

2本のガラスマイクロピペットを用いた微小物体の非接触回転制御 Non-contact Rotation of Micro Objects Using Two Glass Micropipettes

○月舘 翔平, 井上 健司
○Shohei Tsukidate, Kenji Inoue

山形大学
Yamagata University

キーワード：マイクロマニピュレーション (Micro manipulation),
ガラスマイクロピペット (Glass micropipette), 非接触回転 (Non-contact rotation)

連絡先：〒992-8510 山形県米沢市城南 4-3-16
山形大学大学院理工学研究科応用生命システム工学専攻 井上健司
TEL&FAX: 0238-26-3335, E-mail: inoue@yz.yamagata-u.ac.jp

1. はじめに

バイオ分野や細胞工学における進展に伴い、個々の細胞、さらには1つの細胞内での局所的な性質を解析する必要性から、顕微鏡下で細胞の位置姿勢を多自由度かつ安定、正確に制御できるマニピュレーション技術が求められている。特に、細胞の特定の個所を観察することや、計測器に接触させて特性を測るためには、細胞の回転操作が重要となる。著者らの研究室では、2本のガラス棒を用い、箸を模倣した動作で細胞などの微小物体を移動・回転させるマイクロハンドを開発している[1,2]。しかし、これまでの方法では、物体の移動・回転を行う際に、2本のガラス棒の先端で物体を挟む必要があるため、物体に対する負荷が大きいという問題点があった。

本研究では、2本のガラス棒をガラスマイクロピペットに変え、電動マイクロインジェクタを用いてピペット先端から水を吹き出し、その力によって非接触に物体を回転させる方法を提案する。この方法では、顕微鏡画像の画像処理により物体の位置を計測し、物体に対する2本のピペットの位置を制御することで、物体の回転方向・回転速度を変化させる。入力を容易にするため、ユーザインタフェースには、マルチタッチディスプレイを用いる。システムを開発して物体の位置計測および回転操作の実験を行い、その有効性を検証する。

2. 2本のガラスマイクロピペットを用いたマイクロマニピュレーションシステム

2.1 システムの構成

図1のように、各ガラスマイクロピペットの3自由度並進移動には、2自由度直動ステージ SGSP20-35(XY) (シグマ光機) と1自由度直動ステージ SGSP20-35(X) (シグマ光機) を用いる。ステージの分解能は1[μm]である。1自由度直動ステージは、2自由度直動ステージに対して45[deg]傾いている。1自由度直動ステージにインジェクションホルダーHI-7 (成茂科学器械研究所) を付け、その先端にガラスマイクロピペットを取り付ける。先端は直径40[μm]程度に加工し、先端が水平になるようにピペットの途中で45[deg]曲げておく。倒立型顕微鏡IX51 (オリンパス) のステージの両側に、2本のピペット先端が顕微鏡

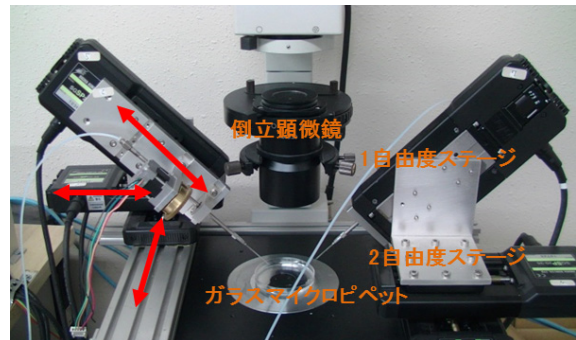


図1: 2本のガラスマイクロピペットを用いたマイクロマニピュレーションシステム



図 2: 電動マイクロインジェクタ

の対物レンズの上で対向するように置き、シャーレの中に物体を入れる。

ユーザインタフェースにはマルチタッチディスプレイを用い、表示された顕微鏡画像にタッチして入力・操作指令ができる。以下、顕微鏡画像（焦点面）の横方向を X 軸，縦方向を Y 軸，奥行き方向を Z 軸とする。

2.2 電動マイクロインジェクタ

ピペット先端から水を吹き出すため、図 2 に示す電動マイクロインジェクタ BJ110（ボックス）を使用した。インジェクタの吹き出し口に T 字継手を取り付け、2 本のチューブを各ピペットに繋げる。そのため、2 本同時にピペット先端から水を吹き出すことが可能である。吹き出す圧力は一定とした。

