

光駆動マイクロロボットを用いたリアルタイム3次元計測システム

Real-time 3D Measuring System using Optically Driven Micro-Robot

○正 嶋田 直矢 (東大) 学 浅野 剛次 (名大)
正 池内 真志 (東大) 正 生田 幸士 (東大)

Naoya SHIMADA, The University of Tokyo, Naoya_Shimada@ipc.i.u-tokyo.ac.jp
Koji ASANO, Nagoya University
Masashi IKEUCHI, The University of Tokyo
Koji IKUTA, The University of Tokyo

We have been developed "Optically Driven Micro-robot" as a novel tool for manipulating a cell and for measuring cellular mechanical properties. In this work, we constructed an innovative system that can measure three dimensional reactive forces from cell and sense posture of the micro-robot with a single normal CCD attached to microscope. The system is realized by installing tapered cylindrical marker triplets to the micro-robot. Compared with conventional 3D imaging system with optical microscope, this system has advantages in that it can image and mechanically analyze in 3D from a single plane image acquired from a normal CCD camera. This simple system contributes to the micro analysis useful for cellular biology in where many demands to the micro bio physical measurement.

Key Words: Nano-manipulation, Optical tweezers, Biology

1. 緒言

細胞は外部からの物理・化学的刺激に反応して、その機械特性を変化させる。そのため、機械特性の計測は細胞の生命現象の解明には必要不可欠である。ゆえに、様々なツールにより細胞の機械特性計測が行われている。

その中でも、マイクロビーズを用いた光ピンセット法は上述の計測のために広く利用されている[1-2]。この手法は、マイクロビーズ (5nm~数 μm) をレーザー焦点で補足し、操作・計測が可能である。さらに、この手法は pN オーダの力が計測できる。これらの点から、光ピンセット法は細胞の機械特性計測に用いられている[3-5]。

具体的には、医療用のインプラント材料表面への骨細胞の吸着力の計測[3]や、投薬前後の赤血球の硬さ計測などに用いられる[4]。さらには、細胞内タンパク質の相互作用の計測[5]にまで応用可能である。

1.1 光駆動マイクロロボット

操作対象が球体のマイクロビーズである従来の光ピンセット法では、計測対象との接触面積の変更が困難である。さらに、高出力レーザーを細胞に接近させるため、細胞に対する熱ダメージも問題となる。

これらのような、従来法の問題点を解決するため、光駆動マイクロロボットが提案・開発されてきた[6-8](Fig.1)。光駆動マイクロロボットは顕微鏡下の細胞を溶液中で多自由度に操作・計測可能なツールである。このマイクロロボットは、サブミクロン分解能を有する二光子マイクロ光造形法[6,9]で作成される。この手法は、光硬化性樹脂を用いて任意の可動機構を持つ構造物を作成できる。

マイクロロボットには、トラップポイントと呼ばれる円柱形状の突起を設けてある。このトラップポイントを光ピンセット法で捕捉し、レーザーを走査することでマイクロマシンを光ピンセット法で操作する。

これまでに、このマイクロロボットを用いて、リアルタイムに細胞反力計測し、その反力を操作者に伝えることのできる力覚帰還型マスタースレーブシステムの構築などに成功している。

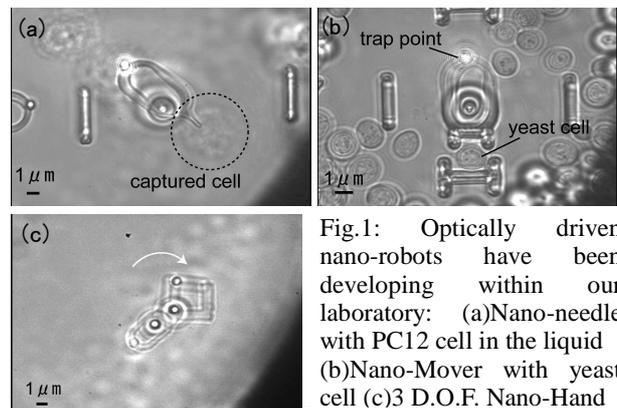


Fig.1: Optically driven nano-robots have been developing within our laboratory: (a) Nano-needle with PC12 cell in the liquid (b) Nano-Mover with yeast cell (c) 3 D.O.F. Nano-Hand

