
研究報告

水中における生体の3次元トラッキング手法

学習院大学 理学部 物理学科 教授 西 坂 崇 之

【背景と概要】

西坂研究室では、対物レンズで集光した光束をプリズムで分割することにより、水中における粒子を顕微鏡下で3次元的に追跡する手法を開発してきた。この方法を用い、これまでにポリスチレンビーズや量子ドットといった人工的な粒子のみを対象に測定を行ってきた[1]。しかしこういったアプローチが、果たして水中で遊泳するバクテリアのような生体に应用できるかどうかという点については、未だ確認ができていない。広いレンジで遊泳する運動の追跡には2つの対物レンズを用いる方法が有用であることが示されており[2]、これらのまったく異なった検出手法を比較して利点と欠点を評価する必要がある。

そこで本課題では、遊泳する水槽中の生体の動きを2台のカメラで追跡し、その運動を3次元的に再構成する解析系の構築を行った。～10 cm オーダーの大きなスケールにおける3次元のトラッキング方法が確立されれば、同じ解析手法を顕微鏡のミクロスケールに応用する助けとなる。最終的には、これまでに開発してきた手法の校正として利用する足がかりとなる。

また本研究室では、生体そのものとタンパク質の間に位置する、タンパク質の集合体である超分子機械の動態を3次元で観察する手法も開発している。現在は、浜松医大のグループと1本の繊毛の運動を定量化する方法を検討しているが、本課題の一部として、自動解析のブラッシュアップも行った。

【研究の内容と成果】

1. 機器の立ち上げ

4月からの半年の期間において、映像装置の選定、および撮影する生体の維持に必要な機器の購入と立ち上げを進めた。

小型カメラの品質に定評のある東芝テリー社の機材を基本とすることにし、カメラヘッドにCS5270B、カメラレンズにC3516-Mを購入した。NTSC信号のリアルタイムキャプチャーには、ノート・デスクどちらのタイプでも対応できるように、PCIボードをあえて避け、USBによる非圧縮コンバーター DFG/USB2-It (IMAGING SOURCE 社) 選定した。当初の予定では、2台のキャプチャーシステムを1台のPCで動作させることで2つの同じ瞬間の映像を解析する予定であったが、2台のキャプチャーを同時に行うために専用開発されたソフトウェア (StreamPix、カナダ Norpix 社) が必要であること、またフィールド単位で同時刻の取り込みが保障されなといった複数の問題が判

明したため、研究室で現有の電子ライン／ワイプ装置（LG410W、東芝テリー）を用いて画面の合成を行う方針に変更した。同期を出力する NTSC 信号合成装置については、今後に画像機器メーカーから生産される望みは無いため、システムとしての汎用性には欠ける。しかしながら本プロジェクトの予算規模では妥当な選択と判断した。

実際の撮影に使用する生体として、5-20 cm の円形の形状の Symphysodon（スズキ目・シクリッド科）を想定し、維持用の 150 ℓ および観察用の 30 ℓ タンクを準備したが、タンク間の生体の輸送の難しさを考え、試験的に小型種の Sphaerichthys（スズキ目キノボリウオ亜目・オスフロネムス科）を用いた。色が黒に近く、また遊泳速度が遅いため撮影データの飛びが起きにくいという利点がある。

2. 最終的な機器の選定

セットアップの段階で、CS5270B の NTSC 信号では LG410W による合成が不可能なことが判明した。LG410W からの外部同期は問題なく出ているものの、CS5270B に含まれるカラーバースト信号の影響のため、走査線レベルでのアナログ合成ができなくなった可能性がある。

そこで、白黒 CCD カメラで CS8420i を使い、カラーバースト信号を LG410W に入れないようなセットアップを構築した。CA130C-01 と CA130D-01 の 2 つの電源で動作させたところ、LG410W は 2 つのカメラ信号を問題なく合成し、PC に映像を実時間でキャプチャーすることができた。

生体の撮影の際の照明には、一般的な蛍光灯や業務用のメタルハライドなど、幾つかのものを検討したが、結局は白い壁からの間接照明でもっとも強いコントラストが得られることが分かった。最終的に、試験的なデータの取得として、Nematobrycon（カラシン目）の黒色の改良品種を選出した。遊泳速度は Sphaerichthys よりも速いため撮影は難しいが、視野および照野の中央付近に留まる性質のために試行回数が少なくすむという利点がある。

3. 結果と展望

(A) 生体のトラッキング

Nematobrycon の撮影画像を図 1 に示す。このままではトラッキング対象が低いビット値を持った映像になるため、解析が直感的にできない。そこで白黒を反転し（図 2）、2 次元のガウス分布で位置を決定した（図 2、等高線）。この位置検出を、撮影したすべてのビデオフレームに対して行い、3 次元の動きを再構成した（図 3）。文献 [2] 同様、直交する 2 方向からの映像によって運動が記録できることが示された。

