

戦略的創造研究推進事業
発展研究 (SORST)

研究終了報告書

研究課題
「超分散マイクロアクティブセンシング」

研究期間：平成 18 年 4 月 1 日～
平成 21 年 3 月 31 日

橋本 浩一
(東北大学 情報科学研究科、教授)

1. 研究課題名

超分散マイクロアクティブセンシング

2. 研究実施の概要

本研究の目標は、多数の微生物を情報処理機構と結合することで、微生物の運動制御と、体内センサの利用を可能にし、柔軟かつ多様なセンシング機能を提供する超分散アクティブセンシングシステムを実現することである。

既存の MEMS 技術では、システムの状態をセンシングすることが困難であり、フィードバック制御がうまく機能しない。一方で微生物は細胞内にセンサやアクチュエータを内蔵する非常に優れたマイクロマシンである。したがって、何らかの方法で多数の微生物の運動を制御し、微生物の体内センサの状態を観測することができれば、大量のセンサをいたるところに配置して、環境に働きかけながら計測することで、きわめて大規模かつ多様なセンシングシステムの構築が可能になる。本研究では、このような大規模分散型センシングシステムの実現を目指す。

超分散マイクロアクティブセンシングシステムを実現するためには、機械工学、制御工学、光学、分子生物学、物理学の方法を総合的に用いることが必要である。つまり、さきがけ研究での研究成果（1 個体の 2 次元トラッキング技術、ゾウリムシの電気走性モデル、電場刺激制御デバイス、電場刺激によるゾウリムシ群の制御方法、ゾウリムシが持つ力の計測法、ゾウリムシ細胞内反応の蛍光観察方法等）を複合的に発展させ、生物学的観点からセンシング能力の可能性を追求する。

上記の目標及び実施計画に基づいて、研究を実施し、下記の研究成果を得た。

- A. **微生物内部の反応の数理モデル**：微生物の機械受容器の刺激に対する応答特性を計測するためのトラッキング顕微鏡の開発及び、細胞応答の数理モデルを開発した。
- B. **微生物群の協調制御**：多数の微生物の運動を協調的に制御するために、細胞群の運動モデルと、細胞群を制御するための刺激パターンを設計した。
- C. **分布型刺激デバイスの開発**：空間的に分布する微生物へ、電場による制御入力を与えることのできるデバイスを製作した。電場の順モデルと逆モデルを用いて、電場の制御性能を向上させた。
- D. **3次元トラッキングのための高速可変焦点レンズの開発**：微生物の反応を3次元的に見るために、焦点面の位置を制御する手法について研究を行った。新しいレンズの制御手法と、焦点位置を認識するためのアルゴリズムを開発した。
- E. **微生物センサの開発**：刺激に対する微生物細胞内反応の関係を整理し、多様な微生物センサを開発した。ゾウリムシと白血球を用いた電場センサを開発した。
- F. **センサ配置とセンサ情報統合**：最適センサ（微生物）配置、各個体の移動戦略、及びセンサ情報の統合について、ロボット工学の観点から検討した。
- G. **トラッキング顕微鏡の改良**：トラッキング顕微鏡の設計方針、画像処理アルゴリズム、実験プロトコルなどの標準化と体系化を行なった。
- H. **多様な生物学研究者との協働**：多様な生物学用途にトラッキング顕微鏡を利用し、その有効性を検証した。具体的には、ゾウリムシ、フジツボ幼生（キブリス）、心筋細胞、白血球、線虫等をトラッキングし、トラッキング顕微鏡の有効性を明らかにした。

3. 研究構想

3-1. 目標

本研究の目的は、多数の微生物を情報処理機構と結合することでその運動を制御し、微生物の体内センサを利用することで柔軟かつ多様なセンシング機能を提供する、大規模分散アクティブセンシングシステムを実現することである。

既存の MEMS 技術では、システムの状態をセンシングすることが困難でありフィードバック制御がうまく機能しない。しかし、微生物は細胞内にセンサやアクチュエータを内蔵する非常に優れたマイクロマシンである。したがって、何らかの方法で多数の微生物の運動を制御し、微生物の体内センサの状態を観測することができれば、あらゆる場所にセンサを配置することができ、環境に働きかけながら計測することでセンサ能力の不足を補うことが可能になる。本研究では、このような大規模センシングシステムの実現を目指す。

3-2. 研究計画

微生物群を用いたアクティブセンシングでは、微生物の配置を動的に変化させ、センサを動かしながら計測する必要がある。したがって、本発展研究では下記の研究を行う。

- A. **蛍光色素の注入法の研究**：多くの微生物の細胞内応答を可視化するためのイオンプロープ（蛍光色素）を、注入する方法を効率化する。
- B. **環境変化に対する反応モデルの作成**：蛍光色素により微生物の環境応答を可視化し、細胞内反応モデルを作成する。
- C. **センサ特性の同定**：刺激の種類が変化すると、使用すべき蛍光色素はどう変化するか、また刺激の強さと計測される蛍光強度の関係がどのように変化するかを考察する。
- D. **分布型電極の開発**：電場勾配の安定化と、位置制御精度の向上のために、分布型の電極を開発する。
- E. **特性の異なるセンサモジュールを適切に配置するための戦略**：生体内センシングへの応用を考えた、微生物制御を検討する。
- F. **アクティブセンシングとセンサ統合**：センサ（微生物）をアクティブに運動させることによりセンサ分解能を高める。また、多数のセンサ出力から情報を統合し、次の運動を決定する。

3-3. 進め方の概要

- A. **微生物内部の反応の数理モデル**：微生物の機械受容器の刺激に対する応答特性を計測するために、下記の事項について検討する。
 - a. **微生物運動の制御**：微生物が運動できる状態で機械刺激を与える。
 - b. **運動する微生物のトラッキング**：運動する 1 個体を継続的に観測する。
 - c. **蛍光色素の注入法の研究**：微生物の体内への蛍光色素注入法を効率化する。
 - d. **蛍光による刺激反応の測定とモデリング**：機械刺激に対する微生物の細胞内反応を観察し、その反応モデルを作る。
- B. **微生物群の協調制御**：多数の微生物の運動を協調的に制御するために、下記の事項について検討する。
 - a. **群の運動モデルの導出**：相互作用を考慮した群のモデルを導出する。
 - b. **電場勾配パターンの生成**：電場勾配パターンを制御するアルゴリズムについて考察する。
 - c. **センサ特性に応じたセンサ配置**：刺激、微生物、細胞内応答、蛍光色素、配置の組み合わせについて検討する。
- C. **分布型刺激デバイスの開発**：空間的に分布する微生物へ、電場による制御入力を与えることのできるデバイスを製作する。
 - a. **培養液中に電極を配置すべきかどうか検討**：電場勾配の安定化と、位置制御精度の向

上を実現する新しい電極作成方法について検討する。

- b. **電場勾配パターンの設計**：高い空間分解能（位置精度）と高い時間分解能（サンプリングレート）を実現する複数電極の制御方法を検討する。
- D. **3次元トラッキングのための高速可変焦点レンズの開発**：微生物の反応を3次的に見るために、焦点面の位置を制御する手法について研究を行う。
- a. **対物レンズ移動型可変焦点機構の開発**：ピエゾ素子によって対物レンズを動かす機構を持つトラッキング顕微鏡システムを考察する。
 - b. **容量可変型可変焦点レンズの開発**：溶液体積をピエゾアクチュエータによって制御するレンズを開発し、その制御精度を高める。
 - c. **自動焦点合わせのための画像処理アルゴリズム**：像のシャープさをフォーカスメジャーとし、自動焦点合わせアルゴリズムを開発する。
- E. **微生物センサの開発**：刺激に対する微生物細胞内反応の関係を整理し、多様な微生物センサを開発する。
- F. **センサ配置とセンサ情報統合**：最適センサ（微生物）配置、各個体の移動戦略、及びセンサ情報の統合について検討する。

3-4. その後の新展開

多様な生物学用途にトラッキング顕微鏡を利用し、その有効性を検証する。この検証を通じて、トラッキング顕微鏡の設計方針、画像処理アルゴリズム、実験プロトコルなどの標準化と体系化を行う。（4. 研究実施内容 における通し番号と合わせるために、以下の項目はGから始める。）