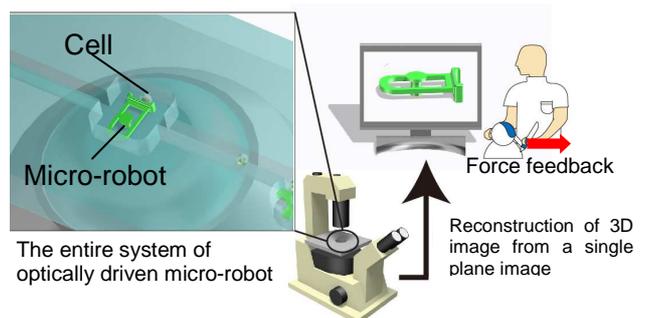


Fig. 2: A new concept of 3D cellular mechanical properties analysis system using cell handling micro-robot. Operator remotely controls and mechanically analyzes a single living cell in 3D.

1.2 3次元細胞機械特性計測の必要性

上述の機械特性計測において、計測・観察対象は3次元構造物である。しかし、従来法では顕微鏡からの平面像を用いて、観察・計測を行っていたため、画像垂直方向の位置・力の取得が困難であった。そのため、3次元観察・計測が実現可能なシステムの開発は細胞の生命現象のさらなる解明のために大きな意味をもつ。

このような観点から、顕微鏡下での3次元観察手法について

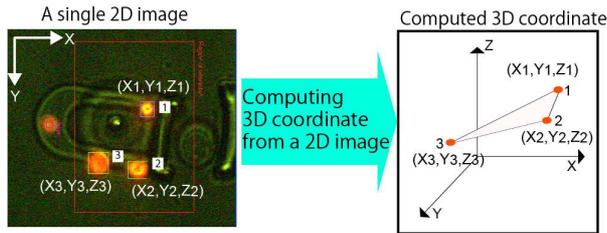


Fig. 3: Conceptual diagram of 6-D.O.F. tracking method for the micro-robot. By installing tapered cylindrical marker triplets, 6-D.O.F. position of micro-robot can be computed from 2D microscopic image.

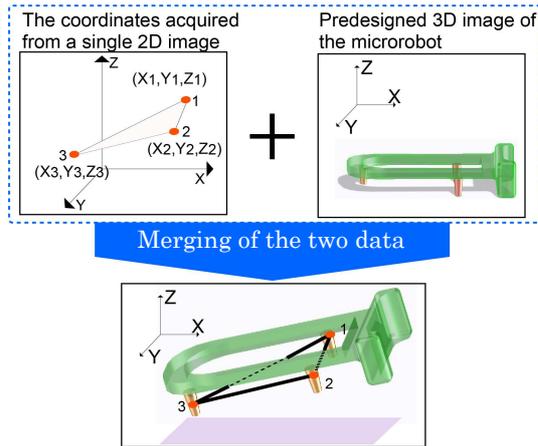


Fig. 4: The developed algorithm how to display 3D position of micro-robot in real-time. Computed 3D coordinate from a 2D image merges with pre-designed 3D data of the micro-robot.

ては、様々な研究開発が行われている[8, 10, 11]. 例えば、従来同時に行えなかった光ピンセットと3次元観察を同時に実現する方法が考案されている[8,11]. しかし、これらの手法では、共焦点顕微鏡システムなどの高価かつ複雑な光学系が必須であり、導入が難しい. さらに、これらのシステムにおいても3次元機械特性計測を観察と同時に出来なかった. そこで、本報では上述の観点から、高価な光学系を用いずに、通常の顕微鏡平面像から3次元の観察及び力計測が同時に実現可能なシステムの構築を行った (Fig.2). また、構築したシステムを用いて、細胞圧縮用光駆動マイクロロボットによるイースト細胞圧縮試験を行った.