これから本格的に、顕微鏡下で遊泳するバクテリアの運動を撮影するシステムを構築するに当

たつて、今回の予備的な検証から見つかった問題点について列挙する。

- アナログビデオ信号の合成方法について。今や NTSC 信号は主流から外れつつあり、高感度のデジタルカメラがリサーチに用いられているが、時間分解能や輝度と信号の線形性に関する信頼性などを考えると、まだまだ NTSC 信号のカメラは市場に残ると思われる。これをアナログ信号ベースで合成しようとする、今回のように合成機の側で制限がかかる可能性があるため、やはり PC の取り込み口を 2 つ設ける方が開発として正しい方向であることが分かった。この場合でも、カメラ間で同期を取って電源を駆動するのが確実である。
- スケーリングについて。通常のカメラレンズを用いた場合、見た目の焦点が合っている場合でも、奥行き方向に 30 cm ずれると一割以上のスケールの誤差が生じることが確認された。
- 2 方向から撮影したデータの合成について。当然のことながら、2 つの画像は 1 つの軸（本研究課題では Z 軸に相当）を共有しており、この数字はもちろん完全には一致しない。どちらの画像がより信頼性があるかという評価は、今のところ基準は無く、仮に顕微鏡下で高精度で撮影に成功したとしても、ついてまわる問題だと考えられる。
- 最終的には観察する生体として *Nematobrycon* を用いたが、生体の形状を加味すると、2 次元のガウス関数による近似は不適當である。本課題を今後、発展させて行う場合には、最初に検討した *Symphysodon* を用いて検証を行いたい。

(B) 振動面を有する 3 次元運動解析の自動化

課題 (A) ではランダムな運動を対象としていたが、微小器官である繊毛の運動では、先端部は特定の面内を中心に屈曲運動を行う。この運動を定量化するために、以下のような新しい解析手法を取り入れた。

- 自動で屈曲面を決定する。固定端はガラス面上にあるため、屈曲運動は球面で近似できるとはじめに考えたが、有効打と回復打が異なる高さで動くため、単純な球面では近似できない。試案として、球面近似で軌跡を近似した後で屈曲面を決定するアルゴリズムを構築したが、大部分のデータで近似が発散してしまった。そこで、まず軌跡を平面で近似し、その後に中心が平面上にあるような球面で軌跡を再近似するようにした。求めた初期値を元に改めて近似のルーティーンを回し、3 回フィッティングの作業を行ったところ、9 割のデータについて屈曲面を妥当に決定することができた。
- 特殊な座標系の設定。繊毛の先端の軌跡が、近似した球面上のどこを通るかという軸を 1 つ設定し (Beating axis, B-axis)、球面の中心から球面方向に向かった変位も設定する (r-axis)。この 2 つの軸に垂直で、球面を帯状に切った考え方で最後の軸を定義する (S-axis)。繊毛の動きは、通常の直交座標で考えると直感的に理解できないが、上記の軸の設定では、例えば有効打

と回復打のどちらが膨らんでいるかなどが直感的にグラフに表示できる。

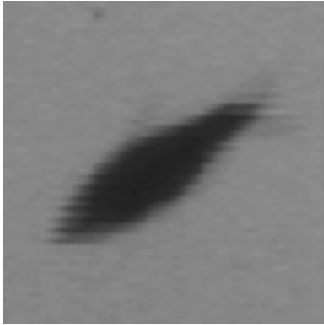


図1. 撮影された生データの画像

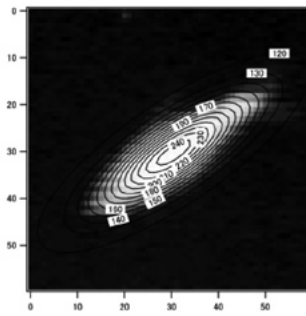


図2. 画像の反転と近似の等高線

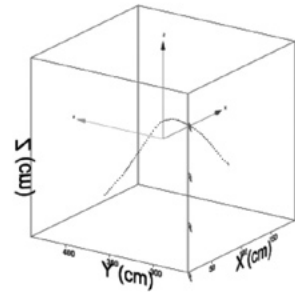


図3. 3次元の軌跡

【謝辞】

計算機センターのスタッフの方には、本研究費の執行に当たり惜しみない協力をいただきました。感謝いたします。

また本研究課題は、西坂研究室で進行している「最先端・次世代研究開発支援プログラム」とは関わりなく、実験を行う部屋も区別し、課題内容や研究設備、消耗品についても一切オーバーラップが無いよう、十分な注意を払いました。

【文献】

- [1] Yajima, J., Mizutani, K., and Nishizaka, T. (2008) A torque component present in mitotic kinesin Eg5 revealed by three-dimensional tracking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1119-1121
- [2] Marco Polin, et al. (2009) Chlamydomonas Swims with Two "Gears" in a Eukaryotic Version of Run-and-Tumble Locomotion. *Science* 325, 487-490