- G. **トラッキング顕微鏡の改良**：トラッキング顕微鏡の改良は、下記の4点である。
- a. **観察手法設計**：蛍光画像を直接フィードバック情報に用いるトラッキング顕微鏡システムを開発する。
 - b. **画像処理アルゴリズム**：ロバストなトラッキングを実現する画像処理アルゴリズムを開発する。
 - c. **フォーカス制御**：フォーカス制御の精度を向上させる。
 - d. **ステージ設計**：細胞の運動性と試料容器の質を考慮に入れた、ステージの再設計を行う。
- H. **多様な生物学研究者との協働**：下記の4種の対象にトラッキング顕微鏡を応用する。
- a. **フジツボ幼生キプリスの運動解析**：キプリスは生息に適した環境を探すために動き回る。キプリスをトラッキングしその行動を解析することで、フジツボが定着しない条件を見出すことができれば、港湾施設や船舶塗装の長寿命化が図れる。
 - b. **心筋細胞の3次元トラッキング**：ゼブラフィッシュの心筋細胞をトラッキングすることで、心臓の拍動を単一細胞レベルで記録する技術を開発する。
 - c. **白血球細胞の蛍光観察パラメータ最適化**：白血球の一種であるT細胞の蛍光観察の評価指標を開発する。その指標に従った蛍光観察パラメータの最適化を行い、蛍光観察を効率化する。
 - d. **線虫の運動解析と温度走性**：神経回路の構造が分かっている線虫において、感覚神経が集中している頭部をトラッキングする。また、温度刺激を与えるための温度勾配プレートを作成する。

4. 研究実施内容

(1) 実施の内容

A. 微生物内部の反応の数理モデル

a. 微生物運動の制御：シリコンオイルで囲まれたメチルセルロース内にゾウリムシをトラップした（図1）。シリコンオイルは硬いため、ゾウリムシがシリコンオイルに接触することは、ゾウリムシに機械刺激を与えたことと同じだと考えられる。このときの体内のカルシウムイオン濃度を可視化することにより、機械刺激に対する反応の可視化を行った。

b. 運動する微生物のトラッキング：微生物の位置を透過光とカメラで認識し、微生物の動きとは逆向きにステージを動かすことで、微生物を視野中心に制御できるトラッキング蛍光顕微鏡を開発した。細胞の位置を認識するためのカメラに並列（SIMD型プロセッサ）・高速（撮影速度1kHz）ビジョンシステムを用いた。励起光、蛍光、透過光の干渉を避けるために、各波長帯域をフィルタ等で分離した。制御用PCのOSにはRT-Linuxを用い、1kHzの制御周期を安定化した。このシステムと蛍光試薬 Indo1 を用いて、運動するゾウリムシの細胞内 Ca^{2+} 濃度を継続的に蛍光観察することに成功した（図2）。

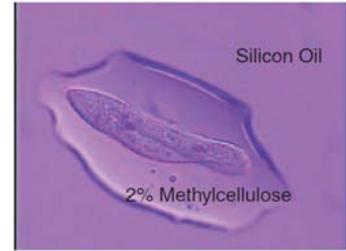


図1. ゾウリムシの非接触型刺激方法

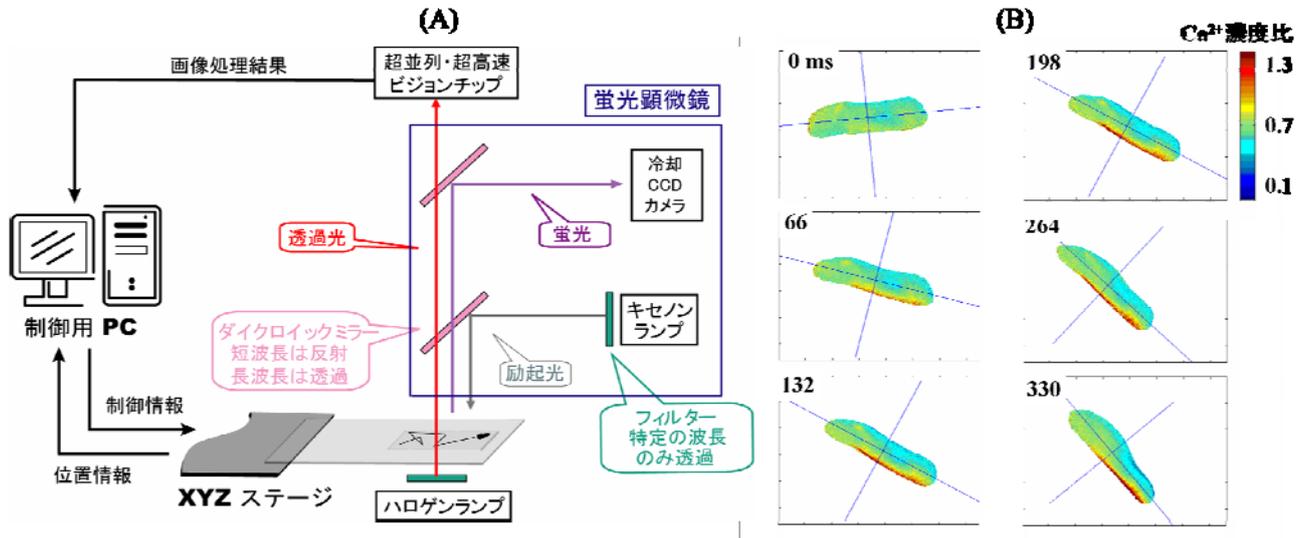


図2. (A) トラッキング蛍光顕微鏡システムの模式図。(B) 運動するゾウリムシ細胞内 Ca^{2+} 濃度の継続的な蛍光観察画像。

c. 蛍光色素の注入法の研究：ゾウリムシは細胞膜が硬いため、蛍光色素は細胞膜を通過せず、針を細胞内に刺す（マイクロインジェクション）手法以外には、蛍光色素の注入法は無いと思われていた。しかし、Indo-1 AM 用いて実験をした結果、Indo-1 AM は細胞膜を通過することがわかった。Indo1 は Ca^{2+} イオンと結合しているときと、解離しているときで、別の波長の蛍光を出す。それぞれの蛍光強度比と Ca^{2+} 濃度の関係（検量線）を求めることで、細胞内 Ca^{2+} 濃度が求めることができるようになった（図3）。

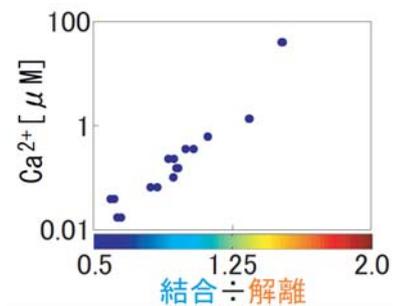


図3. 蛍光強度比と Ca^{2+} 濃度の関係。

- d. 蛍光による刺激反応の測定とモデリング：A – a で記述した方法でゾウリムシに機械刺激を与え、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を蛍光色素 Calcium green-1 で可視化し、ゾウリムシの反応モデルを作った。その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化から機械刺激時刻を推（センシング）することに成功した（図4）。

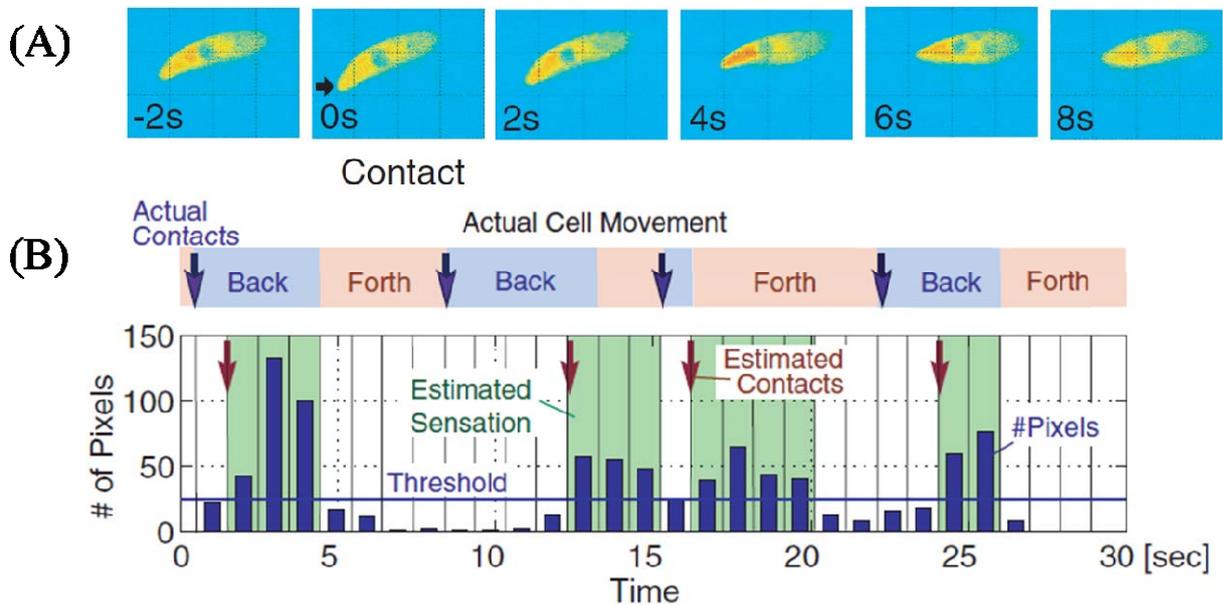


図4. (A) 機械刺激により起こるゾウリムシの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇。(B) ゾウリムシの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇からの推定（センシング）した機械刺激時刻と、実際の機械刺激時刻の比較。

