

顕微鏡画像のぼけを利用したマイクロフィンガーの高さ制御 Height control of micro fingers using blurriness of microscopic image

○小林 和広, 井上 健司
○Kazuhiro Kobayasi, 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),
自動焦点 (Autofocus), 画像処理 (Image processing)

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の進展にともない、顕微鏡下で細胞を迅速かつ正確に移動・回転する技術が求められている。そこで本研究室では、2本のガラス棒で微小物体を把持し、移動・回転できるマイクロマニピュレーションシステムを開発している[1]。

本研究では、操作前に顕微鏡の焦点を自動で物体に合わせ、かつ2本のガラス棒を物体と同じ高さに移動する方法、および操作中に把持した物体を2本のガラス棒で上下に移動しても、物体に焦点を自動追従させる方法を提案し、実験によりその有効性を評価する。

2. システムの構成

システムの構成を図1に示す。以下、ガラス棒のことをマイクロフィンガーと呼ぶ。

各マイクロフィンガーは、3個の直動ステージで3次元並進移動ができる。顕微鏡の対物レンズもモータで駆動され、焦点面が上下する。顕微鏡画像をカメラで取得し、コンピュータで画像処理する。

3. 自動焦点とマイクロフィンガーの高さ制御

3.1 合焦点の検出法

元画像を微分処理した画像の画素値の総和(累積画素値) S が大きいほど、元画像は焦点が合っている。そこで、物体を囲む領域を設定し、微分画像の領域内の累積画素値 S を

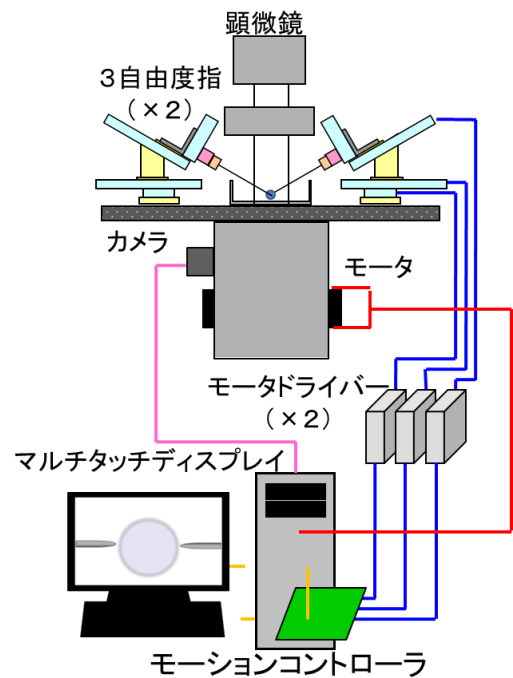
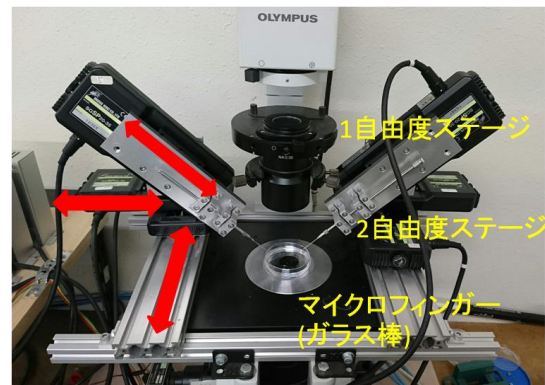


