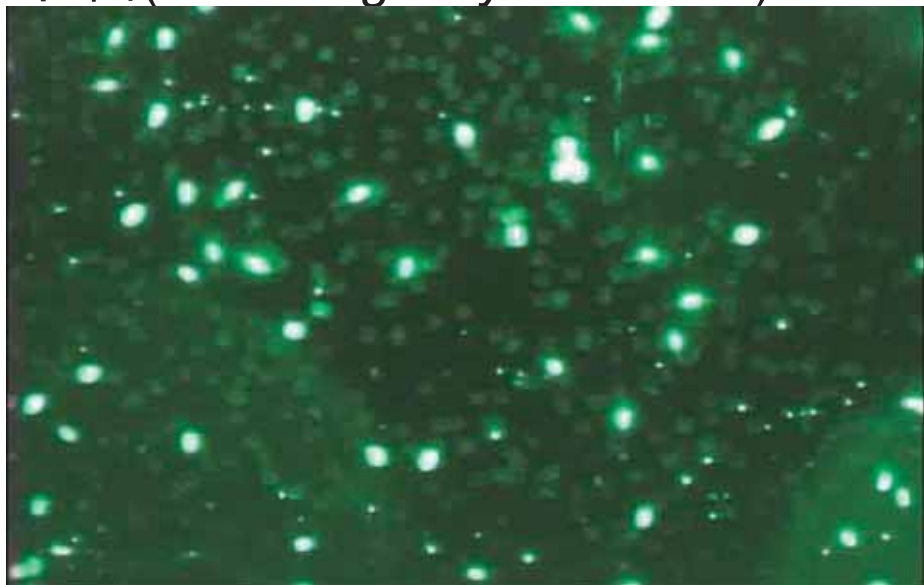


二方向観察による三次元顕微鏡システムの開発

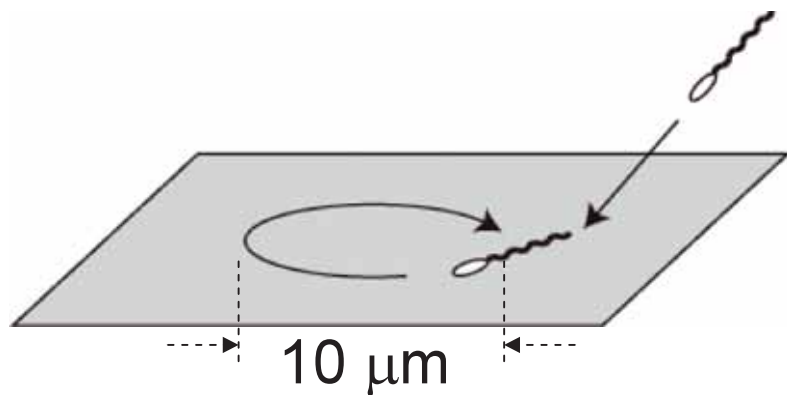
鳥取大学 大学院工学研究科
機械宇宙工学専攻
助教 中井 唱

背景

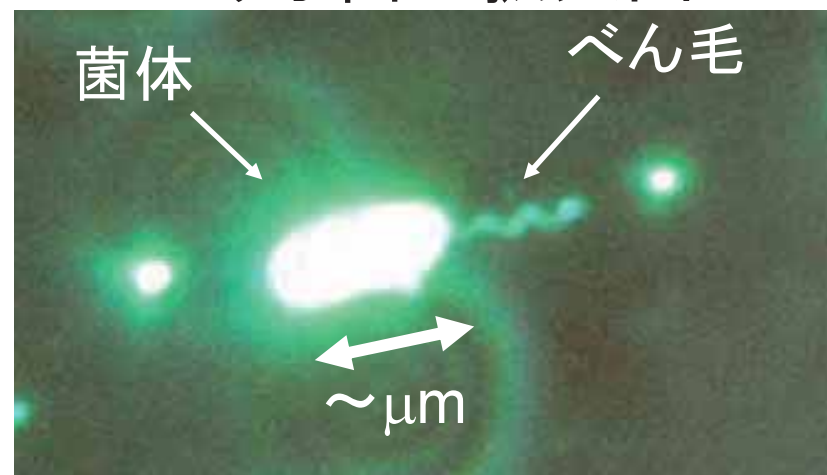
溶液中(界面近傍)を遊泳する単毛性細菌(*Vibrio alginolyticus* YM4)



