

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04159

研究課題名（和文）血液細胞の3次元観測が可能なフローサイトメトリ法による新規な血液診断装置の開発

研究課題名（英文）Development of novel blood diagnostic devices using three-dimensional flow cytometry of blood cells

研究代表者

船水 英希（Funamizu, Hideki）

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：90516486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、フローサイトメトリ法に基づく血液検査装置に、無染色で細胞形状のリアルタイム3次元計測が可能なデジタルホログラフィック顕微鏡を適用して、高速・高精度診断と各細胞形状の微視的観察を同時に実現し、従来の顕微鏡ではリアルタイム取得が困難な位相情報による血液細胞の3次元構造の復元および特徴抽出により、新規な血球識別・分類性能をもつ診断装置の提案とシステムを構築した。また、開業医レベルで導入可能で集団検診や在宅医療による早期診断・発見への貢献のために、最適で低コストかつ可搬な装置の設計・開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来の血液検査装置では不可能であった、無染色でリアルタイムかつ3次元的に血液細胞の形状を計測可能なデジタルホログラフィック顕微鏡を用いて、高速かつ高精度な診断と各細胞形状の3次元顕微観察を同時に実現した。これにより、細胞形状計測において、従来の顕微鏡では困難だった情報を取得し、新規な血球識別・分類性能をもつ診断装置の提案とシステムを構築した。また、開業医レベルで導入可能で集団検診や在宅医療による早期診断・発見への貢献のために、低コストかつ可搬な装置の設計・開発を行った。

研究成果の概要（英文）：In this study, we realized a blood test device for high-speed and high-precision diagnosis and the three-dimensional microscopic observation of blood cells by applying a digital holographic microscopy to flow cytometry.

As an analysis method of blood cells in this device, we proposed and developed a new discrimination and classification method of blood cells by reproducing the three-dimensional structures of them and then extracting morphological parameters based on phase information, which is difficult to acquire in a real-time measurement using a conventional microscopy. In addition, we designed an optimal, low-cost, and portable device that can be introduced by the medical practitioner. This device may be useful for early diagnosis and detection through mass screening and home medical care.

研究分野：光計測，計測工学，生体計測

キーワード：血液細胞 デジタルホログラフィ 顕微鏡 フローサイトメトリ

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

現在、日本は超高齢社会化と若年層での生活習慣病の発症により、さらなる患者数の増加が見込まれるため、大きな社会問題となっている。特に、ガン、心臓病、脳卒中のような死亡率の非常に高い症例では、治療開始時期で完治率が大きく変化するため、集団検診などで実施される血液検査が病気の早期診断・発見において重要な役割を果たしている。

現在、医療機関に広く普及しているフローサイトメトリ（FC）法に基づく血液検査装置は、血液細胞の高速識別・分類が可能で多項目検査を高精度に実行できる。しかし、この装置は大型かつ高価で、集団検診などに使用する可搬装置に適さない。また、血液ガンである白血病は、赤血球および白血球の形態異常に密接に関連する症例であり、顕微鏡による各血液細胞の形態診断が望ましい一方で、高速性や測定精度および人的負担の問題から、集団検診などでは採用されていない。そのため、FC法の高速かつ高精度で多項目診断が可能という長所を保持しつつ、顕微鏡観察が可能な血液診断装置の実現が望まれる。

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。DHM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ションで物体の振幅・位相情報を持つ3次元像再生（結像）を実現する。DHMの特徴を以下に示す。

- マルチオートフォーカス法を用いたコンピュータによる後処理で、像再生を実行するため、合焦機構による奥行方向の走査が不要で、リアルタイム3次元計測が可能。
- 広視野かつ非侵襲で、定量的な位相情報による非染色細胞の高精度計測が可能。
- 顕微鏡を構成する光学部品が少なく、小型・簡便・低コストで可搬装置の設計が容易。

これらの特徴から、DHMはFC法の高速・高精度検査と、顕微鏡による微視的な細胞観察を同時に実現するために、実装が容易で最適な顕微鏡と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、FC法にDHMを適用して高速・高精度検査と顕微鏡による細胞観察を同時に実現し、新規パラメータの位相情報による血液細胞の3次元形状の復元および特徴抽出を行うことで、染色処理が不要で高速かつ高精度・高精度の血液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医療による早期診断・発見への貢献のために、低コストかつ可搬な血液検査装置の設計・開発を行う。

3. 研究の方法

FC法にDHMを実装し、高速・高精度で細胞形状観察が可能な血液検査装置の開発のために、次の6つの研究をおこなう。また、本研究は研究代表者と大学院生2名により実施する。

