

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06098

研究課題名(和文) 血液凝固過程の動的細胞観測のためのリアルタイム3次元定量位相顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of real-time and three-dimensional quantitative phase microscopy for dynamic observation of blood coagulation process

研究代表者

船水 英希 (FUNAMIZU, Hideki)

室蘭工業大学・工学研究科・准教授

研究者番号：90516486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、止血機構や脳卒中・心筋梗塞の原因となる血栓症において重要な血液凝固過程を、広視野かつ非破壊・非侵襲にリアルタイム3次元観測が可能な定量位相顕微鏡であるデジタルホログラフィック顕微鏡を用い、血管内で生じる血栓の3次元凝集構造と血栓形成時間により高精度な血液凝固診断システムを構築し、開業医レベルで導入可能かつ集団検診等による早期診断・発見に最適で低コストな可搬装置の設計・開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Blood coagulation is an important role in hemostasis process related with the cessation of blood loss from a damaged blood vessel. Coagulation disorders increase a risk of hemorrhage or thrombosis, which leads to severe diseases related with blood circulation. For evaluating blood coagulation process precisely, a wide-field, non-destructive, non-invasive, real-time and three-dimensional microscopy is necessary. Recently, digital holographic microscopy (DHM) has been proposed for the quantitative phase imaging. DHM has an advantage in that three-dimensional (3D) information of an object can be obtained from single hologram by numerical refocus using computer, which implies that the mechanical scanning in the depth direction does not need and 3D microscopy is realized in real time. In this study, we proposed the dynamic observation of a blood coagulation process and 3D blood coagulation structures using DHM and designed portable DHM for the observation of blood coagulation.

研究分野：光計測，計測工学，生体計測

キーワード：血液凝固 デジタルホログラフィ 顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

現在、日本人の死亡原因の約6割が生活習慣病によるものであり、高齢化社会の進行と若年層での発症により、今後さらに増加が見込まれるため大きな社会問題となっている。生活習慣病により生じる血栓症は血管内での血液凝固反応により血栓が形成されて血管が詰まる血流障害である。この症例は高コレステロール症に関連した動脈硬化や血流の遅い静脈での鬱血が主な原因であり、血栓が血管から剥がれると脳卒中や心筋梗塞のような死亡率の非常に高い症例を引き起こす。血栓形成には血液凝固特性が密接に関連しており、血栓性疾患における血栓形成メカニズムの解明、被験者の血液凝固特性の高精度な定量化および定期的な凝固検査のための低コストな装置の需要が高い。

血液凝固は止血機能において重要な役割をもち、凝固因子と呼ばれるタンパク質に関する酵素の複雑かつ段階的な反応により、最終的に粘着性の繊維状タンパク質であるフィブリンが網状構造を形成し、血液細胞に絡み付いて3次元的凝集構造である血栓を形成する生体機能である。この機能は血管内を流れる血液が立体的構造を時系列で形成する現象であるため、血液凝固のメカニズムの正確な理解と評価には、広視野で非破壊・非侵襲かつ実時間的に3次元的構造を可視化できる計測法が必要となる。

近年、新規な光学顕微鏡として、デジタルホログラフィック顕微鏡 (DHM) が提案されている¹⁾。DHMで利用されているデジタルホログラフィ技術はレーザ光を2つに分割して被検物体からの物体光と参照光との干渉縞画像 (ホログラム) を CCD カメラで取得し、コンピュータによる光伝搬シミュレートにより物体の振幅と位相を持つ完全な3次元像再生 (結像) を実現する。この顕微鏡は上記の血液凝固過程の観測に要求されるすべての条件を満足する顕微鏡である。