界面近傍での運動



ビブリオ菌の拡大図



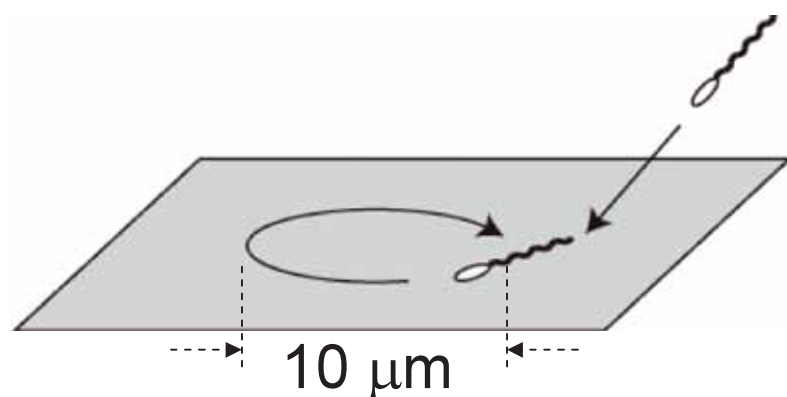
界面(固体・自由表面)の遊泳運動への影響(Nakai et al., 2009)

- 遊泳速度の変化
- 遊泳軌跡の変化
- 界面近傍に集まる傾向

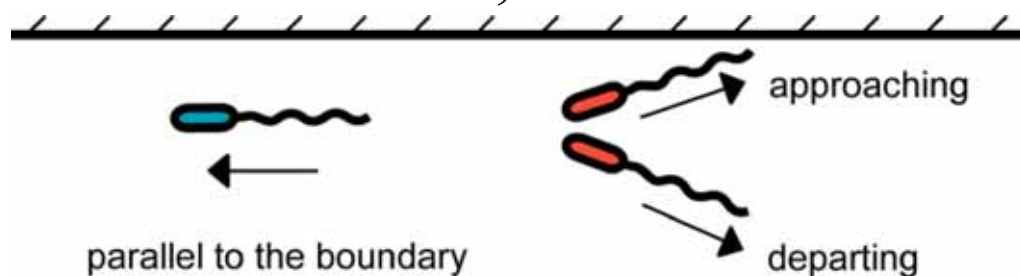
解決したい課題

微小物体の三次元位置・姿勢情報を広範囲で計測したい

界面近傍での運動



数値計算：界面近傍での挙動を予測 (Goto et al., 2005)