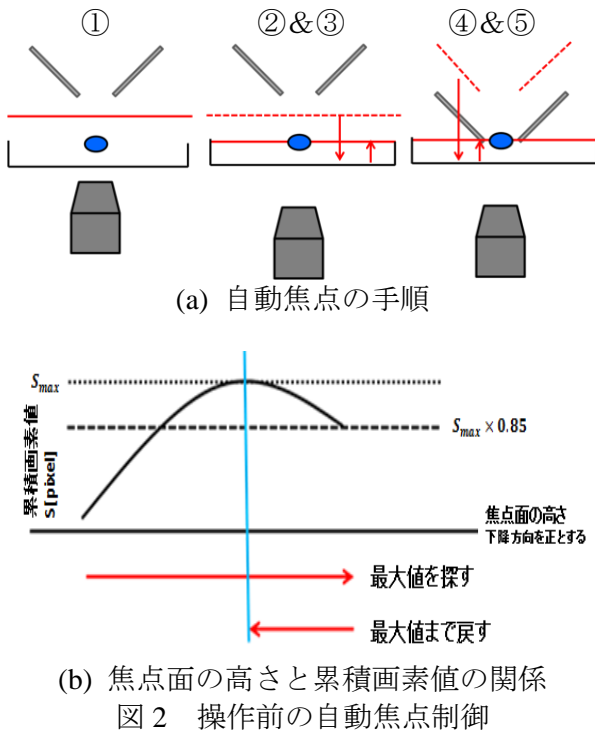
図1 システムの構成

計算して、物体に焦点があっているかを調べる。同様に、2本のマイクロフィンガー先端の合焦点も調べる。

3.2 操作前の自動焦点制御

物体を操作するには、2本のマイクロフィンガーが物体と同じ高さであり、かつ焦点が物体に合っていないなければならない。そこで、操作前に、対物レンズを動かして焦点を自動で物体に合わせ、2本のガラス棒を物体と同じ高さに移動する(図2)。

- ①焦点面と2本のマイクロフィンガーを十分な高さまで移動する。
- ②焦点面を下降しながら、物体の累積画素値 S を逐次計測し、最大値 S_{max} とその時の高さを探す。
- ③累積画素値 S が S_{max} の85%以下になったら焦点面の下降を停止し、 S_{max} を計測した高さまで焦点面を戻して、物体に焦点を合わせる。
- ④焦点面を固定した状態で、2本のマイクロフィンガーを下降させる。
- ⑤物体と同様に各マイクロフィンガーの合焦点の高さを検出し、その高さまでマイクロフィンガーを移動する。



3.3 操作中の焦点追従制御

操作中でも、把持した物体を2本のマイクロフィンガーで上下に移動したり、外乱等で

物体がマイクロフィンガーから外れたりすると、物体の高さが焦点面からずれる可能性がある。そこで、物体が上下に移動しても、常に物体に焦点を合わせるように対物レンズを制御する。

図2(b)のように、焦点面が最も焦点が合った高さにある場合、物体が上下どちらに動いても累積画素値 S が下がるため、区別ができない。そこで、図3のように、観測に問題ない程度焦点面をずらし、そのときの累積画素値 S を目標値 S_d とする。その結果、累積画素値の目標値に対する誤差 $(S_d - S_a)$ の正負から物体の上下動の方向が分かるので、誤差 $(S_d - S_a)$ を減らすように対物レンズを上下させ、累積画素値 S を目標値 S_d に制御する。

図3(a)では、物体が移動する前は焦点面の高さは t であり、その時観測できる累積画素値は目標値 S_d である。そして物体が下降するが、それは図で表すと曲線が右にずれるということである。下降後焦点面の高さ t で観測できる累積画素値は S_a である。 S_a は S_d よりも小さくなっているため、焦点面を動かす方向を下降方向と判断し、累積画素値が S_d になるまで下降する。

図3(b)では物体が上昇するため、曲線が左にずれる。そして焦点面の高さ t で観測値が S_d から S_a に変わり、値は大きくなっているため、焦点面を動かす方向を上昇方向と判断し、累積画素値が S_d になるまで上昇する。

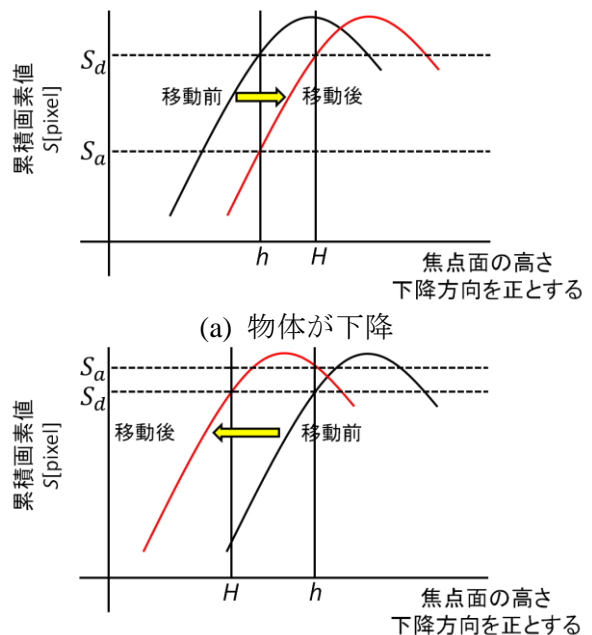
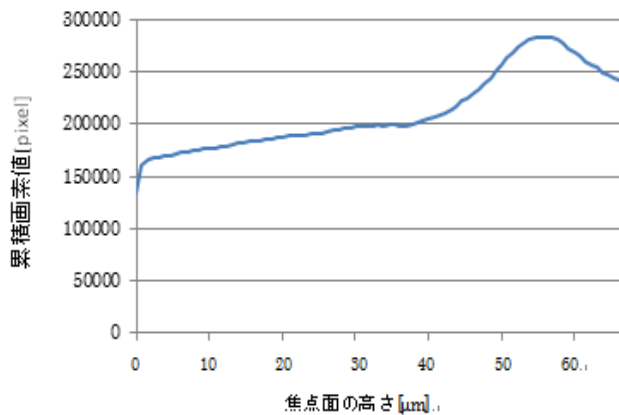