B. 微生物群の協調制御

- a. 群の運動モデルの導出：相互作用（回避反応、逃避反応）と走性（走電性、走化性）を考慮したセルオートマトンで、ゾウリムシ群の運動をモデル化した。このモデルを用いて電場勾配中のゾウリムシ群の集団平均座標の時間変化を再現することに成功した（図5）。

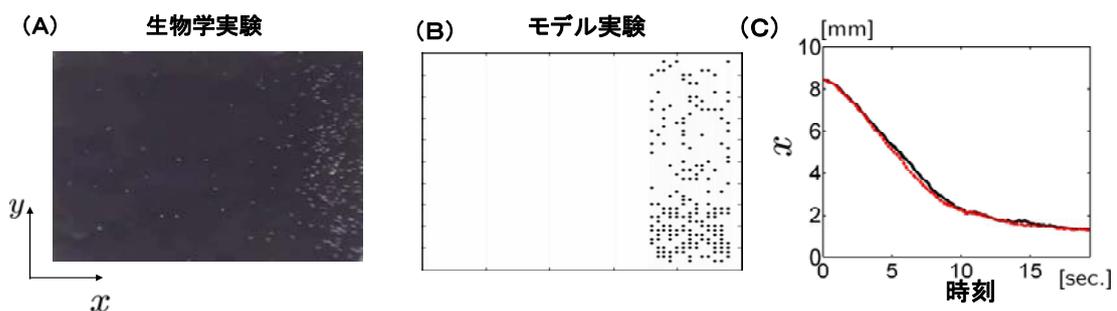


図5. (A) 電場勾配中で移動するゾウリムシ。(B) モデル実験から計算した細胞の位置。(C) 細胞群の集団平均座標の時間変化。黒線と赤線とは、実測値とシミュレーション値を示す。

- b. 電場勾配パターンの生成：ゾウリムシの運動を任意の方向に制御するために、各電極からの電場がどのように重なり合うかを順問題として定式化した。また、目標の電場勾配パターンから各電極の電位を求める手順を逆問題として定式化し、解析解を導いた。そして、Cで記述する分布型刺激デバイス (4.5mm×4.5mm) のラージモデル (65mm×65mm) を作成し、実験値と計算値を比較した。比較の結果、電場勾配パターンの制御が成功していることがわかった（図6）。

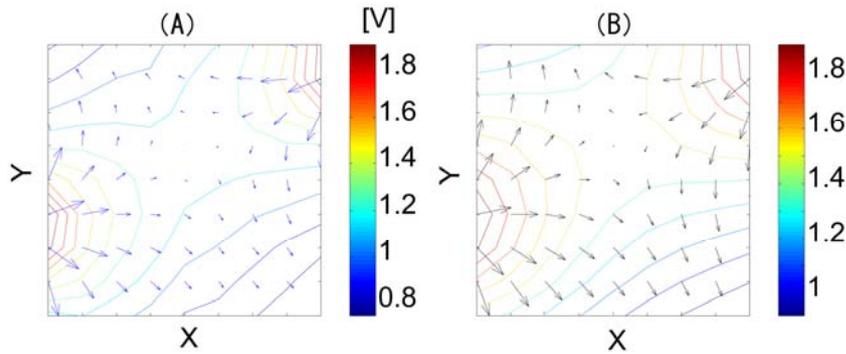


図6. (A)実験と(B)計算で得られた電場勾配パターン。

c. センサ特性に応じたセンサ配置：機械刺激や電場刺激により生じるゾウリムシの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とそれを可視化する蛍光色素(Indo-1 と Calcium green-1)の組み合わせについて検討した。その結果、Indo-1 は Ca^{2+} 濃度の絶対値を測定できるが、Calcium green-1 は Ca^{2+} 濃度の絶対値が測定できないことがわかった。

C. 分布型刺激デバイスの開発

- a. 培養液中に電極を配置すべきかどうか検討：当初は電極が溶液中に露出していたため、電極近傍で電気分解等の化学反応が発生しており、微生物が電極に近づきすぎると微生物に異常がおこった。これを避け、より安定した電場勾配を発生させるために、金メッキ電極を用いた(図7)。
- b. 電場勾配パターンの設計：高い空間分解能(位置精度)を得るためには、電極数を増やす必要がある。このとき、電極を個別に制御していたのではチャンネル数が膨大になり、時間分解能(サンプリングレート)が下がってしまう。そこで、タスクごとに微生物の典型的な配置パターンを考え、その配置をコード化した(図8)。コンピュータから送られてきたコードをデバイス内部で展開することで多数の電極を制御した。

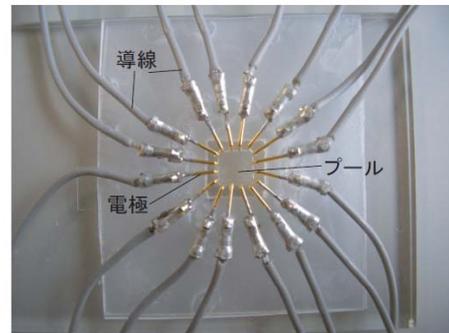


図7. 分布型刺激デバイス。

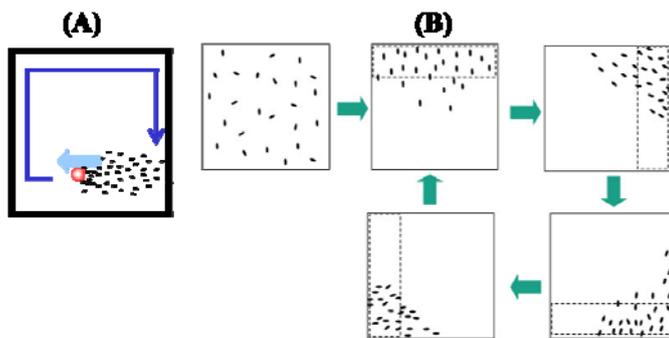


図8. (A)ゾウリムシを用いてビーズ(赤丸)を容器内で周回させるコードの模式図 (B) 1. 一様な電場をかける。2. 陰極付近のゾウリムシの画素数をカウントする。3. 画素数の変化が閾値を超えたら、電場を切り換える。4. 時計回りに陰極の位置を変える。

D. 3次元トラッキングのための高速可変焦点レンズの開発

- a. 対物レンズ移動型可変焦点機構の開発：電動ステージよりも微細に、観察領域の上下動を可能にするために、ピエゾ素子で対物レンズの位置を制御する機構を持つトラッキング蛍光顕微鏡システムを開発した(図9)。

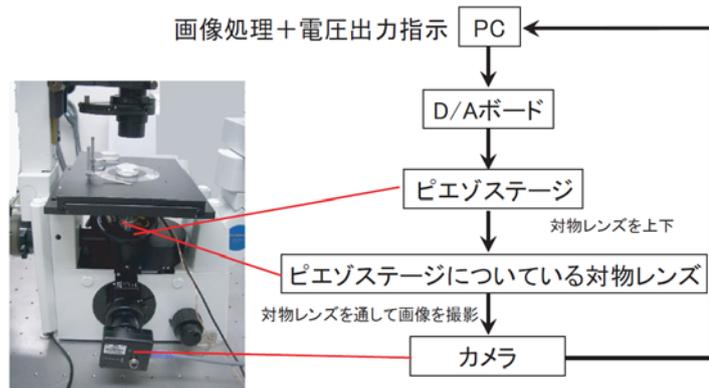


図9. 対物レンズ移動型トラッキング蛍光顕微鏡システム。

- b. 容量可変型可変焦点レンズの開発：積層型ピエゾアクチュエータを利用する高速応答を実現する駆動原理と、実用的な収差量の可変屈折面である液-液界面とを組み合わせることで、高速かつ高解像力の可変焦点レンズを開発した（図10）。
- c. 自動焦点合わせのための画像処理アルゴリズム：細胞を平行かつコヒーレントな光で照明した際にその背後にできる干渉パターンを計測することで、焦点面と細胞の奥行き方向の位置関係を一枚の画像から推定し、自動焦点合わせができる画像処理アルゴリズムを開発した（図11）。

