

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21246040

研究課題名（和文） 生物行動解析のためのビジュアルサーボ顕微鏡

研究課題名（英文） Visual Servo Microscope for Analysis of Animal Behavior

研究代表者

橋本 浩一 (KOICHI HASHIMOTO)

東北大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号：80228410

研究成果の概要（和文）：顕微鏡ステージのリアルタイム制御により観察対象の運動を追跡する顕微鏡装置を開発し、多様な刺激に対する生物の反応を多様な観察手法で高い時間・空間分解能で解析・記録する装置を作成した。とくに、多細胞生物のモデル生物として多くの研究に用いられている線虫（*C. elegans*）を明視野ならびに蛍光観察できるシステムを実現した。これにより、各種刺激に対する受容器の反応、神経ネットワークの解析、体内状態の変化、モータへの影響、最終的には行動の変化まで、階層的かつ連鎖的な反応の解明を行った。

研究成果の概要（英文）：We have developed a microscope system that tracks a target animal motion by using real-time control of motorized stage. The system can analyze and record the response of the target animal with high time and space resolutions. Especially, we have realized a system to observe *C. elegans* in bright field as well as in fluorescence images simultaneously. *C. elegans* is widely used for many purpose as a model animal. Thus the system is contributing in many fields including sensor response, neural network analysis, internal neural state analysis, motor control, and also animal behavior.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	16,100,000	4,830,000	20,930,000
2010年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
総計	35,600,000	10,680,000	46,280,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：情報機器・知能機械システム

### 1. 研究開始当初の背景

温度刺激に対する線虫の神経活動変化を高い時間分解能で調べることにより、温度知覚に関与する神経細胞の同定と神経細胞ネットワークの推定が可能になると考えている。さらに神経ネットワーク活動の出力としての行動変化も計測したい。そのためには、神経細胞に蛍光タンパク質を発現させ、運動を

計測・トラッキングしながら神経活動の活性度を調べる必要がある。つまり、高精度の運動追跡装置と高時間分解能の蛍光観察装置と活動記録装置が必要である。

これまでに研究代表者らはロックオントラッキング顕微鏡を開発してきた。ゾウリムシやホヤ精子などの運動計測に用いている。しかしこの装置で追跡できる対象は細胞一

個体であり、明視野に限定される。

本研究では、蛍光観察と明視野観察を両立するシステムを開発する。具体的には、ロバストな画像処理手法を確立し、速度向上を図る。さらに、多細胞生物の運動を追跡し、同時に神経活動を計測・自動解析するシステムを開発する。このようなシステムは研究者の悲願であると共に、実現できれば医学・生物学の研究手法を劇的に改善すると考える。

## 2. 研究の目的

(1) ビジュアルサーボと高速ビジョンシステム：ビジュアルサーボとは画像処理にフィードバック制御の概念を取り込んだ理論的枠組みであり、カメラを用いたロボット制御の最適化や、外乱にロバストな画像処理手法などを制御理論を用いることで安定に構築できる。また、これまでに1000fpsを超える超高速で撮影・画像処理可能なビジョンシステムを開発しており、ロボット制御の高度化を実現している。本研究で開発する顕微鏡はビジュアルサーボ技術が基盤となる。

(2) ロックオントラッキング顕微鏡：ビジュアルサーボを適用すれば、運動する細胞を追跡することが可能になる。細胞が活動している容器をXYZステージに固定し、細胞の動きをカメラで観察し、画像処理して、ステージをフィードバック制御する。これにより運動する細胞を高い時間分解能で長時間、フォーカスの合った状態で観測できる。ロックオントラッキング顕微鏡開発の実績と経験が本研究の基盤となる。

(3) 画像処理の高度化：隠れや外交の変化にロバストな画像処理アルゴリズム、高い時間分解能の蛍光観察装置、高精度での3次元トラッキングが可能なビジュアルサーボステージ、行動解析ソフトウェア、運動予測アルゴリズムなどを統合的に開発することで、線虫の神経活動変化を高い時間・空間分解能で計測し、神経細胞ネットワークの機能解明を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では、運動する生物を追跡するための画像処理アルゴリズムと顕微鏡ステージ制御手法を開発する。明視野観察でビジュアルサーボを行い、蛍光観察で生体現象を記録する。明視野観察には高速のCMOSまたはCCDカメラを、蛍光観察にはEM-CCDカメラを用いる(図1)。