図3 操作中の焦点追従制御

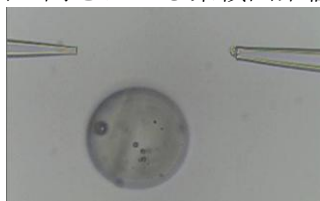
4. 実験

4.1 操作前の自動焦点制御の実験

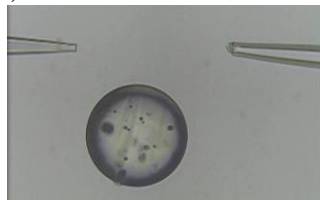
操作前の自動焦点制御の実験を行った。図4(a)は、焦点面の高さによる累積画素値 S の変化である。(b)と(c)は、自動焦点戦後の顕微鏡画像である。図から、焦点合わせができていることがわかる。



(a) 焦点面の高さによる累積画素値 S の変化



(b)自動焦点前の顕微鏡画像



(c)自動焦点後の顕微鏡画像

図4 操作前の自動焦点制御の実験結果

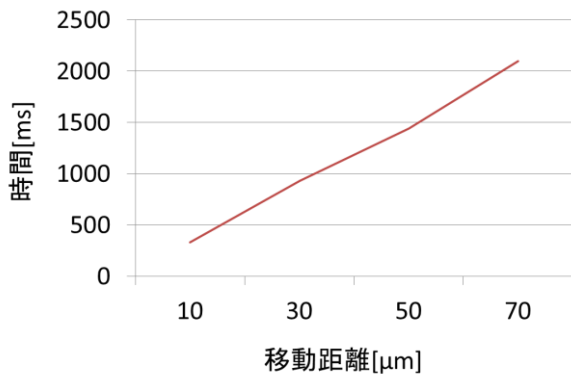


図5 操作中の焦点追従制御の応答時間

4.2 焦点追従制御のステップ応答実験

累積画素値 S が目標値 S_d に一致している状態から焦点面をずらし、焦点追従制御により S が S_d に戻るまでの時間を測定した。結果を図5に示す。10 [μm] の高さのずれに対して、0.4 [s] 程度で合焦点に達している。焦点追従制御は常に行っているため、実際のずれはもっと少ないので、問題ない時間と考える。

4.3 焦点追従制御の実験

2本のマイクロフィンガーで物体の把持をしながら物体を0.9 [s] 間で45 [μm] 上昇させ、焦点が追従できるかを検証した。結果を図6に示す。焦点追従を行った場合と行わなかった場合を比べると、合焦点が維持できていることがわかる。

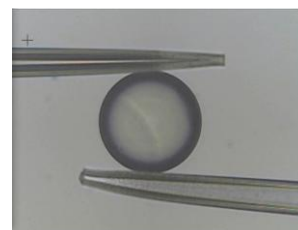
5. おわりに

マイクロフィンガーの操作前の自動焦点制御法と、操作中の焦点追従制御法を提案し、実験によりその有効性を示した。

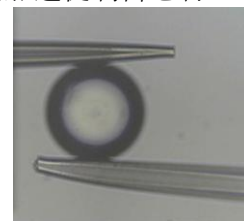
今後の課題は、高さのある物体への焦点制御などが考えられる。

参考文献

- [1] 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.



(a)焦点追従制御を行った場合



(b)焦点追従制御を行わなかった場合

図6 焦点追従制御の実験結果