2. 研究の目的

本研究では、既存の顕微鏡では不可能な、広視野で非破壊・非侵襲かつリアルタイムに3次元情報を取得可能なデジタルホログラフィック顕微鏡を用いて、血液凝固反応で生じる血栓の3次元凝集構造の形成過程をリアルタイムで可視化し、時空間的に血液凝固特性を定量評価することによって、血液凝固機能の高精度・高精度な診断装置の提案およびシステム構築を目的とする。また、開業医レベルで導入可能で集団検診や在宅健康診断による早期診断・早期発見に最適で低コストな可搬装置の設計・開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 血液細胞観測のための DHM を構成する。本研究では細胞観測が前提であり、安定した計測結果が取得可能な透過型のマッシュェンダー干渉計に基づく DHM を採用する。

660 nm の半導体レーザを光源に使用し、各種光学素子と CCD カメラにより DHM を構成する。また、構築した顕微鏡の空間分解能を確認するためにテストチャートを被験対象とした実験を行う。このように構成された DHM を用いて血液細胞の可視化の実験を行う。被験物体にはウマ血液を使用し、スライドガラス上に滴下した血液にレーザ光を照射して CCD カメラによりホログラム画像を取得する。

(2) ホログラムを計算機に取り込み、数値計算によるオートフォーカスで再生された血液細胞の画像から強度および位相分布を取得するプログラムを開発する。また、血液凝固における3次元情報を取得するためにマルチフォーカス再生プログラムを開発する。

(3) 血管内部での血液凝固現象を模擬するために、血液と凝固促進剤を注射器によりフローセルに注入した流れ場を被験物体として使用する。DHM によりホログラムをリアルタイムに取得する。血液凝固構造の3次元情報を取得するために、ホログラムにマルチフォーカス法を適用して再生像の各画素における合焦距離を推定することで3次元可視化を実現する。

(4) 凝固構造の3次元的定量評価をするために、一般的な特徴抽出法である重心、表面面積、重心等のパラメータを計算して評価値を得る。これらの評価値の時系列変化から血液凝固試験における診断指標である凝固時間を決定する。また、既存の血液凝固試験における凝固時間であるプロトロンビン時間との相関を評価し、その妥当性を評価する。

(5) 本研究で構築した DHM 装置および解析プログラムに基づき、小型・簡便・低コスト化を図り、開業医レベルでも導入が容易で集団・在宅検診に可搬な装置設計を行う。

4. 研究成果

血液細胞を観測するために図1に示す DHM を構築した。半導体レーザ (660 nm, 130 mW) からの出射光はハーフミラーにより2つに分割される。反射光は対物レンズ OB_2 とスペーシャルフィルタ SF によりコリメートされ、参照光として用いる。透過光は観測する試料に照射された後、透過光が対物レンズ OB_3 によって拡大される。この光波は OB_3 を通過後にレンズ L_2 によってコリメートされて物体光として用いられる。物体光と参照光が BS によってカップリングされることで2つの光波が空間的に干渉し、CCD カメラにより光干渉縞であるホログラムが記録される。

血液細胞イメージングを行うために、馬保存血を生理食塩水で希釈してヘマトクリット値を 0.1% とした血液をホールスライドガ

ラスに滴下し、底面に沈降した赤血球を観測試料として実験を行った。DHMにより取得したホログラムに対して、試料の振幅および位相像を再生するために、デジタルホログラフィの再生計算法である角スペクトル法と、再生計算における合焦距離を変えつつ、再生像の振幅コントラストを評価関数としたオートフォーカスのプログラムを開発した。

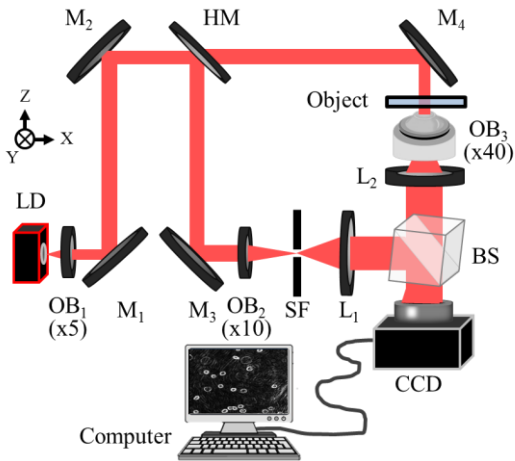


図1：構築したデジタルホログラフィック顕微鏡。LD：半導体レーザー；OB：対物レンズ；M：ミラー；HM：ハーフミラー；SF：スペシャルフィルタ；L：レンズ；BS：ビームスプリッタ。