3. 非接触回転

3.1 回転方法

2 本のガラスマイクロピペットを用いて微小物体を非接触で Z 軸回転させる方法を図 3 に示す。操作対象の物体は球形とする。

- (a) 後述する画像処理により、物体の中心位置と半径を計測する。物体中心に対して点対称の位置に、2 本のピペットの先端を移動させる。
- (b) 一定の吹き出し時間で 2 本のピペット先端から水を吹き出し、その力で物体を回転させる。
- (c) 物体を回転させると、物体が移動してしまう場合がある。そこで(a)に戻り、2 本のピペットの先端を再び移動する。

顕微鏡画面の下部にボタンを設け、ボタンを押している間、このプロセスを繰り返す。

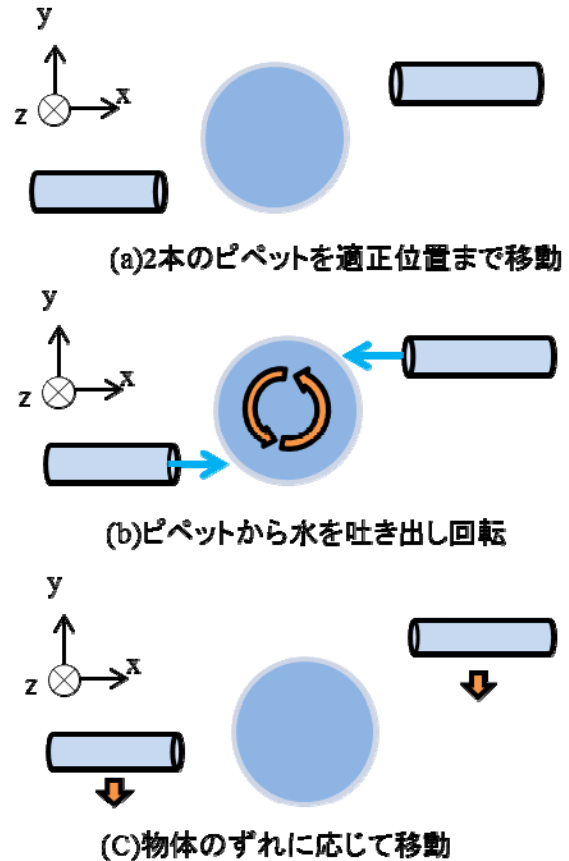


図 3: 非接触 Z 軸回転法

3.2 回転方向・回転速度制御

物体を回転させるには、ある程度の力を加える必要がある。一方、強い力を加え続けると、物体が大きく移動してしまう危険性がある。そこで、提案手法では、パルス状に水を吹き出して、物体を間欠的に回転させる。

平均の回転速度は、一回の吹き出しによる回転角度 $\Delta\theta$ によって決まる。 $\Delta\theta$ を変える方法としては、以下の 3 つが考えられる。

- ① 吹き出し時間を変える。吹き出し時間を長くすれば $\Delta\theta$ が大きくなり、インジェクション時間を短くすれば $\Delta\theta$ が小さくなる。
- ② 2 本のピペットの先端位置（水の吹き出し位置）を X 軸方向に移動して物体との距離を変える。ピペットを近づければ $\Delta\theta$ が大きくなり、遠ざければ $\Delta\theta$ が小さくなる。
- ③ 2 本のピペットの先端位置を Y 軸方向に移動して水が物体に当たる位置を変える。ピペットを物体の縁に近づければ $\Delta\theta$ が大きくなり、中心に近づければ $\Delta\theta$ が小さくなる。