自由空間では直進するが、境界近くでは円軌道を描く



境界の影響を調べるには、三次元観察が必要

研究目的

自由表面までの距離，菌の姿勢の実験的調査

遊泳運動の詳細な3次元情報が必要

従来の3次元顕微鏡観察法

追跡型顕微鏡

全焦点型顕微鏡

像の輪郭パターンを検出し，焦点面からのズレを計測

短所

奥行き方向の解像度が焦点深度程度しかない
対象物が小さい(数 μm)と，輪郭が検出できず測定不可能

大きさが数 μm のビブリオ菌の観察には使えない

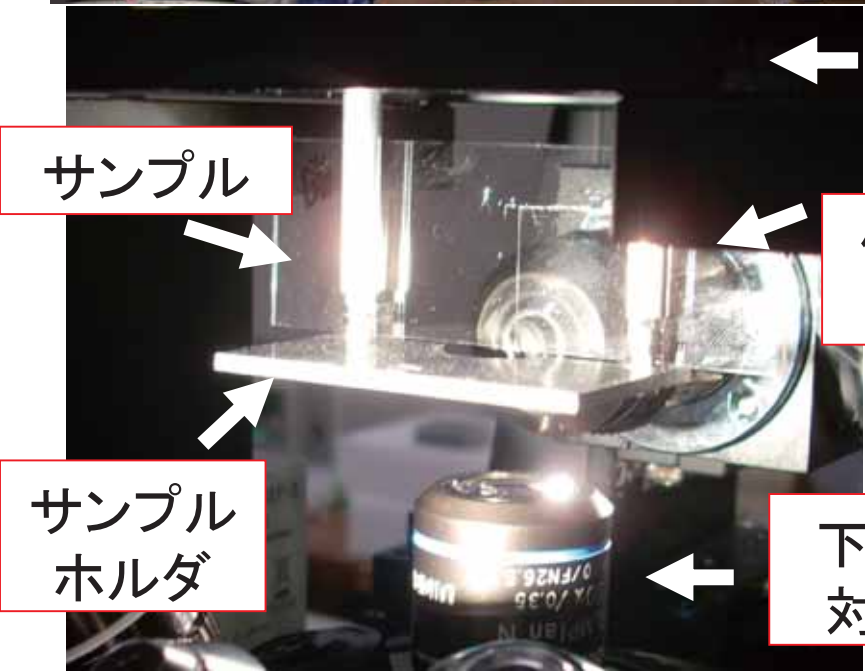
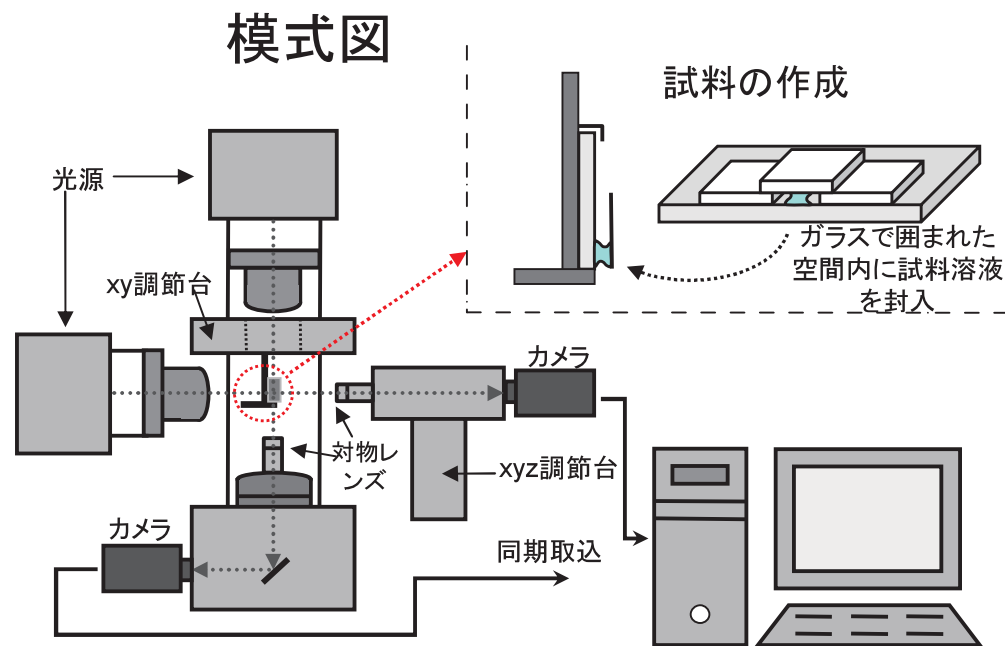
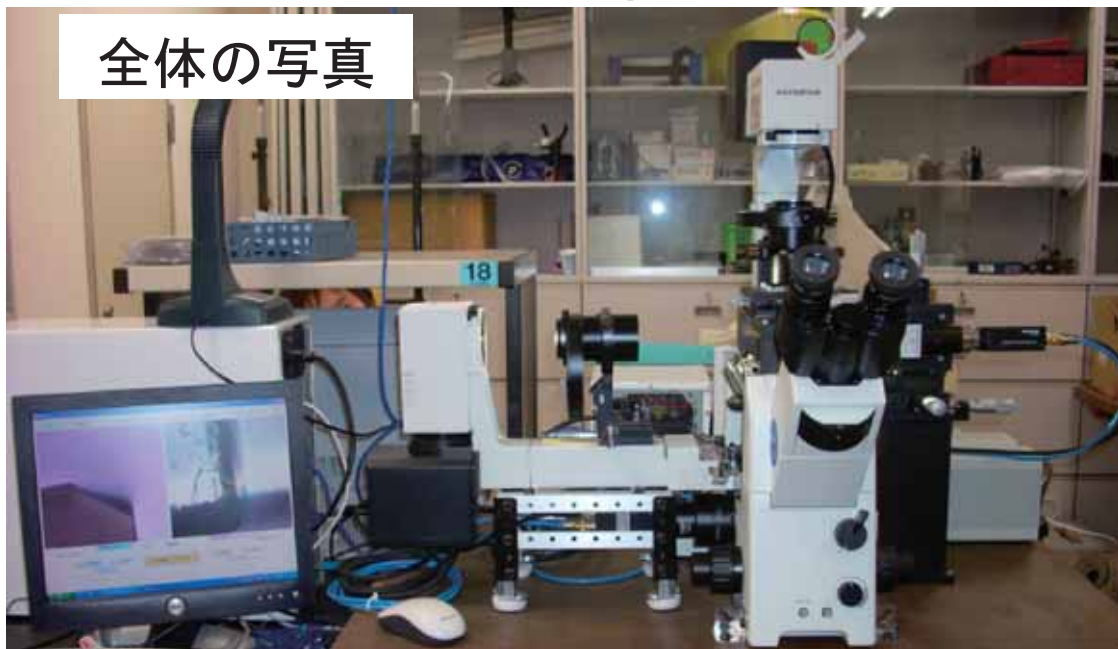
目的