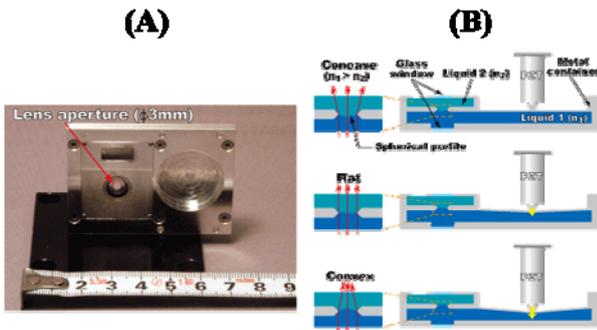


図10. (A) 容量可変型可変焦点レンズの写真。
(B) 断面図の模式図と可変焦点の仕組み。

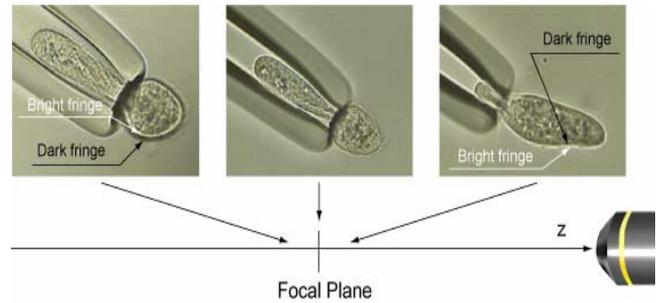


図11. 焦点を基準とした微生物の位置と干渉パターンの関係。

E. 微生物センサの開発

- a. ゾウリムシを用いた微生物センサ：電場勾配中におけるゾウリムシ群の集団平均座標の変化量と、電場勾配強度の関係性を明らかにした（図12）。この結果を用いると、移動量から電場勾配強度を推定することができる。つまり、超分散マイクロアクティブセンシングの初めの一例だと言える。
- b. 好中球と細胞性粘菌を用いた微生物センサ：生体内利用を考え白血球の1種である好中球と、好中球と類似した運動機構を持つ細胞性粘菌を電場センサとして用いた。ゾウリムシを用いて行った電場刺激と細胞内Ca²⁺濃度の蛍光観察プロトコルを、白血球と細胞性粘菌に適用した。人工的に発生させた電場勾配中に白血球と細胞性粘菌を置いたところ、陰極に向かって移動した（図13）。この結果から、白血球と細胞性粘菌を電場センサとして用いることができる。

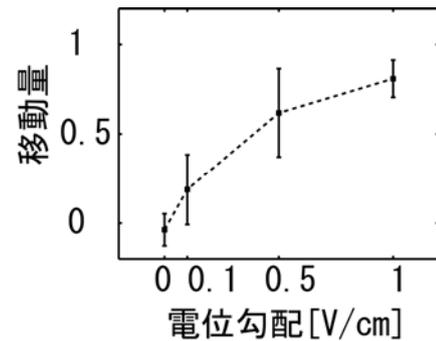
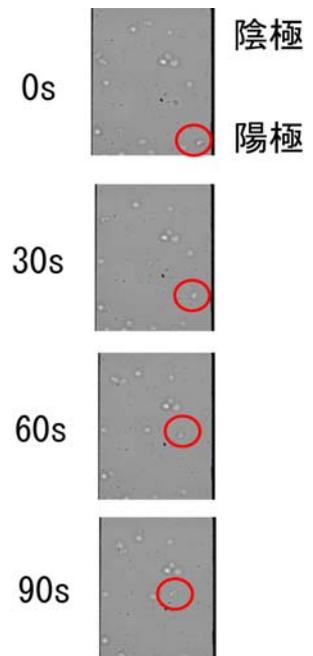


図12. ゾウリムシ群の集団平均座標の移動量を用いた電場勾配の超分散マイクロアクティブセンシング結果。

F. センサ配置とセンサ情報統合

- a. ゾウリムシの移動戦略：ゾウリムシの物理的なダイナミクスモデルを構築した。このモデルを解析し、ゾウリムシが二輪車によく似た非ホロノミック拘束系であること、大域的に可制御であることを示した。この結果により、ロボティクス分野において確立された既存の非ホロノミック系の軌道計画手法がゾウリムシに適用できる可能性がひらかれた。さらに、このモデルに Lyapunov 的手法を適用して、切り返し等による尖点をなくした軌道計画および運動制御手法を提案し、任意の地点から目標地点に向かって安定に軌道が収束することを数値実験により検証した（図14）。

図13. 細胞性粘菌を用いた電場勾配の超分散マイクロアクティブセンシング結果。



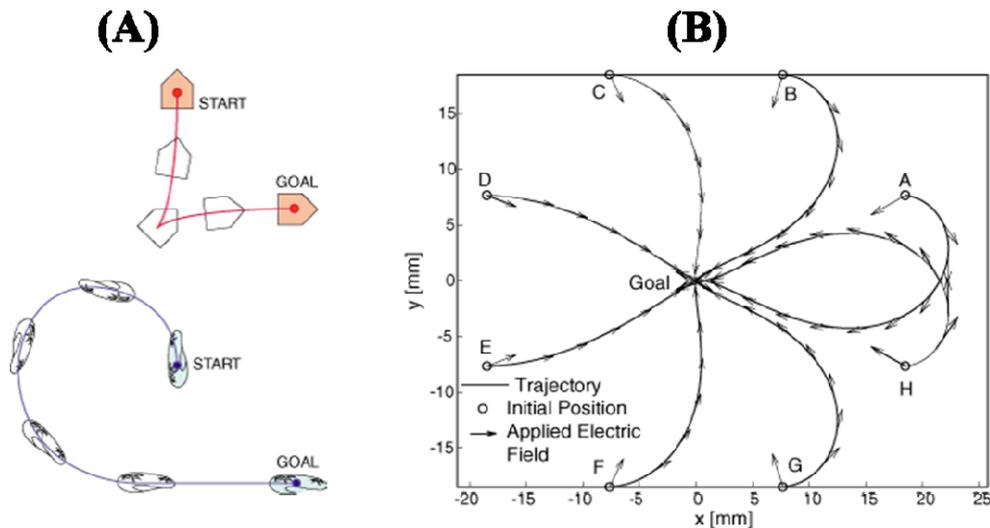


図14. (A) 上：二輪車や水中推進体の軌道計画。下：ゾウリムシの軌道計画。(B) 提案する制御則によって作られた軌跡。

G. トラッキング顕微鏡の改良

- 観察手法設計**：蛍光画像で直接フィードバック制御を行えるトラッキング顕微鏡システムを開発した(図15)。蛍光は光量が微弱なために、トラッキング用のカメラに、感度が高く高速なEM-CCDカメラを用いた。正立顕微鏡の手動ステージを取り外し、G-dで記述する電動ステージを取り付けた。制御周期は約150Hzであった。
- 画像処理アルゴリズム**：トラッキングしている細胞と、その他の対象を区別し、ロバストなトラッキングを実現する画像処理アルゴリズムを開発した(図16)。アルゴリズムの新規性は、細胞だと認識する面積がある一定値に近づくようにした工夫である。一定値には、予め測定しておいた細胞面積の集団平均値を用いた。

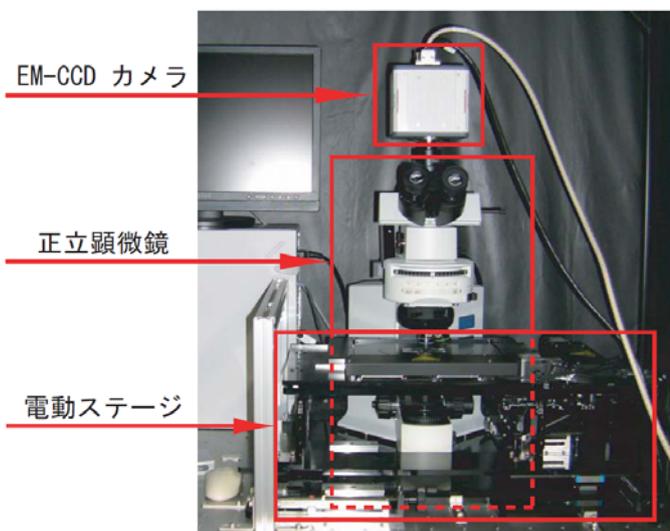


図15. 蛍光画像で直接トラッキングする顕微鏡システム。

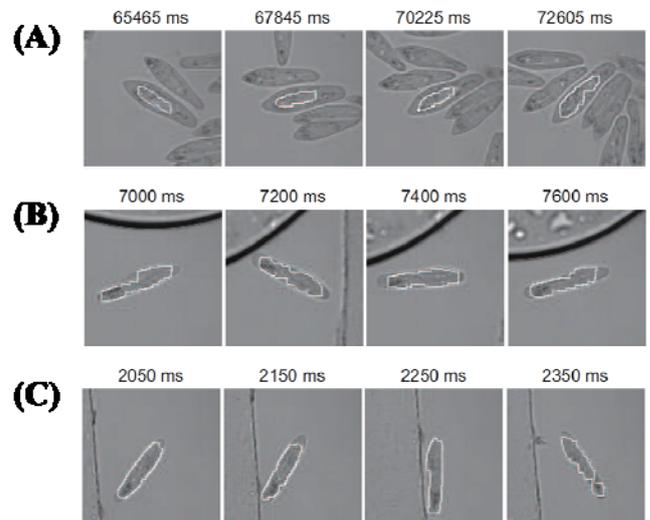


図16. 提案アルゴリズムを用いたトラッキング結果。(A) その他のゾウリムシ、(B) 測定液中の泡、(C) 容器の枠と、追跡しているゾウリムシが接触しても、ロバストに同一のゾウリムシのみを追跡できている。