回転方向を変えるには、③の方法で、物体に対する左右のピペットの上下関係を切り替

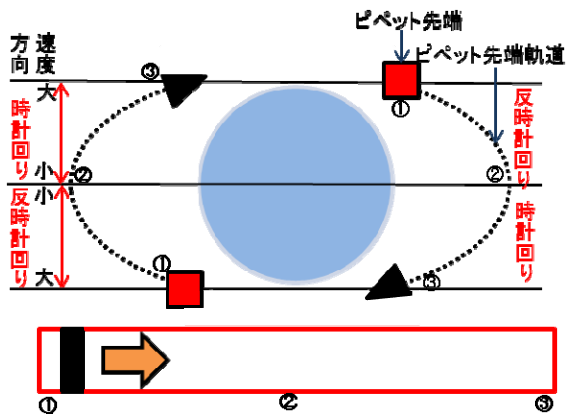


図 4: 物体の回転方向・回転速度制御法

えればよい。すなわち、図 3 の配置では物体は反時計回りに回転する。左のピペットを上側に、右のピペットを下側に配置すれば、時計回りに回転する。

本研究では、物体の回転方向と回転速度を制御できることから、③の方法を用いる。ピペットを動かす軌道を図 4 に示す。左右のピペットは、常に物体中心に対して点対象の位置に置かれる。回転方向と回転速度を入力するため、顕微鏡画面の下部にスライダを設けた。スライダを中央にすると 2 本のピペットは物体中心の真横に置かれ、物体は回転しない。スライダを左にずらすほど、右ピペットは上に、左ピペットは下に移動し、反時計回りに回転速度が上がる。スライダを右にずらすほど、右ピペットは下に、左ピペットは上に移動し、時計回りに回転速度が上がる。ピペットが物体中心に近づくほど、物体から X 軸方向に離れるようにしたのは、吹き出しによる力で物体が大きく移動してしまい、回転が不安定になるのを防ぐためである。

4. 物体の追跡

4.1 SNAKE を用いた物体追跡

3.1 で提案した方法では、物体の中心位置と半径を計測し、指を図 4 の位置に制御する必要がある。特に、物体が把持されておらず、水の吹き出し力で移動する可能性があるため、物体を追跡し続けることが求められる。

本研究では、画像処理ライブラリ OpenCV に実装されている SNAKE[3]を利用して、物体追跡を行う。SNAKE は、動的輪郭追跡する手法の 1 つである。SNAKE を利用する理由は、様々な形状の輪郭を抽出できる点にある。一方、SNAKE は輪郭を表す閉曲線の初

期値を与え、反復計算で閉曲線を縮めながら物体の輪郭に収束させる。そのため、物体が移動して初期閉曲線から大きく外れていると、輪郭が見つからず閉曲線が縮んでしまい、追跡できなくなる。

そこで、以下の手順で物体を追跡する。はじめに、(a)~(c)を回転操作前に行う。

- 物体を大きく取り囲むように初期閉曲線を設定する。
- SNAKE を用いて反復計算を行い、閉曲線を物体の輪郭に収束させる。
- 閉曲線を成す点の平均をとることで物体の中心位置 (x, y) を、中心から各点までの距離の平均をとることで物体の半径 r_0 を算出する。さらに、 r_0 を 0.9 倍して半径の閾値 r_t とする。

回転操作が始まったら、以下を繰り返す。

- 1 周期前の閉曲線を初期値として SNAKE を計算し、現在の閉曲線と物体中心位置 (x, y) 、物体半径 r を計算する。
- 半径 r が閾値 r_t 以上ならば、輪郭抽出に成功したとして (d) に戻る。
- 半径 r が閾値 r_t 未満ならば、輪郭抽出に失敗したとして、回転操作を一旦停止する。
- 1 周期前の物体中心位置に r_0 の 1.5 倍の半径をもつ初期閉曲線 (円) を設定して、SNAKE による反復計算を行う。閉曲線が物体の輪郭に収束したら、物体の中心位置 (x, y) を求め直す。回転操作を再開し、(d) に戻る。

4.2 画像上のピペットの消去

回転操作中はピペットが物体に接近するため、初期閉曲線の中にピペットが入ってしまうことがある。その結果、物体の輪郭抽出が困難となる。そこで、図 5 のように、顕微鏡画像からピペットを消去し、SNAKE を適用する。

はじめに、背景画像を作成する。

- 事前に、ピペットと物体が映っていない状態の顕微鏡画像 A を取得する。
- 物体が顕微鏡で見える状態にし、ピペットを操作に影響しない位置まで移動して、顕微鏡画像 B を取得する。
- 画像 B の物体が映る部分を画像 A の同じ部分の画像で埋め、背景画像とする。画像 A と B を合成して使うのは、できるだけ操作中に近い背景画像を用いるためである。
- 回転操作中は、現在の顕微鏡画像のピペットが映る部分を背景画像の同じ部分の