2. マイクロロボットの3次元姿勢観察

マイクロロボットの姿勢を3次元観察する手法の提案・開発を行った.

2.1 テーパ型マーカを複数用いたマイクロマシンの3次元姿勢観察手法の提案

通常の顕微鏡平面像より、マイクロロボットの3次元姿勢・位置を取得する手法を考案した.

本手法は、任意形状を作成可能な2光子マイクロ光造形法の利点を生かし、高さ方向に直径を変化させた円柱マーカ (以下、テーパ型マーカ) をマイクロロボットに複数設置する. そして、CCDカメラから取得した顕微鏡像をフレームごとに画像処理を行い、その際のテーパ型マーカの直径から高さ方向の位置を算出する. これを、複数個のテーパ型マーカで行うことでマイクロマシン上の各点の高さが取得でき3次元

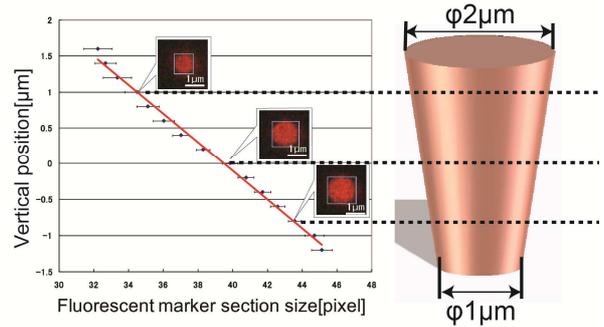


Fig. 5: Relationship between the observed fluorescent tapered cylindrical marker size and vertical position. Slope of the red line is $-0.20 \text{ } [\mu\text{m}/\text{pixel}]$

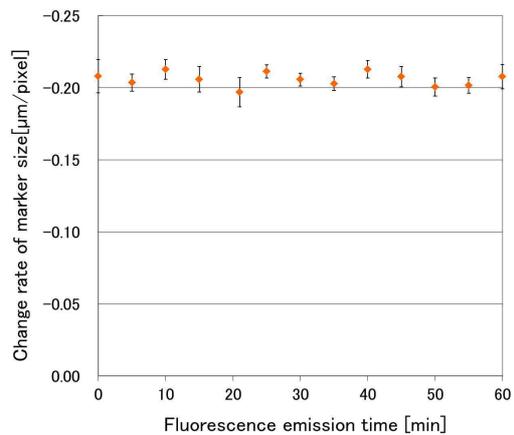


Fig. 6: Relationship between the marker size changing rate and observation time.

姿勢を把握できる.

具体的にマイクロマシンの3次元姿勢・位置を取得する手順は次の通りである.

- 1) テーパ型マーカを同一直線上にならないように、マイクロマシンの同一平面内の3か所に取り付ける (Fig. 3).
- 2) 各マーカの計測時の断面直径を画像処理により取得する.
- 3) 取得した断面直径から高さ情報を算出する.
- 3) 取得した3つの高さ情報からマイクロロボットの姿勢を算出する.
- 4) 算出した姿勢データを用いて、事前に用意したマイクロロボットの3次元形状データを座標変換させてインターフェースに表示する (Fig.4). この手法により、通常の顕微鏡平面像から3次元姿勢・位置を取得・表示できる.

2.2 テーパ型マーカの蛍光化

この位置姿勢計測をリアルタイムに行うには、高速かつ安定に上述の画像処理を行う必要がある. しかし、従来位置検出にもよく用いられるパターンマッチング法では、事前に焦点面の画像を記憶しておく必要があるため、マーカ断面の形状が変化すること前提としている本システムには不向きである. 加えて、処理速度も低速であるためビデオレート ($\sim 30\text{Hz}$) を確保できない.