明視野光と蛍光の波長の違いを利用してフィルタを設計することにより、それぞれの通過波長を指定する。明視野画像の解析とトラッキング(画像取得・画像処理・ステージ制御のループ)周期は1000fps程度で、蛍光画像解析はサーボの補助も視野に入れて、100fps程度を目標とする。ビデオ記録は長時

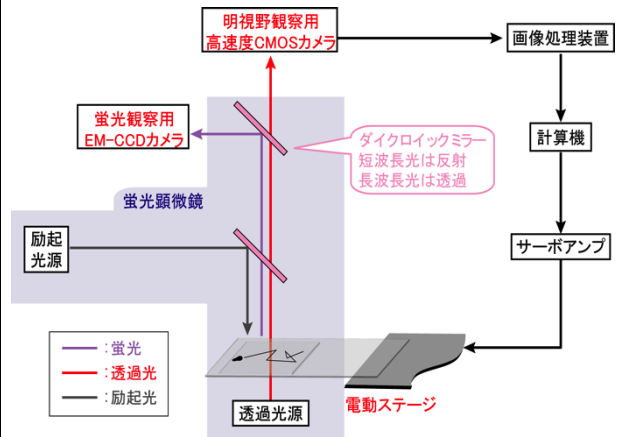


図1 顕微鏡装置ブロック図

間観察の目的のため、明視野観察と蛍光観察を同時に10fps程度に間引くものとする。

(1) ロバストトラッキング・フィルタリング：線虫の頭部拡大画像を手がかりとしてパターンマッチングにより運動追跡する。対象は半透明で、大きく変形し、回転もするので、手がかりとなるテクスチャは変形する。このような状況でも対処できるパターンマッチングアルゴリズムを開発する。

(2) 蛍光画像鮮明化：GFPなどのタンパク質標識やイオンプローブの発する蛍光は強度が低く、確率的に明度が変動するため、通常は対象を静止させて長い露光時間で観察する。しかし、本研究で想定する用途は、運動対象の高時間分解能計測であり、対象の運動予測やフィルタリングと併用して鮮明化を行う必要がある。

(3) オートフォーカス：顕微鏡で観測できるのは対物レンズのフォーカス面で切断した断面画像に、その近傍の物質の回折像が重畳したものである。対象は2次元平面上を動くが、培地の凸凹や生体変形のため、Z方向にステージを微調整してフォーカスを適切に対象位置に合わせる必要がある。この位置推定はある種の逆問題となるので、この逆問題を解析的・数値的にリアルタイムで解くアルゴリズムを開発する。

(4) 行動解析・神経解析：明視野観察画像の解析と行動分析は高い時間分解能で行い、分析結果のみをレジストレーションすることでデータ圧縮を行う。それと同時に低い時間分解能で画像記録も行う。さらに蛍光画像解析をリアルタイムで行って、行動や神経活動の重要度にしたがって解析画像を記録する。

(5) 画像処理高速化：高速なパターンマッチングアルゴリズムの開発、並列処理化を行い、高速処理を達成する。GPU(Graphic Processing Unit)を利用して、1000fpsを達成する。基本的に非線形最適化として定式化されるので、ビジュアルサーボ技術の応用が

重要な鍵となる。

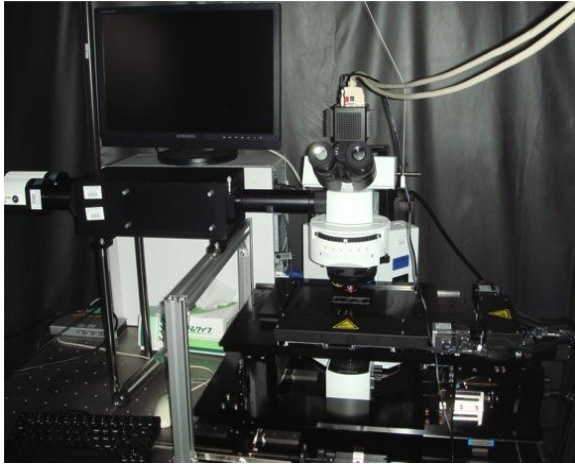


図2 トラッキング顕微鏡。上部ポートに高速カメラを、サイドポートに高感度カメラを設置する。高速カメラの画像をPCで処理し、ステージにリアルタイムフィードバックする。これにより観察対象の動作をキャンセルすることができる。