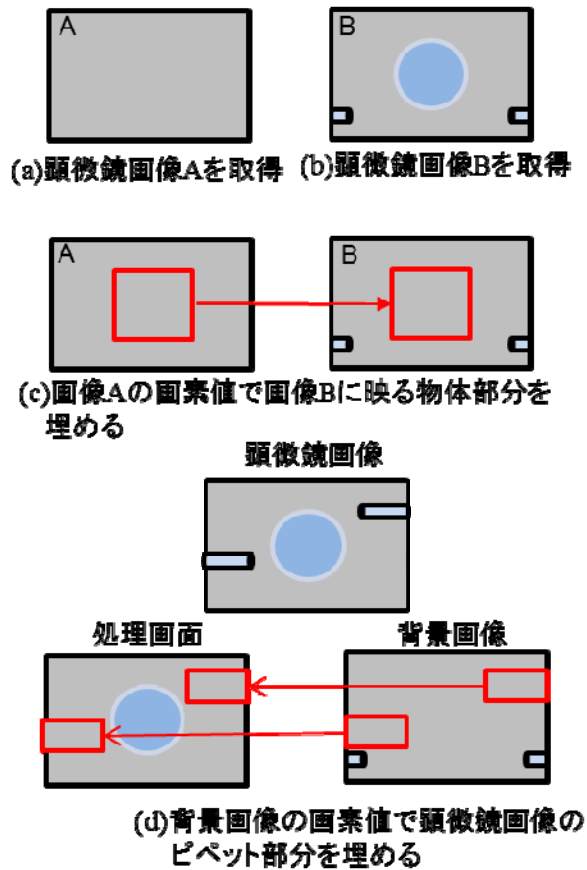


図 5: 画像上のピペット消去法

画像で埋め、ピペットが消去された画像を生成する。

なお、画像取得時刻の違いによるばらつきを抑えるために、画像 A, B, 背景画像は、取得時刻が異なるものを 5 枚ずつ用意し、順番に用いる。

5. 物体追跡実験

5.1 実験方法

物体は、バイオゲル（直径約 $45[\mu\text{m}]$ ）を使用した。シャーレを動かしてバイオゲルを X 軸方向に約 $200[\mu\text{m}]$, Y 軸方向に約 $150[\mu\text{m}]$ 移動させ、物体追跡を行った。

5.2 実験結果

図 6 は、元の顕微鏡画像、ピペットを消去した画像、SNAKE により抽出された輪郭と物体中心位置の例である。図 7 は、初期位置から最終位置までの物体中心の軌跡、図 8 は最終位置と物体中心の距離と時間の関係を表した図である。両図の(a)と(b)では、輪郭抽出に失敗し、再抽出を行っている。再抽出に要した時間は、(a) $7.3[\text{s}]$, (b) $5.3[\text{s}]$ であった。(a)(b)以外では、連続的に物体追跡ができてい