全く新しい3次元顕微鏡システムの開発

前進，**後退**運動における自由表面までの距離，菌の姿勢と
遊泳速度，曲率の関係調査

技術内容・実施例

下・横からの同期観察ができる顕微鏡



サンプル

サンプルホルダ

xyステージ(サンプルホルダの位置決め)

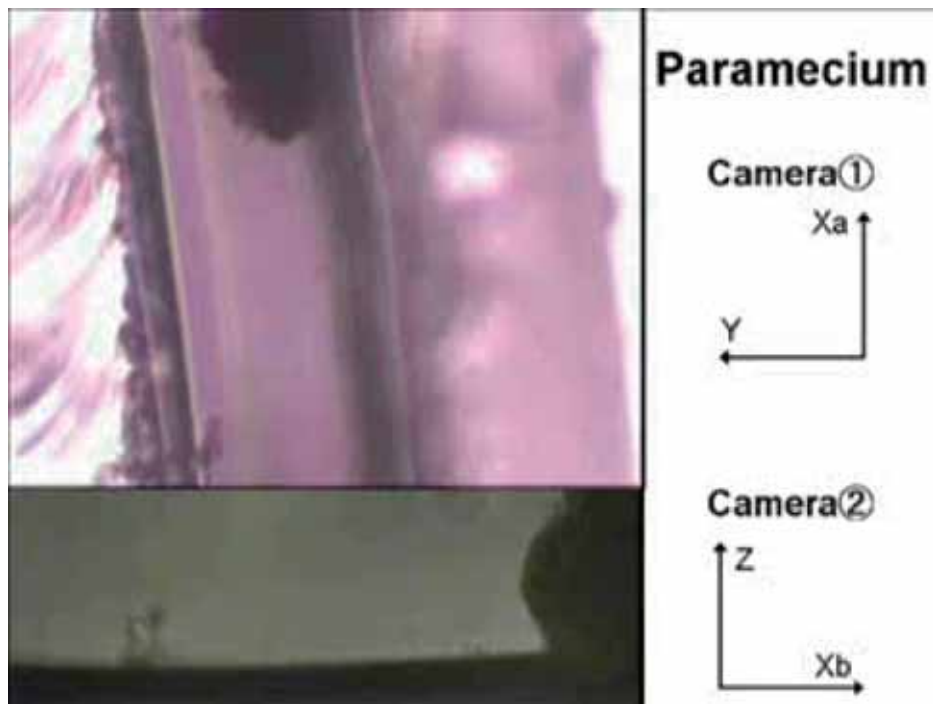
側方観察用対物レンズ

下方観察用対物レンズ

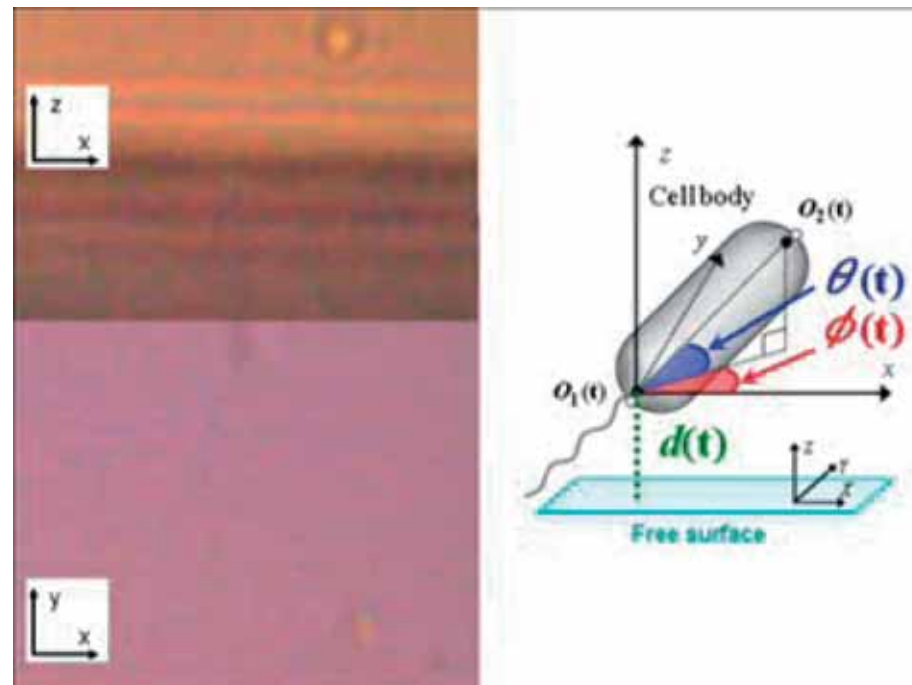
- 対物レンズどうしがぶつからないよう、長作動レンズを用いた
- 2方向以上から観察できるように、サンプルホルダの形状を工夫(xyステージから吊り下げる)