- フォーカス制御**：高速にフォーカスを制御するためのフォーカスずれ検出アルゴリズムの開発を行った。
- ステージ設計**：ステージの構造を片手持ちから両手持ちに変更し、試料の重量と振動に対してロバストにした(図15)。さらに、耐荷重性を100gから1kgに増加した。その結果、H-dで記述する温度勾配プレートを電動ステージ上に載せられるようになった。また、可動範囲をX:25mm、Y:25mmからX:160mm、Y:60mmへ広げた。そして、最大速度も30mm/sから60mm/sに増加させた。

H. 多様な生物学研究者との協働

- a. フジツボ幼生キプリスの運動解析：キプリスをトラッキングし、キプリスが底面にタッチしてから離れるまでの様子を記録することができた（図17）。また、電動ステージの変位情報からキプリスの移動軌跡を再構成できた。キプリスは北海道大学の角五彰 助教に譲って頂いた。

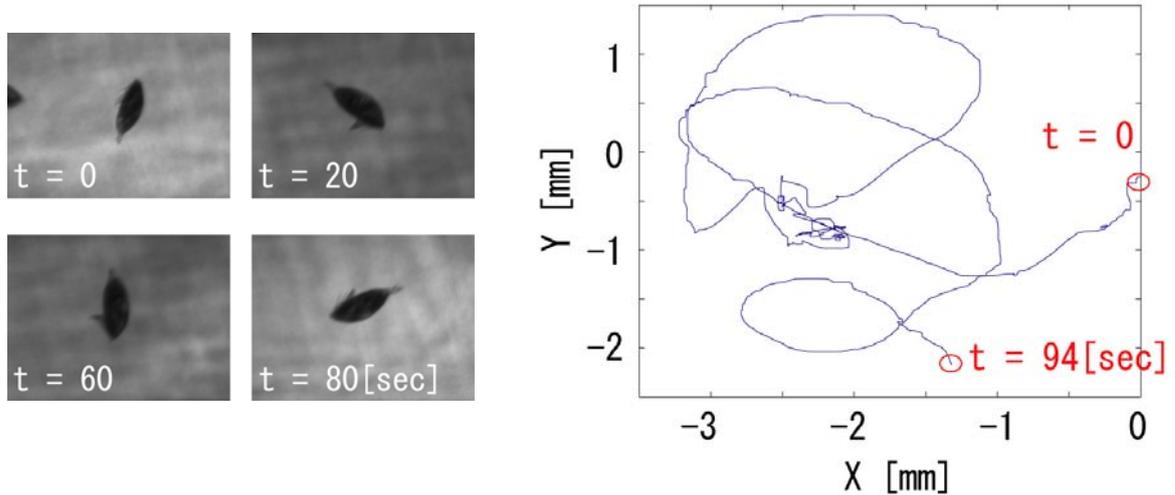


図17. (A) キプリスのトラッキング画像。(B) 運動するキプリスの軌跡。

- b. 心筋細胞の3次元トラッキング：ゼブラフィッシュの心筋細胞の核を赤色蛍光タンパク質 (RFP; Green Fluorescent Protein) で染色し、3次元の蛍光画像を取得した。画像をオフラインで解析することにより、単一細胞レベルで軌跡を明らかにする画像処理技術を開発した。この心筋細胞はポテトチップ状の軌跡を描いていた（図18）。蛍光画像は東北大学の柿崎周平 博士に譲って頂いた。

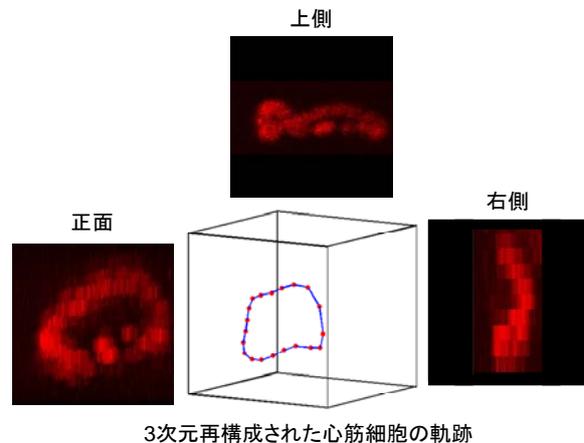


図18. 心筋細胞の3次元軌跡。3方向から撮影した蛍光画像を解析し、軌跡（青線）を再構築した。赤色の明るさは、細胞の存在確率を反映している。

- c. 白血球細胞の蛍光観察パラメータ最適化：白血球の一種であるT細胞群は、蛍光観察中に、分布の中心と幅が常に変化している（図19）。このような変化に合わせて観察者が、蛍光観察パラメータを手動で最適化することは困難である。そこで、評価関数最小化の戦略に基づく蛍光観察パラメータの自動制御技術を開発した。評価関数は、蛍光観察できる細胞数が多いほど小さく、蛍光観察枚数が多くほど大きくなる。次に、D-a で開発した対物レンズ移動型トラッキング顕微鏡システムを用いて、T細胞群を透過光観察した。観察結果から、T細胞の分布計測と運動モデル作成を行った。計測結果とモデルを用いて蛍光観察パラメータを最適化し、T細胞観察の自動蛍光観察を行った。その結果、提案手法により、最適値が達成できることがわかった（図20）。T細胞は群馬大学の鈴木健史 助教に譲って頂いた。

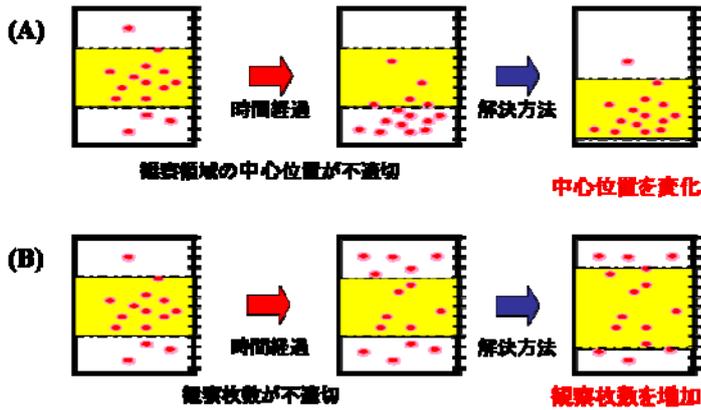


図19. T細胞の蛍光観察時に起こる問題と提案する解決法。赤丸は細胞を、黄色は蛍光観察領域を示す。

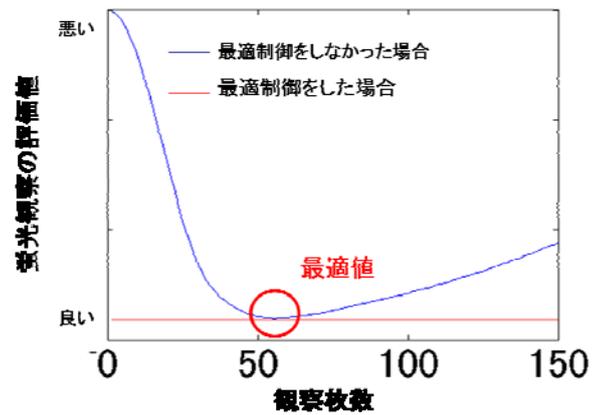


図20. 提案アルゴリズムを用いた蛍光観察パラメータ最適化結果。

d. 線虫の運動解析と温度走性: DW101 という線虫株を観察対象として使用した。DW101 は咽頭筋部位に緑色蛍光タンパク質(GFP; Green Fluorescent Protein) が発現している(図21)。このGFPは常に蛍光強度が強く観察が容易であり、また咽頭筋部位は神経細胞の存在する線虫の頭部付近に位置するため、観察対象とした。その結果、線虫頭部の継時的な蛍光観察に成功した(図22)。DW101は東北大学の東谷篤志教授に譲って頂いた。また、温度走性を調べるために温度勾配プレートを作成した(図23)。高温側と低温側で各1つの恒温槽を使用し、チューブを通して温度勾配プレートに温度差がある水を流して勾配を作り出す。しかし恒温槽で設定した温度と温度勾配プレートにおける温度は必ずしも一致していない。そのため温度勾配プレート上の実際の温度分布をサーモグラフィ等で計測した(図24)。