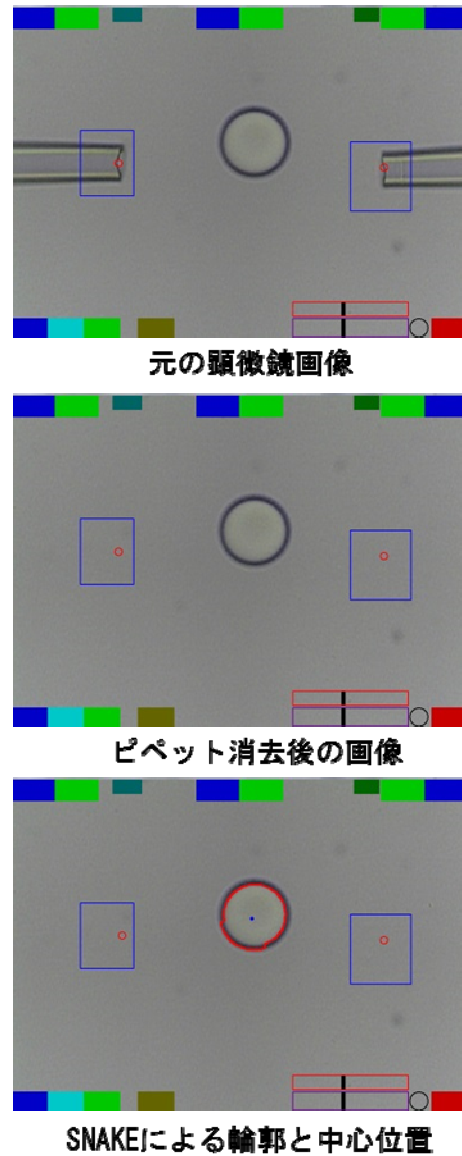


図 6: 顕微鏡内における画像処理の様子

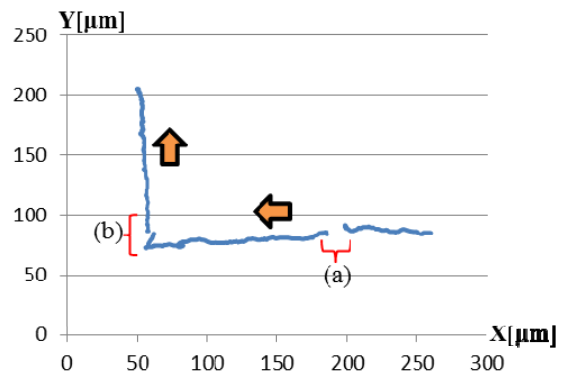


図 7: 物体中心の軌跡

る。この結果から、物体を一旦見失っても、再抽出処理により物体追跡が継続できることが確認できた。

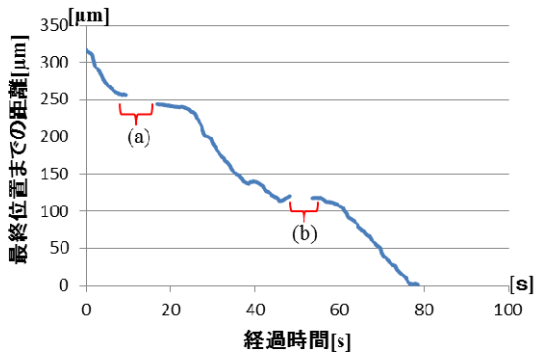


図 8: 最終位置までの距離と時間

6. 非接触回転実験

6.1 実験方法

物体は、ガラスビーズ（直径約 110[μm]）を使用した。2本のピペットの Y 軸方向距離 d を 50(左回転のみ), 60, 70, 80, 90, 100, 110, [μm]と変化させ、ほぼ 1 回転させる実験を行った。なお、ピペット間距離 d と回転は、反時計回りに回転する場合を正とした。

6.2 実験結果

回転の様子を図 9 に示す。ビーズにある模様（特徴点）の移動から、回転していることがわかる。図 10 は、ピペット先端と物体中心、特徴点の軌跡の例である。ただし、軌跡は間欠的に回転している際の静止時の位置を結んだものである。物体中心と 2本のピペット先端が同じ軌道を描いていることから、物体の位置ずれに応じてピペットが移動し、回転を継続できていることがわかる。

ピペット間距離 d [μm]を変化させたときの 1 回転に要した時間 T [s]と間欠回転の回数 n を表 1 にまとめる。平均回転速度 V [deg/s]と平均回転分解能 e [deg]は、次式で計算する。

$$V = \frac{360}{T}, \quad e = \frac{360}{n} \quad (1)$$

ピペット間距離 d と平均回転速度 V , 平均回転分解能 e の関係を図 11, 12 に示す。図から、ピペット間距離を変えることで、回転速度と回転分解能、および回転方向を制御できることがわかる。ピペットの間隔が同じでも、時計回り・反時計回りで回転が異なるのは、ピペット先端の加工が微妙に違っていたためと考えられる。なお、ピペットの間隔が左回転時は、50[μm]未満のとき、右回転時は、60[μm]未満のとき、物体は回転しなかった。

表 2 は、物体中心の初期位置から最大位置ずれ量をまとめたものである。位置ずれの要

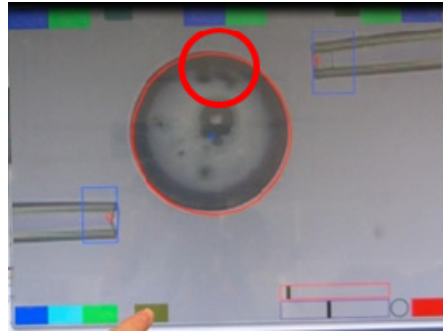
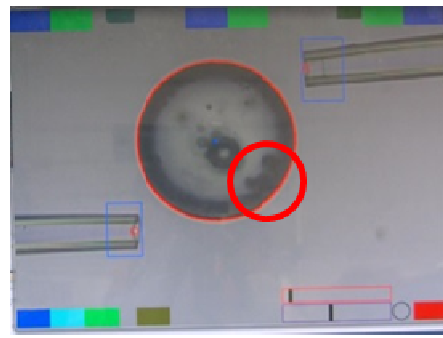