2方向からの観察像

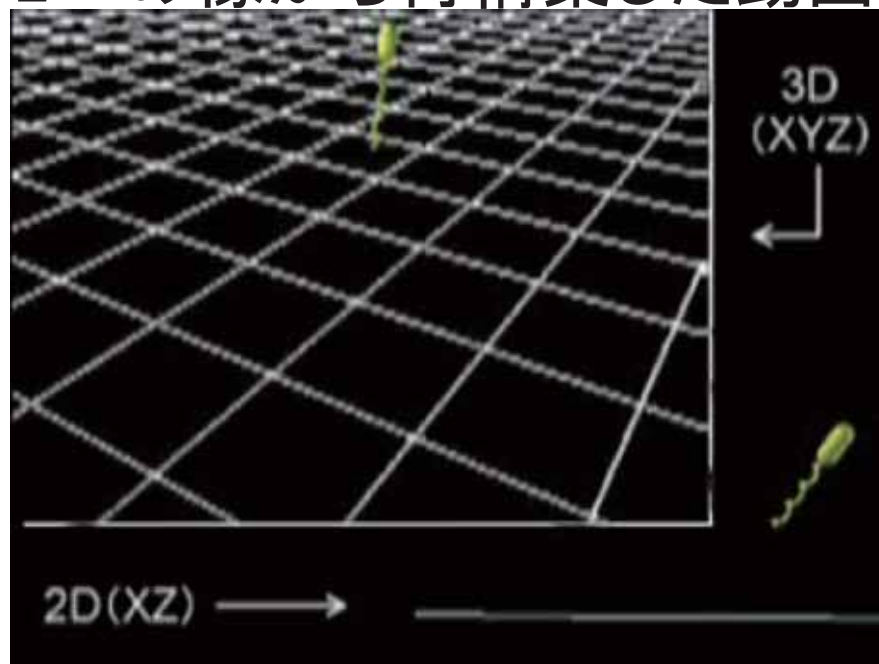
ゾウリムシ (大きさ $100 \mu\text{m}$)



ビブリオ菌 (大きさ数 μm)