そこで、テーパ型マーカを蛍光化した. 蛍光化には、独自開発の量子ドット含有光硬化性樹脂を用いた[8]. この樹脂で造形したテーパ型マーカは、長時間安定した蛍光を発する. この蛍光化により、二値化処理を行うことが可能となり、画像処理をビデオレートで行うことができる. また、画像処理

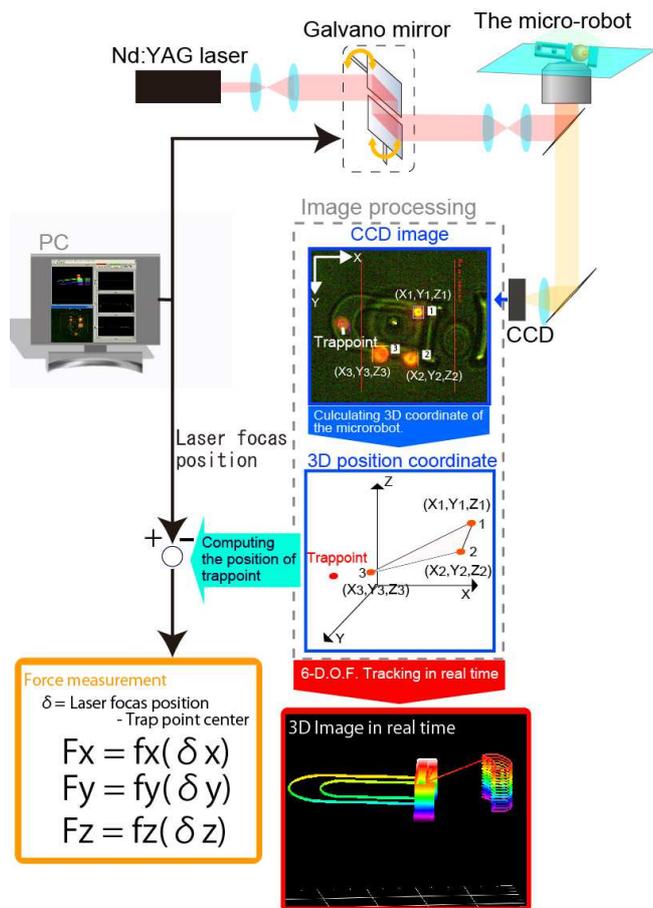


Fig. 7: Developed system for cell handling micro-robot setup. This system can concurrently perform high-speed 6-D.O.F. positioning of the micro-robot and analysis of 3D cellular mechanical properties.

範囲内の輝度値を計算するのみであるので、断面形状の変化にも柔軟に対応可能である。

テーパ型マーカは底面の直径 $1\ \mu\text{m}$ 、上面の直径 $2\ \mu\text{m}$ の高さ $3\ \mu\text{m}$ とした (Fig.5)。作成したテーパ型マーカの高さごとの直径を調べ、その変化率を求めた。計測結果を図 5 に示す。その結果、このテーパ型マーカの高さによる直径の変化率は $-0.20[\mu\text{m}/\text{pixel}]$ となった。

一般に蛍光物質は長時間の励起光照射により退色する。そのため、退色の影響でテーパ型マーカ直径の変化率が変わらないか計測した。60 分間励起光を照射し、5 分ごとに変化率を計測した。その結果、60 分以上、変化率は変化しなかった (Fig.6)。

このことから、長時間の励起光照射による蛍光退色の影響を受けず、長時間に及ぶ細胞の機械特性計測にもこの手法を適応できる。

3. マイクロロボットの 3 次元力計測システム

上述の位置計測手法を用いて、3 次元力計測システムを構築した。システムの全体像を Fig. 7 に示す。光駆動系は赤外レーザを一对のガルバノミラーで平面走査可能となっている。また、観察系には高速 CCD カメラを用いている。