図 9: 回転の様子

因は様々なので傾向は見いだせないが、これらの位置ずれが発生しても、回転を継続することができた。

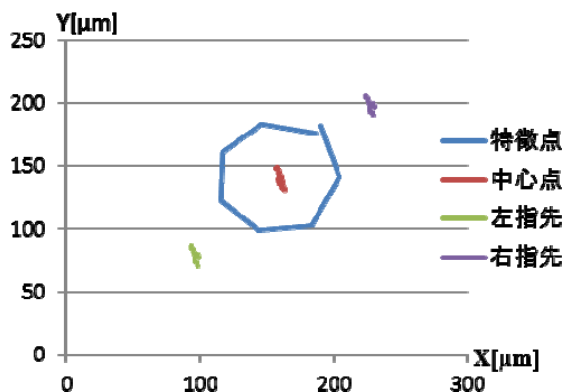


図 10: ピペット先端と物体中心, 特徴点の軌跡

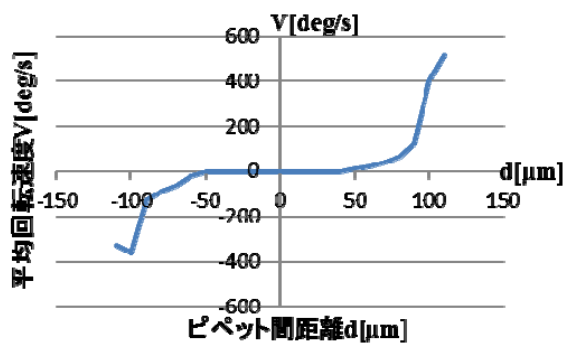


図 11: ピペット間距離に対する平均回転速度

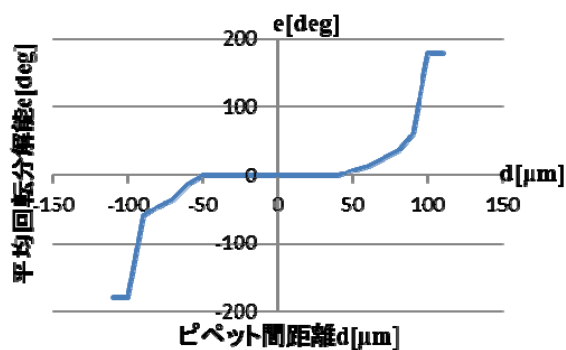


図 12: ピペット間距離に対する平均回転分解能

表 1: ピペット間距離に対する 1 回転に要した時間と間欠回転の回数

回転方向	ピペット間距離 $d[\mu\text{m}]$	1回転に要した時間 $T[\text{s}]$	間欠回転の回数 $n[\text{回}]$
反時計回り	110	0.7	2
	100	0.9	2
	90	3.0	6
	80	5.6	10
	70	8.7	15
	60	15.3	27
	50	30.6	52
時計回り	-60	15.9	27
	-70	5.5	10
	-80	4.0	8
	-90	2.8	6
	-100	1.0	2
	-110	1.1	2

表 2: ピペット間距離に対する中心の最大ずれ量

回転方向	ピペット間距離 $d[\mu\text{m}]$	中心の最大ずれ量 $[\mu\text{m}]$
反時計回り	110	2.99
	100	8.38
	90	3.82
	80	2.18
	70	10.9
	60	4.37
	50	4.55
時計回り	-60	37.3
	-70	21.1
	-80	24.1
	-90	4.28
	-100	3.09
	-110	4.27

7. おわりに

2本のガラスマイクロピペットを用いて非接触に物体を回転させるシステムを開発し、実験により、回転速度と回転速度の制御が可能であることを示した。今後の課題は、回転のためのピペット軌道の最適設計と物体の非接触 XY 並進移動を可能にすることである。

参考文献

- [1] K. Inoue, T. Tanikawa, T. Arai: Micro-manipulation system with a two-fingered micro-hand and its potential application in bioscience, J. of Biotechnology, 133(2), pp.219-224, 2008.
- [2] K. Inoue, Y. Matsuzaki, S. Lee: Micromanipulation using micro hand with two rotational fingers, J. Micro-Nano Mechatronics, Vol.7, No.1-3, pp.33-44, 2012.