次に、血液凝固構造の立体構造を取得するために適用する、マルチフォーカス法のプログラムの作成した。まず、血液凝固構造よりも構造が単純な試料を用いてこのプログラムの妥当性を確認した。そのような試料として、ホールスライドガラスに血液を滴下した際に生じる赤血球沈降現象中の赤血球のホ

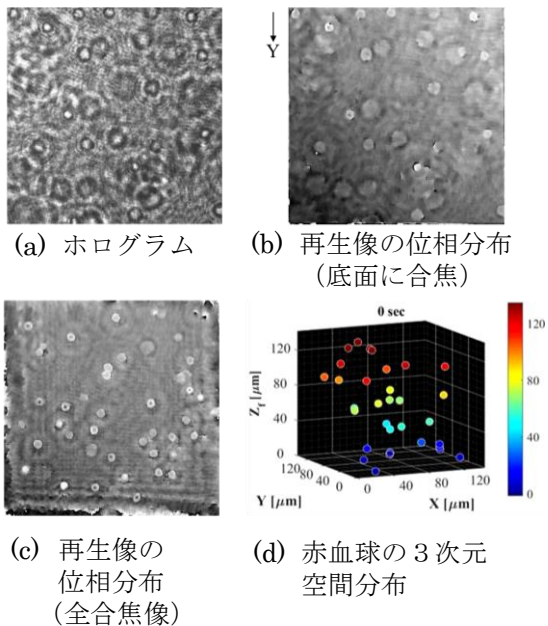


図2：DHMで得られたホログラムおよび再生像の位相分布と3次元解析の結果。

ログラムを取得し、3次元空間分布の復元を行った。図2に赤血球沈降の際のホログラム、スライドガラス底面で再生された位相像および復元した赤血球の3次元空間分布を示す。

上記の基礎実験および解析プログラムの作成の後、毛細管内における流れ場をDHMにより観測し、ホログラムをリアルタイムに取得することで、血液凝固過程およびその構造の3次元可視化プログラムの作成を行った。馬保存血と凝固促進剤の混合液をシリンジおよびチューブを用いてフローセルに注入し、流れ場のホログラムを動画で取得する。使用したフローセルと観測条件の詳細図を図3および図4に示す。

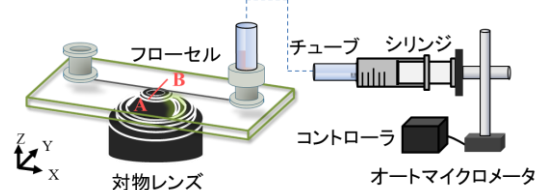


図3：流路内の流れ場の観測実験の概要。

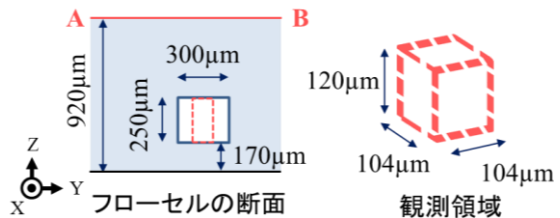


図4：フローセルの詳細と観測領域。

DHMで取得したホログラム動画の各画像に対して、角スペクトル法を適用し、フローセルの底面に合焦した再生像の位相分布を取得した結果を図5に示す。図5(a)および(b)はフローセルに混合液を注入してから26秒後および30秒後に取得されたホログラムを再生して得られた位相分布を示している。