(6) 刺激に対する反応の計測：タップ刺激・温度刺激・匂い刺激・塩分刺激などの刺激に対し、神経活動ネットワークの反応を記録・解析し、ネットワーク機能の解明を行う。共同研究体制を確立し、研究期間内において工学と理学・医学との真のコラボレーションを実現する。

#### 4. 研究成果

(1) トラッキング顕微鏡：平成 21 年度から 23 年度までに、研究計画の項目 (1) について研究を進め、対物レンズ 40 倍での高解像度トラッキングの結果を得た。開発したトラッキング装置を図 2 に示す (Fei, Igarashi, Shinkai, Ishikawa, Hashimoto, 2009, 小原、五十嵐、橋本, 2011, Maru, Igarashi, Arai, 2010, Obara, Igarashi, Hashimoto, 2010, Maru, Chen, Hashimoto, 2011)。基盤研究 (A) と同時に採択された新学術領域研究「神経系の動作原理を明らかにするためのシステム分子行動学」の補助を得て、この装置と画像処理アルゴリズム (図 3) を用いたいくつかの共同研究 (飯野教授 (東大)、中井教授・安藤准教授 (埼玉大)、木村准教授 (阪大)) が実施され、また、共同研究者からのフィードバックにより装置・アルゴリズムが改良され、共同研究成果として学会発表に至っている (Satoh, Maru, Hashimoto, Iino 2011, Tanimoto, Yamazoe, Hashimoto, Kimura, 2012a, Tanimoto, Yamazoe, Hashimoto, Kimura 2012b)。新学術領域以外の共同研究として、森教授・塚田助教 (名大) とトラッキング顕微鏡に関する学会発表を行っている (Tsukada, Chen,

Yokoyama, Hashimoto, Mori, 2012,

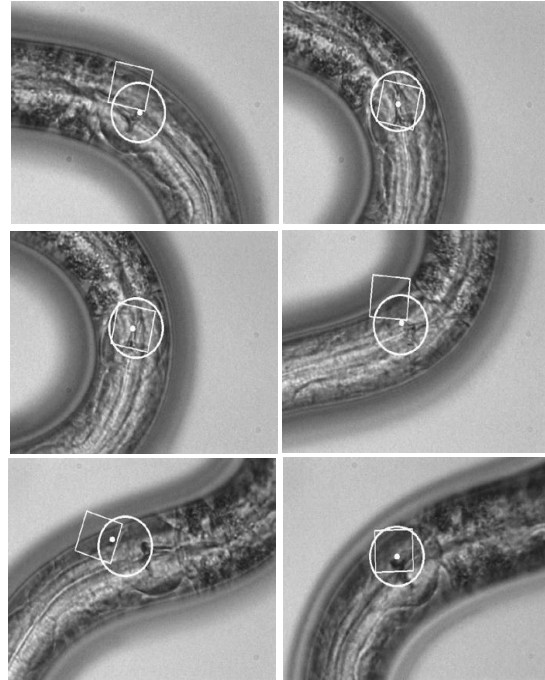


図3 パターンマッチングとフーリエ変換を用いて、変形と模様変化にロバストなアルゴリズムを実現し、トラッキング装置と連動させて線虫の動きを追跡している。

Yokoyama, Tsukada, Chen, Hashimoto, Mori, 2012)。

(2) 蛍光画像解析ソフトウェア：オンライントラッキングだけでなく、蛍光画像ビデオをオフラインで解析するソフトウェアを開発した。3次元の細胞アライメントに関して石原教授・寺本助教 (九大) と共著で論文を発表した (Fei, Teramoto, Ishihara, Hashimoto, 2012)。2次元の神経活動解析ソフトウェアを用いた木村准教授 (阪大) との共同研究は発表準備中である。