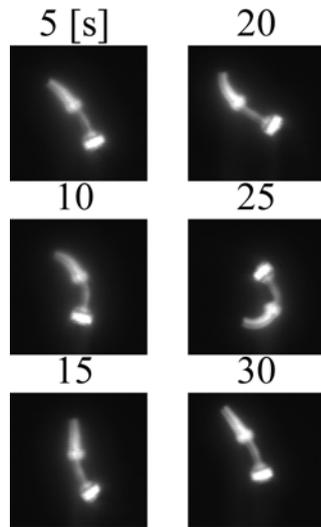


図21. (A) 提案システムを用いてトラッキングした線虫内GFP領域の蛍光像。白色の明るさがGFPの蛍光強度を反映している。

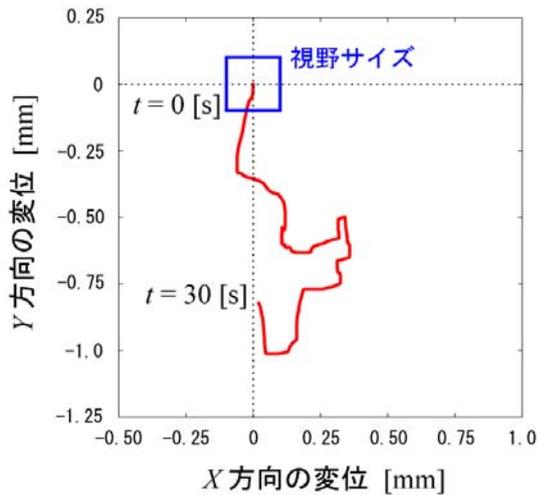


図22. 電動ステージ変位情報から再構築した線虫内GFP領域の移動軌跡。赤線は移動軌跡を、青線はEM-CCDカメラの視野サイズを示す。

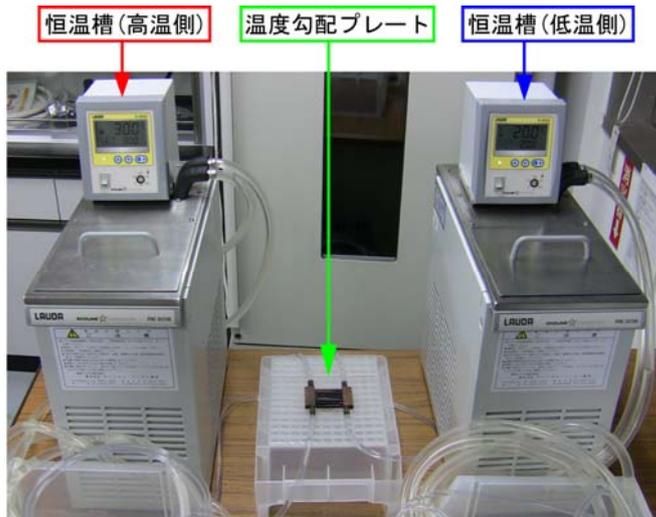


図 2.3. 温度勾配システム。高温側と低温側、それぞれの恒温槽からチューブを通して温度勾配プレートに水を流し、温度勾配を作り出す。

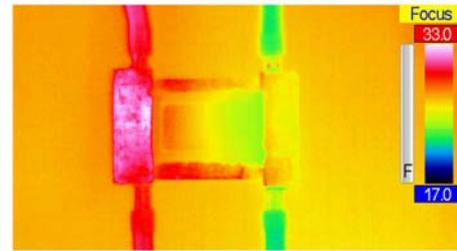


図 2.4. 温度勾配プレート上の熱画像。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

トラッキング蛍光顕微鏡は、さきがけ研究から本研究にいたる間、一貫して開発・改良を行ってきたことにより実現できた、世界に例を見ない蛍光顕微鏡システムである。動く細胞を高空間分解能で長時間観察することは、生物学者にとって長年の「夢」であった。よってその「夢」を実現するトラッキング蛍光顕微鏡システムは非常に画期的であると共に実用性が高く、イノベーションに繋がる可能性が高い。トラッキング蛍光顕微鏡のプロトタイプは既に 3 種類存在し、画像処理技術の開発と組み合わせることで、高い安定性を有している。また、ゾウリムシ、白血球、キプリス、線虫への応用例からもわかるように、高い多様性も有している。さらに、電場刺激や温度刺激との組み合わせによる、高い発展性を有している。

近年における Nature、Science の論文割合を見ると、細胞の動く機構を研究している研究者は非常に多く、トラッキング蛍光顕微鏡の社会ニーズは非常に高いことが分かる。なぜなら、一つの卵細胞が分裂して、その分裂した細胞が位置を変えつつ人間の手や胴体を形作る過程を想像してみると、全ての細胞は動くと言っても過言では無く、動く機構は細胞の最も基本的かつ重要な機能になっているからである。つまり、バイオ分野における基礎研究としての細胞運動研究にとどまらず、免疫細胞の移動と異物駆除を研究する免疫医学分野等、細胞の分裂と体の形成を研究する再生医学分野、神経細胞がどのように体の動きを制御しているのかを研究する神経科学等において、トラッキング蛍光顕微鏡は標準的な実験装置になりうる。

トラッキング蛍光顕微鏡が顕在化された場合、従来の蛍光顕微鏡では取得できなかったレベルの高空間解像度の蛍光画像を生物・医学研究者が取得できるようになる。高空間解像度の蛍光画像とは、細胞全体の大域的な蛍光像と、局所的な揺らぎが導入された新しい物理次元の蛍光画像のことである。そしてその画像における、細胞内イオンや分子の反応過程（流れ、動き）や時間履歴という細胞内ダイナミクスを解析することで、これまでの細胞走性研究を一新する発見が起こりうると期待される。

またトラッキング蛍光顕微鏡により、実験技術が未熟な研究者でも容易に細胞を操作できるようになる。つまり、実験者の時間・努力・才能を必要としていた顕微鏡技術の修練を軽減する用途に用いることも出来る。顕微鏡実験の自動化は、システムバイオロジー的研究のハイスループット化する技術に他ならない。つまり、トラッキング蛍光顕微鏡の市場は、先に挙げた利用分野に携わる大学・研究所に留まらず、製薬、食品、農業、公衆衛生、保健に関わる企業の研究機関にまで広がりうる。

世界的にみても、日本の顕微鏡開発技術はこれまで非常に高かったが、トラッキング蛍光顕微鏡が製品化されることで、細胞トラッキングという新しい顕微鏡分野を日本が先陣を切って開拓できる。つまり、日本の国際競争力を高める潜在能力を、トラッキング蛍光顕微鏡は有している。我々は、トラッキング蛍光顕微鏡の根幹技術は、既に日本国内の特許取得を済ませている。また現在、国際的な特許申請を行う準備を進めている。画像処理等の周辺特許も国内で特許申請準備中である。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

- A. 微生物の継続観察：**本研究で行った、微生物の観測に対する高速ビジュアルフィードバックの応用は世界でも例を見ない。この研究成果はロボティクス分野では世界的に高く評価された。また、生物・医学系の国際学会においても注目された。そして今回、多様な生物学研究者との共同研究を通じて、フジツボ、心筋細胞、白血球、線虫を題材に、生物学的に解かれていない新たな問題設定を行い、その解決に向けた観察技術の開発という新たな研究の方向性を具体化できた。
- B. 微生物群の統率メカニズム：**微生物をロボットのようにプログラム可能な行動体とみなすことは、本研究の特色の一つである。以前に構築した1個体の運動モデルを用いて、運動制御の理論を構築出来たことで、微生物群の統率メカニズムの理論的基盤を作ったと言える。また、ゾウリムシ群における相互作用と走性の両方をモデル化、及びゾウリムシ群の運動を任意の方向に制御するための分布型刺激デバイスと電場勾配パターンを開発できたことで、実際に微生物群を統率することができた。
- C. 微生物の内部反応の計測：**以前に行った静止状態の微生物に対する内部状態の観測経験を元に、本研究では、運動している微生物の内部状態を計測できた。これまで得られている生物学的な知見は静的な反応を逐次的に積み重ねて現象を理解する準静的な理解であったが、計測装置や制御装置の飛躍的な発展により、生体反応をリアルタイムで計測することが可能になった。また、微生物の運動、外部刺激に対する微生物の反応、内部状態の関係をシステムバイオロジーの観点で統一的に明らかにする計測法の標準化ができた。
- D. 微生物を用いたアクティブセンシング：**多数の微生物を移動させてアクティブセンシングを行うことが本展開研究の最大の特色である。単に反応をモデリングするだけではなく、さらに踏み込んで微生物センサの動的配置とアクティブセンシング、センサ情報統合を研究した。このような、多数のセンサの配置とセンサ情報の統合を目的とした研究は国内外に例を見ない。