これらの図と図2(b)の位相分布を比較すると、凝固過程の観測における再生像の位相分布のノイズが大きく、赤血球を観測するのが難しくなっていることがわかる。この原因としては、凝固試薬が白色で濁っているため、血液と混合した際に混濁して再生像の画質が悪化したためだと考えられる。しかしながら、ホログラム動画から得られた再生像の位相分布の動画を確認すると、凝固促進剤を混合していない場合と比較して、時間経過につれて複数の赤血球が固まり、フローセルの底面に貼り付いて動かなくなる様子が観測されている。また、赤血球が静止する時間と凝固促進剤に凝固時間と比較して、およそ2倍程度の時間がかかることがわかった。再生像の画質劣化および凝固時間のズレの問題は混合する凝固促進剤の量を調整する実験を行っており、引き続き課題として取り組む予定である。以上のことから、DHMによる血液凝固過程のリアルタイム観測において一定の

成果が得られた一方で、残された課題がいくつかあり、引き続き研究を進めていく予定である。

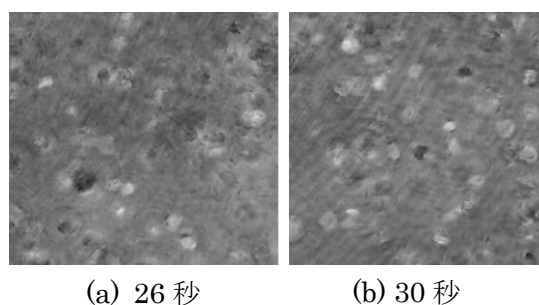


図 5：血液と凝固試薬の混合液の再生像の位相分布。

以上の方法では位相分布の画質が低く、血液凝固構造の3次元イメージングは現状では困難であると考え、別の方法による実現を試みた。凝固促進剤を混合していない血液をフローセル注入した際の流れ場を観測した際に、流れの方向に対する赤血球の回転が観測された。この現象に着目して、コンピュータ・トモグラフィ法による血液凝固構造の3次元構造の復元を行った。上記のホログラムの再生像の位相分布における画質劣化を低減するために、シリンジ内で混合液の凝固プロセスを進めてから、混合液をフローセルに注入することで、凝固構造の観測を実現した。フローセル内を流路方向に回転しながら流れる凝固構造のホログラム動画を取得し、再生された位相分布に対して、

図 6 (a)は1枚のホログラムから再生された血液凝固構造の位相分布であり、約9個の赤血球から構成されている。(b)はホログラム動画から再生された各時間の位相分布のデータの中心行から得られたサイノグラムである。回転しつつ流れる凝固構造のホログラムを動画で取得するため、各時間が回転角に対応する。サイノグラムに Filter Back Propagation 法を適用し、X-Y 平面の構造を復元する。位相分布の各行に対して同様の処理を行い、Y 軸方向にスタックすることで、3次元構造を復元した。

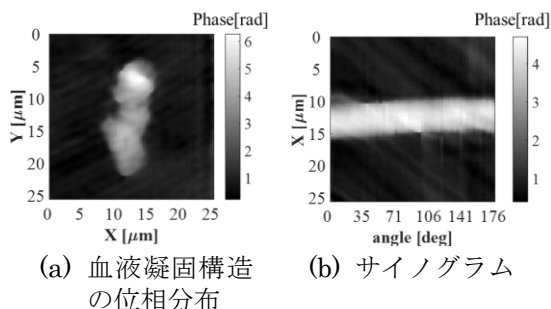


図 6：血液凝固構造の位相分布とサイノグラム。

図 7 は血液凝固構造の3次元内部的な内部屈折率分布であり、その平均屈折率は文献値における赤血球の屈折率とおおよそ一致しており、3次元構造の復元に成功していると考

えられる。また、この屈折率分布のデータを2値化して、3次元的な外形分布を表示したものを図 8 に示す。また、これらのデータを用いて復元された構造の体積、表面面積、重心、真円度を計算し、3次元的な特徴パラメータを取得した。