2つの像から再構築した動画



発明の構成

レンズどうしがぶつからないよう、長作動対物
レンズを用いた多方向からの観察

追跡できないため、すぐに焦点
面から外れる

測定値の補正

菌体の先頭、後方位置の座標を取得し、2点間
の距離から菌体の長さ L を算出

各フレームにおける L の平均値を $L_{ave.}$ とする

「長さが $L_{ave.}$ 」の拘束条件の下、計測点からのズレが最小と
なる先頭・後方の座標値を未定乗数法により求める

ピンボケなどによる誤差を除去

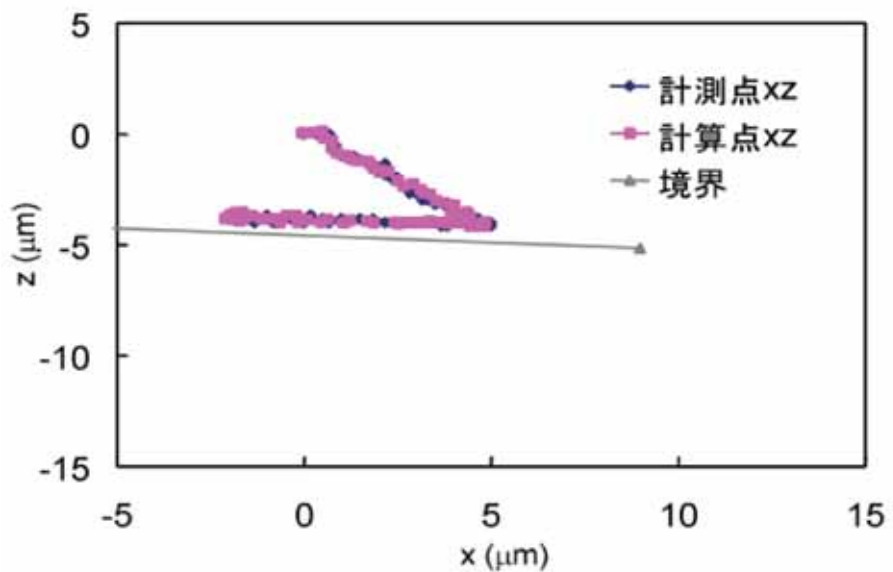
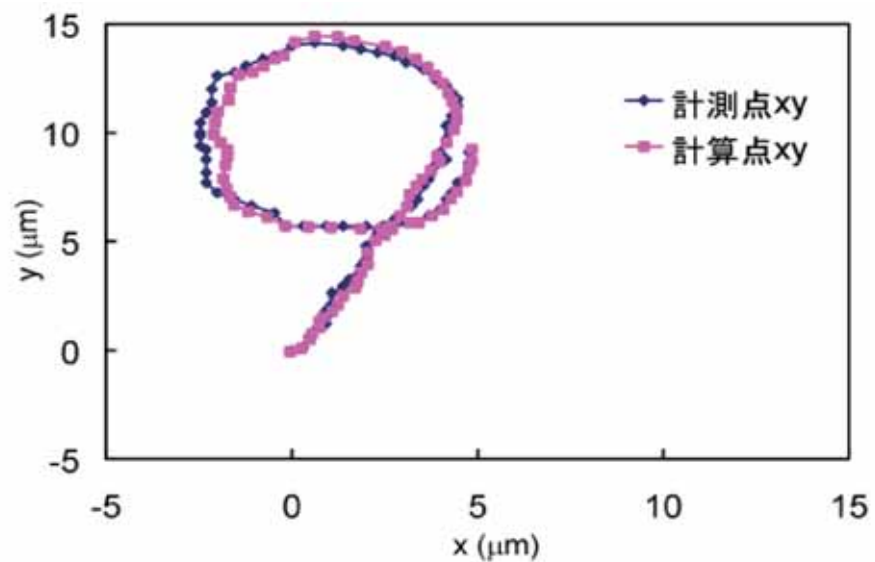
境界に垂直な面内の観察が
困難(光の反射による)