3.1 力計測の原理

マイクロロボットを光ピンセット法で駆動させる際には、

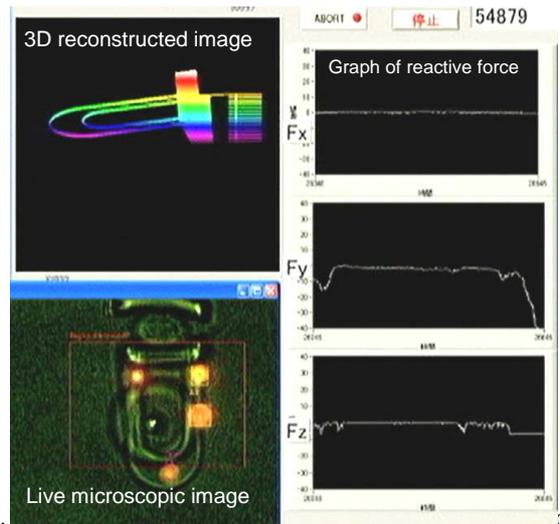


Fig. 8: Force measuring system with single plane image from CCD camera attached optical microscope with the micro-robot (Nano-mover).

トラップポイントを捕捉し、レーザを走査することで行う。静止状態では、トラップポイント中心はレーザ焦点にある。しかし、細胞からの反力に対応して、トラップポイントはレーザ焦点からずれる。光トラップ力はこのずれ δ の関数であることが基礎実験から明らかになっている。そのため、トラップポイント中心とレーザ焦点がわかれば事前に調べた関数を用いることで光トラップ力計測を実現することが可能となる。計測したトラップ力は細胞反力と釣り合いの関係にあるため、この計測はそのまま細胞の反力とできる。

3.2 3 次元力計測

前述の通り、3 次元力計測にはトラップポイントの中心位置とレーザ焦点位置を計測する必要がある。

まず、トラップポイント位置は、テーパ型マーカとの位置関係から算出可能である。具体的には、3 点のマーカと同一平面内に設置したトラップポイントの場所をシステム上に入力しておく。そうすることで、各マーカ位置から 3 次元でトラップポイントの位置を算出することが可能になる。

続いて、レーザ焦点位置は、コンピュータから入力電圧により、一对のガルバノミラーを制御することで観察面内を走査しているため、事前に入力電圧と画面内の位置を校正できる。また、レーザ焦点の高さ方向は、本報の光学系では画面垂直方向への焦点の移動はできない。そのため、観察面と同じ高さ常に常にあるものとした。

これらのようにして、取得したトラップポイント位置とレーザ焦点位置の 3 次元的な距離 δ を算出することができる。これを事前に校正した関数に代入することで力計測を実現する。ただし、本報においては、高さ方向の変位と力の実測による校正手法が確立されていないため、独自開発した光トラップ力シミュレータの値を用いている [12]。

また、このシステムでは計測した力は力覚帰還形マスターコントローラにフィードバックし操作者に伝えることが可能である。

このシステムにより、3 次元で力計測およびマイクロマシンの姿勢・位置観察が可能となる。

4. イースト細胞圧縮試験

システムの実証のために、細胞圧縮用光駆動マイクロロボ

ット“ナノムーバ”を用いて実験を行った (Fig.8).

イースト細胞は、1wt%のウシ血清アルブミンを含んだ溶液に懸濁した。ナノムーバの前方には光硬化性樹脂で作成した壁を設置し、ナノムーバとの間にイースト細胞を配置して繰り返し圧縮を行った。

ナノムーバはマスターコントローラにより自由に操作できる。Fig. 8の左下に表示される実際の顕微鏡像から、システムにより算出したナノムーバの3次元位置・姿勢が左上に表示される。また、インターフェース右側XYZ軸におけるそれぞれの反力計測の結果が表示されている。その結果から、ナノムーバでイースト細胞を一定量押し込むとZ方向に力が発生することが分かった。これは、ナノムーバが細胞に乗り上げていたことを意味している。また、その際にはナノムーバが傾いているのが表示できた。