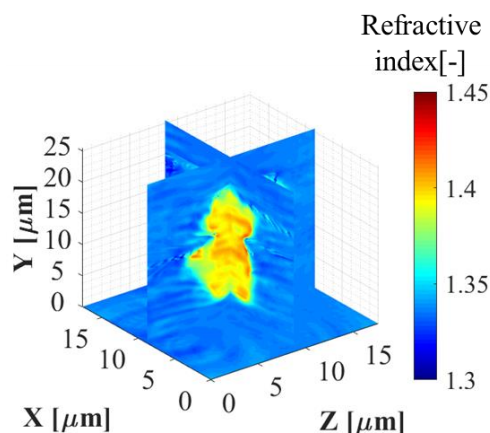


図 7：復元された血液凝固構造の3次元分布。

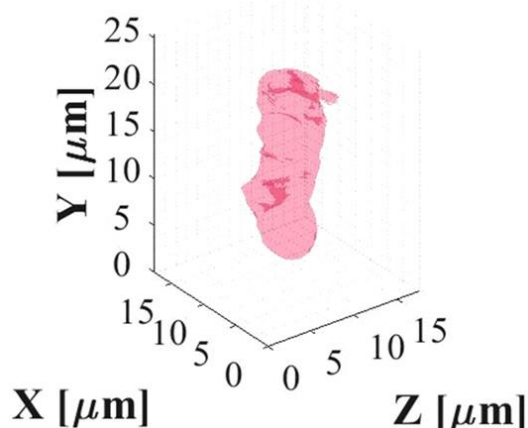


図 8：血液凝固構造の外形。

本研究での主要な成果は以上であり、血液凝固過程のリアルタイム観測においてはいくつかの課題を残すこととなったが、3次元構造の復元および3次元的な特徴パラメータの取得を実現することができた。赤血球の定量的な観測のために DHM を使用する研究は多数あるが、血液凝固現象に注目してその過程のリアルタイム観測および血液凝固構造の3次元形状を復元する研究は国内外に例を見ず新規であり、光生体計測およびバイオイメージング分野に対して大きなインパクトを与えられる。特に医療分野において脳卒中や心筋梗塞の原因となる血栓症には血液凝固機能が密接に関連しているため、そのメカニズム解明や新規の予防法、薬剤および治療法の開発等に大きく貢献する成果であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) H. Funamizu, Y. Onodera, Y. Aizu: Color quality improvement of reconstructed images in color digital holography using speckle method and spectral estimation, *Optics Communications*, Vol. 414 pp. 83–91 (2018). 査読有 DOI:10.1007/s10043-016-0180-3
- (2) N. Yokoi, T. Shinohara, H. Funamizu, M. Kyoso, Y. Shimatani, T. Yuasa, Y. Aizu: Measurements of blood flow and blood concentration change using laser speckle in fiber illumination and its application to estimation of stress condition, *Optical Review*, Vol. 27 pp. 226–236 (2017). 査読有 DOI: 10.1007/s10043-016-0287-6
- (3) H. Funamizu, Y. Tokuno, and Y. Aizu: Estimation of spectral transmittance curves from RGB images in color digital holographic microscopy using speckle illuminations, *Optical Review*, Vol. 23 pp. 535–543 (2016). 査読有 DOI: 10.1016/j.optcom.2017.12.086

[学会発表] (計 92 件)

- (1) H. Funamizu, Y. Onodera, J. Uozumi, Y. Aizu: Digital holographic microscopy using speckle illuminations and two-wavelength method, *Biomedical Imaging and Sensing Conference 2018* (2018).
- (2) H. Funamizu, R. Goto, Y. Aizu: Tomographic phase imaging of RBCs in blood coagulation structures using digital holographic microscopy, *Biomedical Imaging and Sensing Conference 2018* (2018).
- (3) 坂爪 良樹, 小野寺 裕星, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永: デジタルホログラフィにおける伝搬距離を用いたノイズ低減, 春季第 64 回応用物理学関係連合講演会 (2017).
- (4) 後藤 遼二, 船水 英希, 相津 佳永: デジタルホログラフィック顕微鏡を用いた血液凝固構造のトモグラフィック位相イメージング, *Optics & Photonics Japan 2017* (2017).
- (5) 小野寺 裕星, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永: リング開口によるスペックル

パターンを用いた二波長デジタルホログラフィック顕微鏡の高空間分解能化, *Optics & Photonics Japan 2017* (2017).