2枚の透明物体(ガラ
ス)の間に試料溶液を
はさみこみ、小さな境
界面をつくる

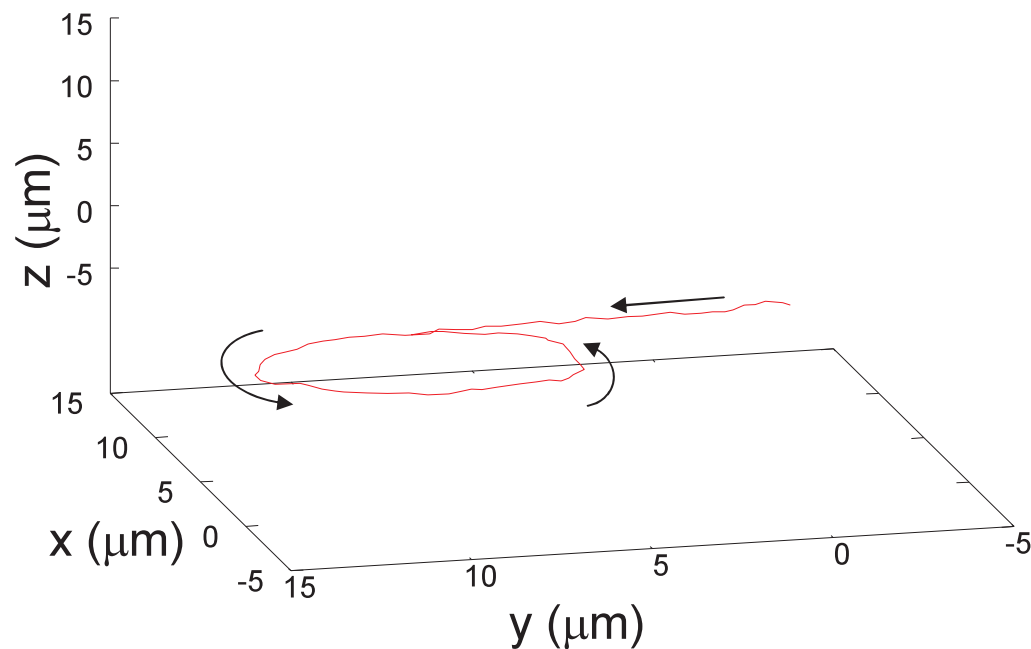
2つの映像の結合は手動。

計測結果(位置に関する3次元情報)

菌体の位置座標

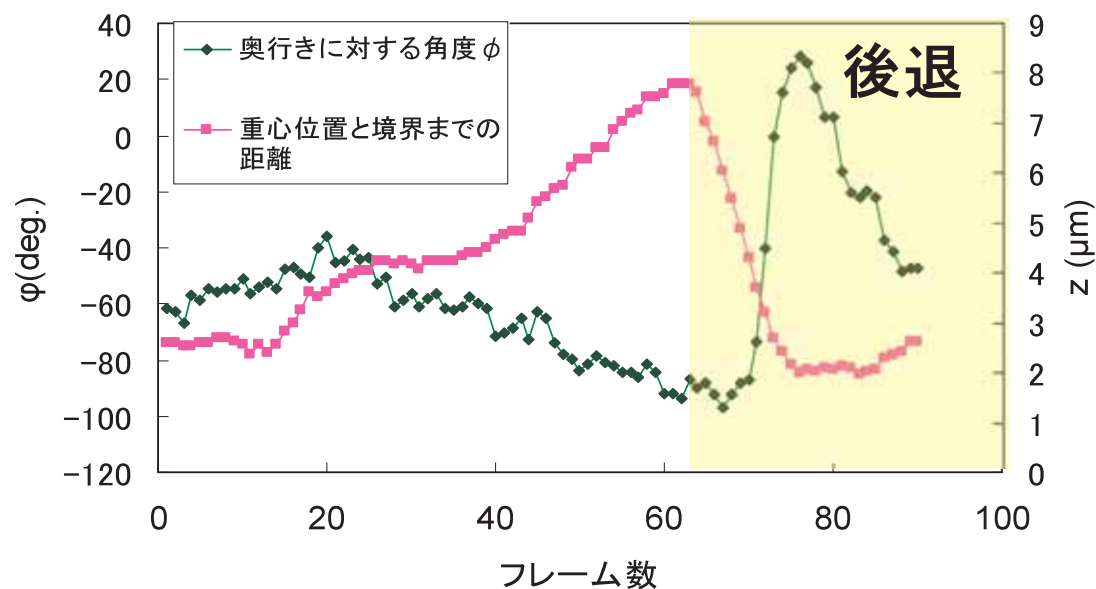
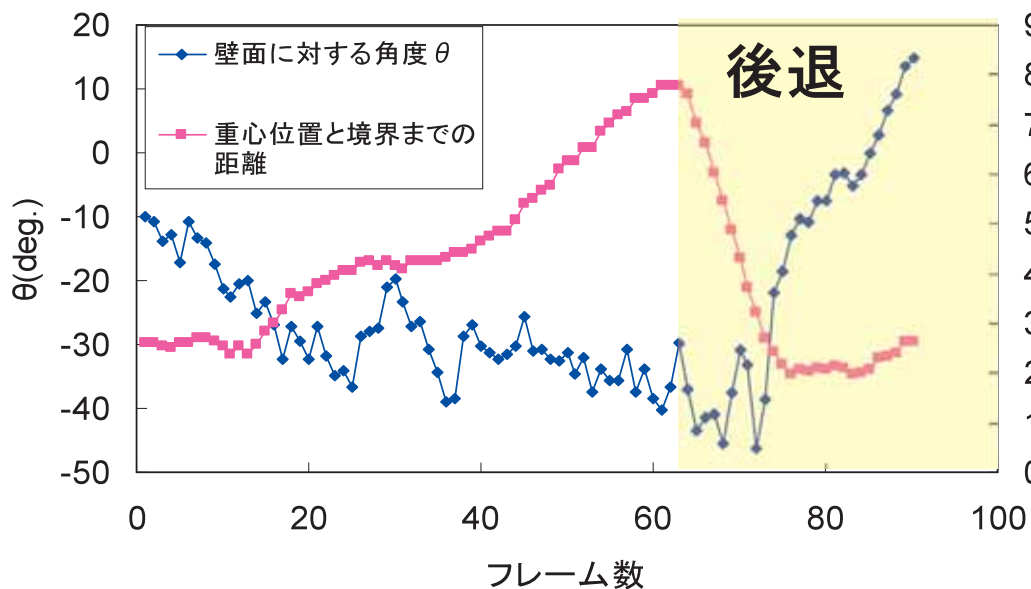