(3) トラッキングソフトウェアの高速化：トラッキング性能を向上するためには、フィードバック制御ループの高速化が必須である。そのためには、画像処理アルゴリズムの高速化を行った。具体的には、GPU (Graphic Processing Unit) を用いた高度並列化を行い、さらに CPU と同時並行処理するアルゴリズムを開発した。これにより、パターンマッチング処理が CPU だけ利用の場合と比較しての 10 倍程度の高速化を達成した (Zang, Hashimoto, Moon, 2011, Zang, Hashimoto, 2011)。

(4) 光刺激装置とトラッキング顕微鏡との統合：研究計画執筆時には開発されていなかった技術であるが、オプトジェネティクスがここ 2, 3 年で急速に発展した。本研究においてもこの技術を利用すべく研究計画を変更して、線虫の光刺激装置を開発した。こ



図4 ゼブラフィッシュトラッキング装置。XYZ ステージで高速カメラをホールドし、高速カメラの画像をPCで処理してステージを制御する。

れを用いた線虫の行動制御のデモは国際的に注目をされ、国際学会において招待講演を行った (Hashimoto, Fei, 2012)。

(5) ゼブラフィッシュのトラッキング装置開発：これも、研究計画時には予定していなかったが、線虫よりも高度なモデル生物であるゼブラフィッシュのトラッキング装置を開発した。図4に開発した装置の写真を示す。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- 1) Fei, X., Teramoto, T., Ishihara, T. and Hashimoto, K. (2012). Estimating Deformation of Neurons in Fluorescent Images, *Interdisciplinary Information Sciences*, 18(2), 113-122. 10.4036/iis.2012.113, 査読有
- 2) Iwatani, Y., Arai, S. and Hashimoto, K. (2011) Stability of switched stochastic systems in discrete-time. *SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration*, 3(5), 368-371. 査読有
- 3) Arai, S., Iwatani, Y. and Hashimoto, K. (2011) A condition for better estimation using asynchronous sampling than synchronous sampling. *SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration*, 4(3), 249-253. 査読有
- 4) 小原健, 五十嵐康伸, 橋本浩一. (2011). 細胞の個体差に適応する高速オートフォーカス顕微鏡. 計測自動制御学会論文集. 47(1), 31-39. 査読有
- 5) Arai, S., Iwatani, Y. and Hashimoto, K.

(2011). Fast Sensor Scheduling for Spatially Distributed Sensors. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 56(8), 1900-1905. 10.1109/TAC.2011.2141450, 査読有

- 6) Fei, X., Igarashi, Y., Shinkai, M., Ishikawa, M. and Hashimoto, K. (2009) A Parallel Computation of the Region-Based Level Set Method for Boundary Detection with Moving Objects, *Journal of Robotics and Mechatronics*, 21, 698-708. 査読有

[学会発表] (計12件)

- 1) Hashimoto, K. and Fei, X. (2012). Exploration of Brain Function through Behavior, Neural Activity Observation, and Optogenetic Manipulation. Invited Talk, International Symposium Optomechatronic Technologies (ISOT 2012), 1-7, Paris, France, October 29, 2012. 招待講演
- 2) Tanimoto, Y., Yamazoe, A., Hashimoto, K. and Kimura, K. (2012). A virtual reality running machine for worms – a highly integrated system for olfactory behavior. 5th East Asia C. elegans Meeting, 4-O06, Taipei, Taiwan, June 30, 2012.
- 3) Yokoyama, G., Tsukada, Y., Chen, M., Hashimoto, K. and Mori, I. (2012). Neurite fluorescence imaging of freely moving individual C. elegans animals with high-speed tracking and autofocus system. 5th East Asia C. elegans Meeting, P-56, Taipei, Taiwan, June 30, 2012.
- 4) Tanimoto, Y., Yamazoe, A., Hashimoto, K. and Kimura, K. (2012). A virtual reality running machine for worms – a highly integrated system for olfactory behavior. EMBL Conference C. elegans Neurobiology, P-126, Heidelberg, Germany, June 17, 2012. 査読有
- 5) Tsukada, Y., Chen, M., Yokoyama, G., Hashimoto, K. and Mori, I. (2012). High-speed tracking system for neurite fluorescence imaging during freely moving C. elegans. EMBL Conference C. elegans Neurobiology, P-196, Heidelberg, Germany, June 17, 2012. 査読有
- 6) Zang, C. and Hashimoto, K. (2011). Camera Localization by CAD Model Matching, 2011 IEEE/SICE International Symposium on System

