究では、昨年度までに開発を進めてきた三次元視野拡張顕微鏡システムに対して、マイクロコンピュータを実装し、微細操作の3次元映像をリアルタイムで操作者へ呈示するインターフェースを開発した。

図 1 及び 2 に構築したシステムの概要と外観をそれぞれ示す。提案システムは、倒立型顕微鏡 (IX73, OLYM-PUS), 対物レンズ (LWD95mm, 10X, ミットヨ), 高速ビジョン (MQ003MG-CM, Ximea), 焦点可変レンズ (EL-10-30-C-VIS-LD-MV, Optotune), レンズドライバ (Lens Driver 4, Optotune), 2 軸ガルバノミラー (6210HSM 6mm 532nm, ケンブリッジテクノロジー), 制御用 PC (OS Windows 10 Home 64bit, CPU Intel(R) Core(TM) i9-9900KF 3.60 GHz, メモリ 32GB RAM, GPU NVIDIA GeForce RTX 2080 SUPER), D/A ボード PCX-340416 (インターフェース), 光源装置 (LA-HDF158AS, ハヤシレピック株式会社), 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), マイクロコンピュータ (TransferMan4r, Eppendorf), ホログラムディスプレイ (The Looking Glass 15.6" Pro, Looking Glass Factory Inc) で構成されている。対物レンズの倍率は 10 倍であり, ワーキングディスタンスは 33 mm である。高速ビジョンの画素ピッチは 7.4 μm であり, 640 \times 480 画素, 最大 500 fps での撮影が可能である。

提案システムを用いて, ブタ胚, ホールディングピペット, インジェクションピペットの再構成した3次元画像をホログラムディスプレイに実時間で呈示し, ブタ胚を微細操作する実験を行った。図 3 にマニピュレーション時にカメラから取得した画像, 図 4 にホログラムディスプレイに呈示された3次元画像を示す。3次元呈示画像のフレームレートは 25 fps である。生殖工学者による検証により, 本システムによってマイクロインジェクションの効率化が期待できること, フレームレートは微細操作に十分であることを確認した。また, 微細作業の作業時間を指標とした被験者実験を行い, 提案システムが有意であることも確認した。

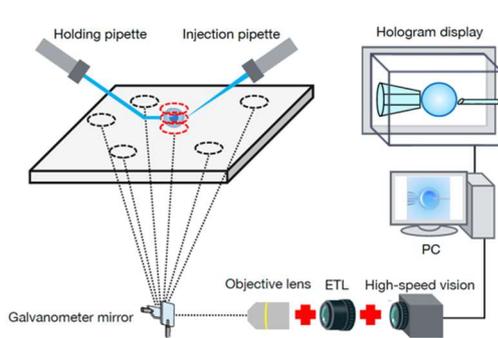


図 1 構築したシステムの概要



図 2 構築したシステムの外観

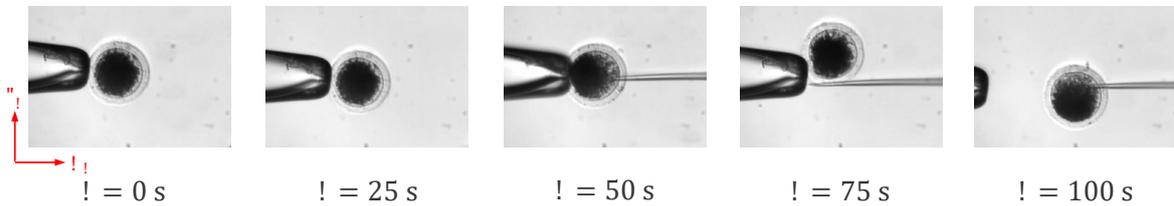


図 3 カメラによる通常の呈示画像

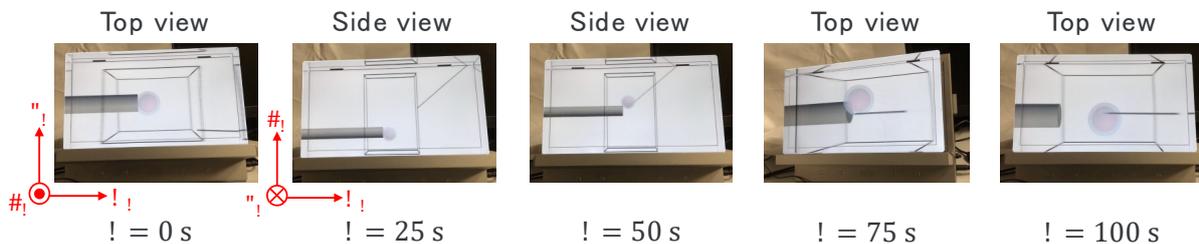


図 4 提案システムにより呈示した 3D 画像

4. 今後の研究の見通し

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。今後の研究では、生殖補助医療の顕微授精への応用を見据え、開発した微細操作インタフェースを用いて、ブタの胚に対するマイクロインジェクションの実験を行い、ブタの胚の発生過程を検証する。胚培養士のトレーニングでも用いられるブタの卵子や胚を用いた開発システムの有効性評価は、前臨床試験に該当する。ここで開発システムの有効性を明らかにできれば、速やかに臨床試験へ進められると考えられる。

5. 助成研究による主な発表論文、著書名

学術論文(査読付)

- 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, Vol.39, No.5, pp.467-470, 2021.
- 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, Vol.6, No.2, pp.4025-4031, 2021.

国際会議(査読付)

- 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, pp.12961-12966, 2021.
- 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 International Conference on Robotics and Automation, 2021. (RA-L option)
- T. Aoyama, S. Yamada, N. J. Suematsu, M. Takeuchi and Y. Hasegawa, “Visual Sensing System to Investigate Self-propelled Motion of Aqueous Droplets Using View-expansive Microscope”, IEEE International Conference on Advanced Robotics and its Social Impacts, pp.123-124, 2021.
- K. Yokoe, T. Aoyama, T. Fujishiro, M. Takeuchi, Y. Hasegawa, “High-speed and High-accuracy Immersive Micro Manipulation System Using 3D Image Display Microscope and Glove-type Operation Interface”, IEEE International Conference on Advanced Robotics and its Social Impacts, pp.107-108, 2021.
- T. Fujishiro, T. Aoyama, M. Takeuchi, and Y. Hasegawa, “Accuracy Evaluation of Microinjection Using Real-time 3D Image Presentation System”, International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2021. (2021年12月発表予定)

国際会議(査読なし)・国内会議

- 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”, 第21回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, pp. 1385-1386, 2020.
- 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”, 第21回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, pp. 1391-1392, 2020.
- 横江健太, 青山忠義, 藤城俊希, 竹内大, 長谷川泰久, “実時間 3次元画像呈示顕微鏡とグローブ型操作インタフェースを用いた没入型マイクロマニピュレーションシステム”, Robomech2021, 2021.
- 藤城俊希, 青山忠義, 杷野一輝, 高須正規, 竹内大, 長谷川泰久, “力覚フィードバックを伴う実時間 3次元画像呈示微細操作システム” 第39回 日本ロボット学会学術講演会, 2021.

受賞

- 第2回 日本ロボット学会 優秀研究・技術賞