6. 研究実施体制

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
橋本 浩一	東北大学大学院 情報科学研究科	教授	研究の統括、分散制御理論の構築、センシングモデルの開発	平成18年4月～平成21年3月
五十嵐 康伸	東北大学大学院 情報科学研究科	産学官連携研究員	蛍光分子プローブによる細胞内情報計測とセンサフィードバック制御、細胞内分子反応モデルの同定、画像処理技術開発	平成18年4月～平成20年3月、平成20年11月～平成21年3月

出口 雄規	派遣先	JST 研究員	蛍光分子プローブによる細胞内情報計測とセンサフィードバック制御の補助	平成18年11月～平成20年3月
小原健	派遣先	JST 研究員	蛍光分子プローブによる細胞内情報計測に関する補助	平成18年11月～平成20年3月
小原健	東北大学大学院 情報科学研究科	技術補佐員	蛍光分子プローブによる細胞内情報計測とセンサフィードバック制御の補助	平成20年5月～平成21年3月
田中 祥	派遣先	JST 研究員	画像処理技術開発の補助	平成19年8月～平成19年12月
費 仙鳳	東北大学大学院 情報科学研究科	技術補佐員	画像処理技術開発の補助	平成20年5月～平成21年3月
丸 三徳	東北大学 工学部	技術補佐員	蛍光分子プローブによる細胞内情報計測とセンサフィードバック制御の補助	平成20年5月～平成21年3月
荒井 翔悟	東北大学大学院 情報科学研究科	技術補佐員	分散制御理論の構築の補助	平成20年5月～平成21年3月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H20.3.21	細胞が持つゆらぎ発生機構とその機能	東北大学 工学部 機械知能系 2号館	70人	細胞が持つゆらぎ発生機構に関する生物物理学的研究、及び、細胞走性機能におけるゆらぎの役割について議論した。
H21.3.19	次世代細胞計測・解析技術	東北大学 工学部 機械・知能系 共同棟	40人	高速カメラ及び高速制御を用いた新しい顕微鏡技術の開発、及び、非線形非平衡物理学を用いた新しい顕微鏡画像解析技術について議論した。

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
特になし。			

8. 発展研究による主な研究成果

(1) 論文発表 (英文論文 11 件 邦文論文 0 件)

A. 雑誌論文

- a. N. Ogawa, H. Oku, K. Hashimoto and M. Ishikawa: "Trajectory Planning of Motile Cell for Microrobotic Applications", Journal of Robotics and Mechatronics, Vol. 19, No. 2, pp. 190-197, 2007.
- b. N. Ogawa, H. Oku, K. Hashimoto and M. Ishikawa: "A physical model for galvanotaxis of Paramecium cell," Journal of Theoretical Biology, vol. 242, issue 2, pp. 314-328, 2006
- c. H. Oku, M. Ishikawa, Theodorus, and K. Hashimoto: "High-speed autofocusing of a cell using diffraction pattern," Optics Express, vol. 14, pp. 3952-3960, 2006

B. 査読付き国際学会

- a. X. Fei, Y. Igarashi, and K. Hashimoto: "4ms Level Set Method - Parallel Implementation of Contour Detection of Paramecia by using CPV System", 17th CISM-IFTOMM Symposium on Robot Design, Dynamics, and Control (Romansy2008), pp. 27-34 (P61), 2008.
- b. X. Fei, Y. Igarashi, and K. Hashimoto: "2D tracking of a single paramecium by using a parallel level set and a visual servoing", IEEE/ASME International Conference on Advanced Intelligent Mechatronics (AIM2008), pp. 27-32, 2008.
- c. Y. Iwatani, K. Hashimoto, Y. Deguchi: "A cellular automaton model for collective motion of microorganisms", 11th IFAC/IFORS/IMACS/IFIP Symposium on Large Scale Systems, Gdansk, Poland, Regular Session:1-3, 2007
- d. A. Davies, N. Ogawa, H. Oku, K. Hashimoto and M. Ishikawa: "Visualization and Estimation of Contact Stimuli using Living Microorganisms," 2006 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics (ROBIO 2006), pp. 445-450, 2006
- e. K. Hashimoto, K. Takahashi, N. Ogawa, H. Oku: "Visual Feedback Control for a Cluster of Microorganisms," SICE-ICASE International Joint Conference 2006 (SICE-ICCAS 2006), pp. 4198-4201, 2006
- f. N. Ogawa, H. Oku, K. Hashimoto and M. Ishikawa: "Dynamics Modeling and Real-Time Observation of Galvanotaxis in Paramecium caudatum toward Robotic Maneuvering," The 3rd International Symposium on Aero Aqua Bio-mechanisms (ISABMEC 2006), P02, 2006
- g. K. Takahashi, N. Ogawa, H. Oku and K. Hashimoto: "Organized Motion Control of a lot of Microorganisms Using Visual Feedback," 2006 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA 2006), pp. 1408-1413, 2006
- h. H. Oku, Theodorus, K. Hashimoto and M. Ishikawa: "High-speed Focusing of Cells Using Depth-From-Diffraction Method," 2006 IEEE International Conference on Robotics and Automation (ICRA 2006), pp. 2626-2641, 2006

(2) 口頭発表

①学会

国内 13 件, 海外 4 件

②その他

国内 2 件, 海外 0 件

(3) 特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

	件数
国内出願	2 (済) + 1 (予定)
海外出願	1 (予定)
計	4

(4) その他特記事項

A. 著書

- a. N. Ogawa, H. Oku, **K. Hashimoto**, and M. Ishikawa : Dynamics Modeling and Real-time Observation of Galvanotaxis in Paramecium caudatum, Bio-mechanisms of Swimming and Flying --- Fluid Dynamics, Biomimetic Robots, and Sports Science --- (N. Kato and S. Kamimura Eds.), Springer, pp.29-40 (2008) (ISBN 978-4431733799)

B. 受賞

- b. 橋本浩一が Best Paper in Biomimetics (2006 IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics) を受賞した。
c. 小原健が、独立行政法人 日本学生支援機構の平成 19 年度 優秀学生顕彰事業より、学術部門の優秀賞を受賞した。
d. 丸三徳が、日本機械学会 畠山賞を受賞した。

C. その他

- a. 小原健, 五十嵐康伸, **橋本浩一**: "2 波長分岐光学系を用いた蛍光観察"が, KS オリンパス株式会社発行の ジーオングベース&ジーオプティクス パンフレットにおいて使用例として紹介 (株式会社 ジーオングストローム社 HP の ジーオングベース&ジーオプティクス コーナーでも使用例として紹介), 2007

9. 結び

9-1. 研究の目標等から見た達成度

達成度は 80%である。研究開始時に設定した全ての課題に着手し、その内多くの目標は達成できた。そして、幾つかの課題は論文 (もしくは特許) として発表できた。しかし、本研究で行った課題の多くは未だ論文になっていない。その理由は、それらの課題が非常に萌芽的な挑戦だからである。これらの課題を論文として発表できた時点で、本研究の達成度を 100%としたい。

9-2. 得られた成果の意義等の自己評価

微生物群を用いた超分散マイクロアクティブセンシングを行っている研究グループは我々以外に無く、研究課題提案時期から継続して高い独自性を保っている。また、ゾウリムシ群を用いた超分散マイクロアクティブセンシングが示した、最小電場勾配測定値 0.1 [V/cm]は、生物学的な知見では非常に微小な値と言える。我々の知る限りでは、これほど小さな電場勾配が、マクロな細胞群の動きに影響するという報告は他にない。ただ、工学的な測定機器を使えばこの程度の電場勾配を測ることは可能である。よって、今後は電場勾配にこだわらず、より幅広い種類の細胞と刺激を用いて、超分散マイクロアクティブセンシングの実用性を検討することが必要である。ただ、微生物の体内情報のフィードバック技術は未だ不完全であり、今後の積極的な研究の継続が必要である。

9-3. 今後の研究の展開

生物学研究者と協力し、トラッキング蛍光顕微鏡を生物学的知見の発見・蓄積に役立てる目的は、トラッキング蛍光顕微鏡の開発方向を具体化する上で重要である。特に、T細胞と線虫の研究は今後も継続する。具体的な課題としては以下のものがあげられる。