三次元グラフ



大きさ数 μm の菌の三次元位置情報が得られる

計測結果(回転に関する3次元情報)



後退運動

壁面近傍に近づくにつれて θ が大きく変化
 ϕ の変化が前進時に比べて大きい

菌の角度と壁面距離の関係をデータとして取得できた

従来の三次元顕微鏡観察法と問題点

像の輪郭パターンを検出し、焦点面からのズレを計測

追跡型顕微鏡

対象物が焦点面に入るよう、
自動で試料の位置を動かす

短所:

- ・奥行き方向の解像度が焦点深度の程度しかない
- ・対象物が小さい(数 μm)と、輪郭が検出できず測定不可能
- ・対象物の姿勢(回転)に関する情報は得られない

全焦点型顕微鏡

対物レンズを高速で走査し、
焦点面に入った部分のみを検出し、
三次元像を構築する

短所:

- ・奥行き方向の解像度が焦点深度の程度しかない
- ・対象物が小さい(数 μm)と、輪郭が検出できず測定不可能
- ・対物レンズ走査方向の可測定範囲が制限される

新技術の特徴、従来技術との比較

- 対物レンズの焦点深度の数倍の範囲において測定可能(今回用いた対物レンズの焦点深度は数 μm 、可測定範囲は $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$)
- 解像度が焦点深度に依存しない(今回の場合は $1\ \mu\text{m}$ 以下)
- 従来の輪郭検出による手法よりも安価な装置(200万円程度)

想定される用途

- 3次元マイクロPTV,PIV(流れ場計測)
- ブラウン運動が境界から受ける影響
- 精子(大きさ数 μm)の三次元らせん運動の観察

想定される業界

利用者・対象

- 顕微鏡メーカー、医療、微小空間の流体研究、その他3次元観察が有用な微小対象物

実用化に向けた課題

- 現在、手作業で2つの映像を解析することで何とか3次元観察が可能となっているが、時間がかかる。電動ステージなどで自動で光軸合わせを行い、自動粒子認識か何かの技術を用いて2つの映像の対応付けをスムーズに行うことが重要である。
- 測定の精度向上
- チャンバー形状の工夫

企業への期待

- 画像処理、画像認識の技術導入により、先述の解析時間は大幅に短縮されると思われる。
- また、3次元マイクロPIV, PTVを開発中の企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 三次元顕微鏡装置及び同装置を用いた観察・測定法
- 出願番号 : 特願2009-035171
- 出願人 : 鳥取大学
- 発明者 : 後藤 知伸、中井 唱、菊田 誠之

お問い合わせ先

鳥取大学 産学・地域連携推進機構
知的財産管理運用部門長・教授

佐々木 茂雄

TEL 0857-31-6000

FAX 0857-31-5474

e-mail s.shigeo@cjrd.tottori-u.ac.jp

顕微鏡の仕様

- 顕微鏡本体: IX71 (Olympus)
- 側方観察用顕微鏡: VM-1V (メイジテクノ)
- 対物レンズ:
 - 側方 LUCPlanFLN40× (N.A. = 0.60, W.D. = 2.7 —4)
 - 下方 SLMPLN50× (N.A. = 0.35, W.D. = 18)
- 照明: ×2セット(いずれもOlympus社)
 - 透過照明支柱 IX2-ILL100
 - ランプハウス U-LH100L-3
 - 外部電源 TH4-100
 - コンデンサ(PHL, PH2内蔵) IX-ULWCD
- カラーCCDカメラ: CS230B (Olympus) × 2台 → 同期撮影可能な高速度カメラ(朋栄)に変更予定
- xyzステージB71-80A (駿河精機、側方顕微鏡の位置決め)
- xyステージB27-100C (駿河精機、サンプルホルダの位置決め)
- 画像同期取り込みボードDFG-MC4(アルゴ)

2つのレンズの共通視野が3次元計測可能な範囲(およそ20 μm × 20 μm × 50 μm)