このように、リアルタイムでマイクロロボットの3次元姿勢を表示させながら、力計測を行うことに成功した。また、計測した細胞反力のデータは、力覚帰還型マスターコントローラに提示し、操作者が細胞の反力を感じる細胞の触診にも成功した。これにより、システムの実証に成功した。

5. まとめ

本報では、従来実現不可能であった光ピンセットと同時に3次元で位置・力計測が可能なシステムを光駆動マイクロロボットを用いて実現した。

本システムは、任意形状を作成可能な2光子マイクロ光造形法の加工特性を生かし、テーパ型マーカを用いて平面画像からマイクロロボットの3次元位置・姿勢を取得することを特長としている。本手法により、従来は共焦点顕微鏡システムなど高度な光学系により行っていた3次元位置計測に加えて、従来不可能であった3次元リアルタイム力計測 (~30Hz) も通常の CCD カメラのみで実現可能となる。

本システムにより、容易に3次元で細胞の硬さ計測が実現できる。そのため、細胞生物学分野の研究を飛躍させる起爆剤となり得る。

文 献

- [1] A. Ashkin, "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure," *Physical Review Letters*, vol. 24, no. 4, pp. 156–159, 1970.
- [2] A. Ashkin, "Optical trapping and manipulation of neutral particles," vol. 94, no. May, pp. 4853–4860, 1997.
- [3] M. Andersson, A. Madgavkar, M. Stjerndahl, Y. Wu, W. Tan, R. Duran, S. Niehren, K. Mustafa, K. Arvidson, and A. Wennerberg, "Using optical tweezers for measuring the interaction forces between human bone cells and implant surfaces: System design and force calibration," *The Review of scientific instruments*, vol. 78, no. 7, p. 074302, Jul. 2007.
- [4] M. M. Brandão, a Fontes, M. L. Barjas-Castro, L. C. Barbosa, F. F. Costa, C. L. Cesar, and S. T. O. Saad, "Optical tweezers for measuring red blood cell elasticity: application to the study of drug response in sickle cell disease," *European journal of haematology*, vol. 70, no. 4, pp. 207–11, Apr. 2003.
- [5] D. Mizuno, C. Tardin, C. F. Schmidt, and F. C. Mackintosh, "Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 315, no. 5810, pp. 370–3, Jan. 2007.
- [6] S. Maruo, K. Ikuta, and H. Korogi, "Submicron manipulation tools driven by light in a liquid," *Applied Physics Letters*, vol. 82, no. 1, p. 133, 2003.
- [7] K. Ikuta, F. Sato, K. Kadoguchi, S. Itoh, "Optical Driven Master-slave Controllable Nano-manipulator with Real-time Force Sensing, 21st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2008), Tucson, USA, January 13-17, 2008
- [8] M. Ikeuchi, K. Isozaki, and K. Kyue, "Multifunctional optically driven microrobot for realtime 3D bio-manipulation and imaging," ... (MEMS), 2011 IEEE International Conference on Micro Electro

Mechanical Systems .

- [9] S. Maruo, O. Nakamura, and S. Kawata, "Three-dimensional microfabrication with two-photon-absorbed photopolymerization.," *Optics letters*, vol. 22, no. 2, pp. 132–4, Jan. 1997.
- [10] Tanaami T et al, "High-speed 1-frame/ms scanning confocal micro-scope with a microlens and Nipkow disks".*Appl.Opt.*41(22), pp4704-4708,2002
- [11] D. L. J. Vossen, A. van der Horst, M. Dogterom, and A. van Blaaderen, "Optical tweezers and confocal microscopy for simultaneous three-dimensional manipulation and imaging in concentrated colloidal dispersions," *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, no. 9, p. 2960, 2004.
- [12] 砂辺光、生田幸士、光駆動ナノマシンの最適設計用シミュレータ (Optomech solver-1)の開発、ロボティクス・メカトロニクス講演会 2009、福岡