T細胞: 現在は、細胞数が多く細胞分布が正規分布で近似できる状況で実験を行っていた。今後は、細胞数が少なく細胞分布が正規分布で近似できない場合にも対応できるようにする必要がある。また、現在の運動モデルは、壁や底などの境界条件が入っていなかった。それらをモデルに取り入れ、境界付近での運動予測性能を上げる必要がある。また、制御する蛍光観察パラメータは連続的であったにも関わらず、実際に制御できる値は離散的であった。制御入力が離散的な値でも最適化できる最適動的量子化器を導入する必要がある。

線虫: 本研究では体の咽頭筋部位に GFP を発現させた線虫を使用した。今後は細胞内 Ca²⁺ 濃度と相関のある蛍光物質を、感覚神経細胞内に持つ線虫で観測を行う必要がある。Yellow Cameleon はシアン蛍光タンパク質(CFP; Cyan Fluorescent Protein)、イエロー蛍光タンパク質(YFP; Yellow Fluorescent Protein)を内部に持ち、CFP と YFP の蛍光の強度比から細胞内 Ca²⁺ 濃度を求めることができる。そのため、今後は Yellow Cameleon の蛍光観察系を、トラッキング蛍光顕微鏡に追加する必要がある。また線虫の温度走性に着目して、温度刺激による線虫の個体行動と細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化を観測し、神経の活動状態を評価できるシステムへと発展させたい

9-4. 研究代表者としてのプロジェクト運営について (研究費の使い方等)

当初、橋本研究室には生物学の実験機材が殆どなかった。SORST の潤沢な研究費により、私の研究構想を具体化するための実験機材を揃えることができた。特に高価な実験機材は以下のものであった。蛍光観察部品 (オリンパス)、トラッキング用ステージ (KS オリンパス、ヒーハイス精工)、透過光を用いたトラッキング用カメラ (CPV システム、浜松ホトニクス)、蛍光を用いたトラッキング用カメラ (C9100-02、浜松ホトニクス)。

また、この課題を終了するまでに多くの方々に協力を頂いた。細胞トラッキング装置の開発は、東京大学 石川正俊 教授、奥寛雅 助教、尾川順子博士と共同で行った。Ca²⁺濃度の蛍光観察は、東北大学 坪川宏 教授と共同で行った。ゾウリムシの走性研究は、大阪大学 中岡保夫 助教授と共同で行った。細胞性粘菌の研究は、東北大学 雨貝愛子 助教と共同で行った。好中球の研究は、東北大学 神取孝司さん、朝比奈翔さん、芳賀沼智美さんと共同で行った。T細胞の研究は、群馬大学 鈴木健史 助教と共同で行った。ゼブラフィッシュの研究は東北大学 柿崎周平 博士と共同で行った。キプリスの研究は、北海道大学 龔劍萍 教授、角五彰 助教、室崎喬之さんと共同で行った。線虫の研究は、名古屋大学 森郁恵 教授、久原篤 助教、大西憲幸さん、及び東北大学 東谷篤志 教授、森ちひろさん、木村孝文さん、知識麻友子さんと共同で行った。材料研究に対するトラッキング蛍光顕微鏡の応用法について京都大学の吉川研一 教授、住野豊 博士より助言を頂いた。東北大学 情報科学研究科科、及び機械知能系の事務の方々には、多くのサポートを受けた。JST の田村亘弘 技術参事、関康江さんは本研究の牽引を手助け頂いた。その他にも、ここに書ききれない位多くの方々に助言、指導を頂きました。本研究に関わって頂いた全ての方々に、深く感謝致します。

9-5. 研究室の雰囲気が伝わるようなメンバーの集合写真

橋本研究室では、毎年9月に東北大学 職員研修所 鳴子会館にてゼミ合宿を行う。その会場にて撮影した写真を以下にまとめる。

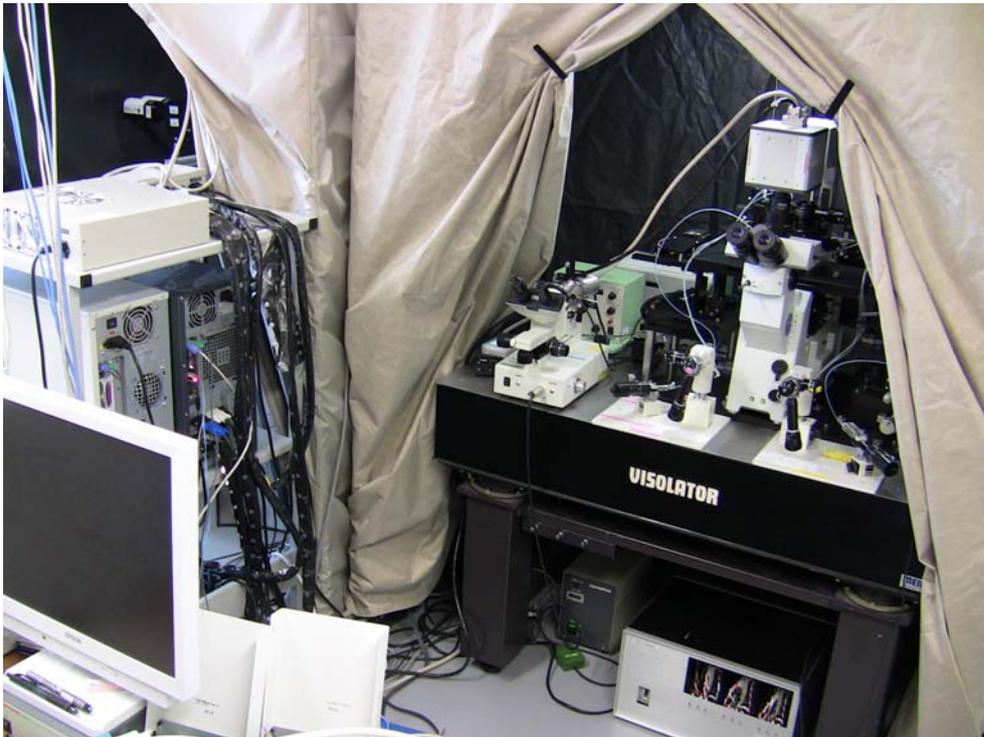


2006年度の研究室合宿にて

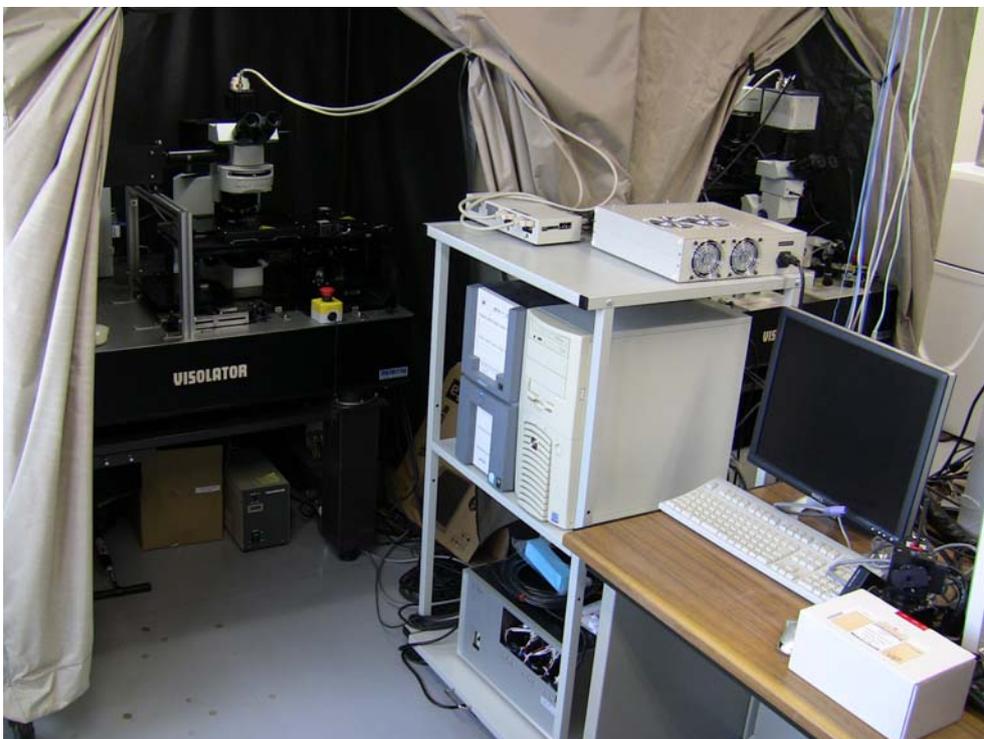


2007年度の研究室合宿にて

9-6. 実験室や作製した主な研究設備のスナップ写真等



左奥が、透過光像を用いたトラッキング顕微鏡。
右手前が、蛍光画像を用いたトラッキング顕微鏡。



左手前が、透過光像を用いたトラッキング顕微鏡。
右奥が、蛍光画像を用いたトラッキング顕微鏡。
右手前が、制御用 PC。