- Integration (SII 2011), 30-35, Kyoto, Japan, December 20, 2011. 査読有
- 7) Satoh, Y., Maru, M., Hashimoto, K. and Iino, Y. (2011). Construction of a system for movement-dependent optical stimulation in *C. elegans*. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Yokohama, Japan, December 13, 2011. 査読有
- 8) Maru, M., Chen, M., and Hashimoto, K. (2011). Visual Servo Microscope for Locking on Single Neuron of a Worm, 2011 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics (IEEE-ROBIO 2011), 2844-2849, Phuket, Thailand, December 10, 2011. 査読有
- 9) Zang, C., Hashimoto, K., and Moon, J.J. (2011), A visual tracking strategy using Computer Graphics and Edge, 2011 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics (IEEE-ROBIO 2011), 981-986, Phuket, Thailand, December 8, 2011. 査読有
- 10) Obara, T., Igarashi, Y., and Hashimoto, K. (2011). Fast and adaptive auto-focusing algorithm for microscopic cell observation. IEEE Int. Conf. Intelligent Robots and Systems (IROS2011), 7-12, San Francisco, USA, September 25, 2011. 査読有
- 11) Maru, M., Igarashi, Y., Arai, S., and Hashimoto, K. (2010). Fluorescent microscope system to track a particular region. 2010 IEEE/SICE International Symposium on System Integration (SII2010), 347-352, Sendai, Japan, December 21, 2010. 査読有
- 12) Fei, X. and Hashimoto, K. (2010). An Object-Tracking Algorithm Based on Particle Filtering with Region-Based Level Set Method. IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS2010), 2908-2913, Taipei, Taiwan, October 21, 2010. 査読有

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- 1) 名称: 顕微鏡装置及び輪郭識別プログラム  
 発明者: 費仙鳳, 五十嵐康伸, 橋本浩一

権利者: 独立行政法人 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特許第 4614149 号

出願年月日 2009. 6. 29

国内外の別: 国内

- 2) 名称: 顕微鏡装置及びそれを用いた蛍光観察方法

発明者: 五十嵐康伸, 小原健, 出口雄規, 鈴木健史, 橋本浩一

権利者: 独立行政法人 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: PCT/JP2009/060644, CN102216827A, EP2325684A1, US20110242308

出願年月日: 2009. 6. 10

国内外の別: 国際

○取得状況 (計2件)

- 1) 名称: 顕微鏡装置及び輪郭識別プログラム

発明者: 費仙鳳, 五十嵐康伸, 橋本浩一

権利者: 独立行政法人 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特許第 4614149 号

取得年月日: 2011. 1. 13

国内外の別: 国内

- 2) 名称: 顕微鏡装置及びそれを用いた蛍光観察方法

発明者: 五十嵐康伸, 小原健, 出口雄規, 鈴木健史, 橋本浩一

権利者: 独立行政法人 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特許第 4288323 号

PCT/JP2009/060644

取得年月日: 2010. 3. 18

国内外の別: 国内、国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.ic.is.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 浩一 (KOICHI HASHIMOTO)

東北大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号: 80228410

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

出口 光一郎 (KOICHIRO DEGUCHI)

東北大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号：30107544  
東谷 篤志 (ATSUSHI HIGASHITANI)  
東北大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号：30107544  
岡谷 貴之 (TAKAYUKI OKATANI)  
東北大学・大学院情報科学研究科・准教授  
研究者番号：00312637  
鏡 慎吾 (SHINGO KAGAMI)  
東北大学・大学院情報科学研究科・准教授  
研究者番号：90361542  
岩谷 靖 (YASUSHI IWATANI)  
弘前大学・理工学部・准教授  
研究者番号：10400300  
五十嵐 康伸 (YASUNOBU IGARASHI)  
東北大学・大学院情報科学研究科・産学連  
携研究員  
研究者番号：90431551