- (6) H. Funamizu, Y. Onodera, J. Uozumi, Y. Aizu: Enhancement of spatial resolution in digital holographic microscopy using speckle field generated from ring-slit apertures, *SPIE Optical metrology 2017* (2017).
- (7) H. Funamizu, T. Q. Chen, Y. Onodera, J. Uozumi, Y. Aizu: Enhancing spatial resolution of digital holographic microscopy using speckle patterns generated from ring-slit apertures, *Biomedical Imaging and Sensing Conference 2017* (2017).
- (8) H. Funamizu, K. Sonoda, R. Goto, Y. Aizu: Real-time three-dimensional counting and shape measurement of RBCs using digital holographic cytometry, *Biomedical Imaging and Sensing Conference 2017* (2017).
- (9) 後藤 遼二, 園田 光太郎, 船水 英希, 相津 佳永: デジタルホログラフィック顕微鏡を用いた血液凝固による凝集構造のトモグラフィック位相イメージング, 春季第 64 回応用物理学関係連合講演会 (2017).
- (10) 小野寺 裕星, タン チン チェン, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永: スペックルパターンを用いた二波長デジタルホログラフィック顕微鏡, 春季第 64 回応用物理学関係連合講演会 (2017).
- (11) タン チン チェン, 小野寺 裕星, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永: リング開口により生成されたスペックルパターンを用いたデジタルホログラフィック顕微鏡の高空間分解能化, *Optics & Photonics Japan 2016* (2016).
- (12) 園田 光太郎, 後藤 遼二, 船水 英希, 相津 佳永: デジタルホログラフィックサイトメトリーによる赤血球の実時間 3 次元的血球計数と形状計測, *Optics & Photonics Japan 2016* (2016).
- (13) H. Funamizu, T. Q. Chen and Y. Aizu: Color Digital Holographic Microscopy Using Speckle Illuminations for Removing Twin Image, *Biomedical Imaging and Sensing Conference 2016* (2016).

- (14) 園田 光太郎, 船水 英希, 相津 佳永 :
デジタルホログラフィック顕微鏡に
よる赤血球沈降の 3 次元観測, 春季第
63 回応用物理学関係連合講演会 (2016).
- (15) タン チンチェン, 得能 友太, 船水 英
希, 相津 佳永 : スペックル法を用いた
カラーデジタルホログラフィック顕
微鏡における分光透過率の推定, 春季
第 63 回応用物理学関係連合講演会
(2016).
- (16) 得能 友太 , タン チンチェン, 船水 英
希, 相津 佳永 : スペックル法を用いた
カラーデジタルホログラフィック顕
微鏡, Optics & Photonics Japan 2015
(2015).
- (17) 熊谷 泰志, 園田 光太郎, 船水 英希,
相津 佳永 : デジタルホログラフィッ
ク顕微鏡を用いた血液凝固過程におけ
る位相情報の空間分布解析, Optics &
Photonics Japan 2015 (2015).
- (18) H. Funamizu, Y. Tokuno, Y. Aizu and
T. Yuasa: Estimation of spectral
transmittance in color digital
holography using speckle
illuminations, Eleventh Japan—
Finland Joint Symposium on Optics in
Engineering (2015).
- (19) H. Funamizu, Y. Watanabe, T. Kumagai
and Y. Aizu: Dynamic observation of
blood coagulation process in digital
holographic microscopy, The 5th
Asian and Pacific-Rim Symposium on
Biophotonics (2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船水 英希 (FUNAMIZU Hideki)
室蘭工業大学・工学研究科・准教授
研究者番号 : 9 0 5 1 6 4 8 6