- (1) DHMを実装したフローサイトメータの構築する。本研究では血液細胞の観察が前提であり、安定した計測データが取得可能な透過型のマッハツェンダー干渉計に基づくDHMを採用する。細胞に非侵襲な波長域の633nmの赤色He-Neレーザを光源に使用し、各種光学素子とCCDカメラにより、安定して細胞形状観察が可能なDHMを構成する。また、フローセルをDHMに導入してフローサイトメータを構築し、血液細胞の流れ場の観察を実施する。
- (2) DHMにより取得したホログラム動画の各フレームの2次元画像から、フローセル内の血液細胞の3次元空間分布を復元および可視化するために、マルチオートフォーカス再生のプログラムを開発する。この解析結果のデータから血液診断項目の1つの血球計数を実行する。
- (3) 再生像の位相情報を用いて、各血液細胞の平均位相値、最大および平均厚みなどの幾何学的形状から14種類の3次元形状に関連した特徴パラメータを計算するプログラムを開発する。
- (4) (3)で得られたDHMの3次元形状は、レーザの照射方向に投影された位相が、細胞の厚みに比例することを利用して取得しており、実際の3次元構造と異なる。これを改善するために、フローセル内を流れる血液細胞が流路方向に回転することを利用して、各角度で投影された位相分布を複数取得し、コンピュータトモグラフィ（CT）処理を適用して血液細胞の完全な3次元構造を復元する。この構造から表面積や重心などの7種類の新規特徴パラメータを取得する。復元した構造の画質が投影数に依存するため、高速撮像が可能なCCDカメラを使用する。また、CT処理の投影位相を作成する際に、各細胞を追跡する必要があるため、3次元追跡プログラムを作成する。
- (5) (3)と(4)で得られた21種類の位相による3次元形状の特徴パラメータにより、主成分分析を用いた細胞識別・分類の解析プログラムを作成する。
- (6) 本研究で構成した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

図1に示すような、血液細胞を3次元観察するためのDHMを構築した。細胞に非侵襲な波長域のHe-Neレーザ(633nm, 21mW)からの出射光はハーフミラーHMにより2つに分割される。反射光は対物レンズOB₁とスペーシャルフィルタSFおよびレンズL₁によりコリメートされ、参照光として用いられる。透過光は観察する試料に照射された後、対物レンズOB₂によって拡大され、レンズL₂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によって再結合することで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。

FCを用いた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、シリンジからフローセルに注入する。血液を注入する際に、オートマイクロメータとスピードコントローラーを用いてシリンジを一定速度で押すことで、フローセル内の血液の流速を一定に制御する。フローセル内を流れる各血液細胞によって形成されるホログラム動画をCCDカメラにより記録する。なお、本研究で観察する血液細胞は赤血球とする。

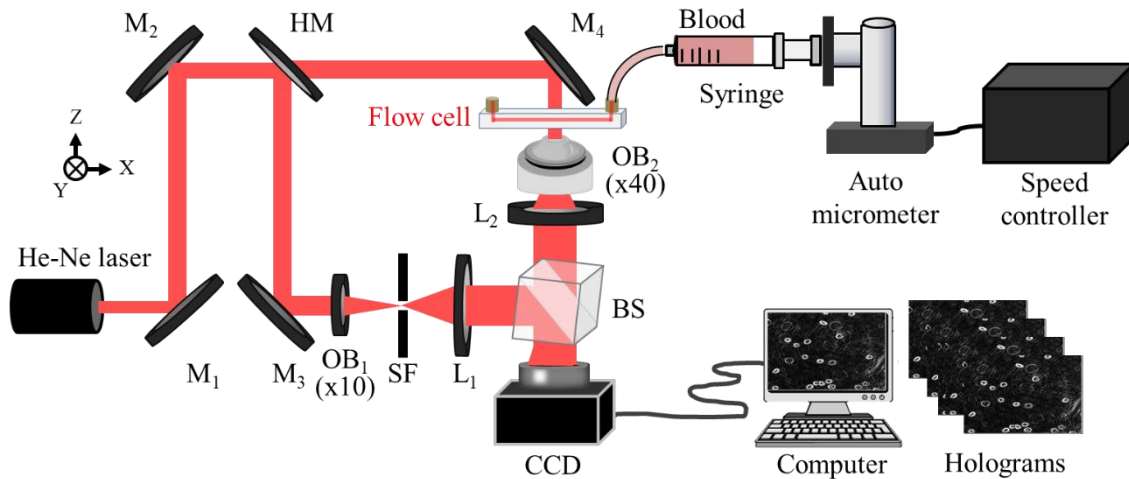


図1：DHMを実装したフローサイトメータ。M：ミラー；HM：ハーフミラー；OB：対物レンズ；SF：スペーシャルフィルタ；L：レンズ；BS：ビームスプリッタ。

次に、DHMにより取得したホログラム動画の各フレームの2次元画像から、フローセル内の血液細胞の3次元空間分布を復元および可視化するために、マルチオートフォーカス再生のプログラムを開発した。その概要を図2に示す。まず、ホログラム動画から各フレームのホログラム画像を抜き出し、角スペクトル法を適用して1つの合焦距離におけるフローセル内の流れ場の2次元複素振幅分布の画像を再生する。これに画像処理を適用し、各赤血球を検出する。この処理では、複素振幅分布の位相情報のみを抽出し、各赤血球の背景ノイズ除去、エッジ検出、2値化、膨張、穴埋め、収縮処理と順に適用した後に、円形ハフ変換を適用して各赤血球を検出し、2次元位置を取得する。

この後に、角スペクトル法の合焦距離を変更して、奥行き方向に焦点を走査しながら再生し、流れ場の3次元分布を復元しつつ、同様の画像処理を適用する。赤血球の位相分布のコントラスト値とテンプレートマッチング法により、各赤血球の奥行き方向の位置を取得することで、最終的に赤血球の3次元検出が可能なマルチオートフォーカス法を開発した。この解析結果のデータから血液診断項目の1つの血球計数を実行した結果を図3に示す。この図において、TOTALはDHMによるフローセル内の観察領域全体での計数結果であり、Upper, Middle, Bottomは観察領域を奥行き方向に対して3分割し、各領域で赤血球の個数をカウント

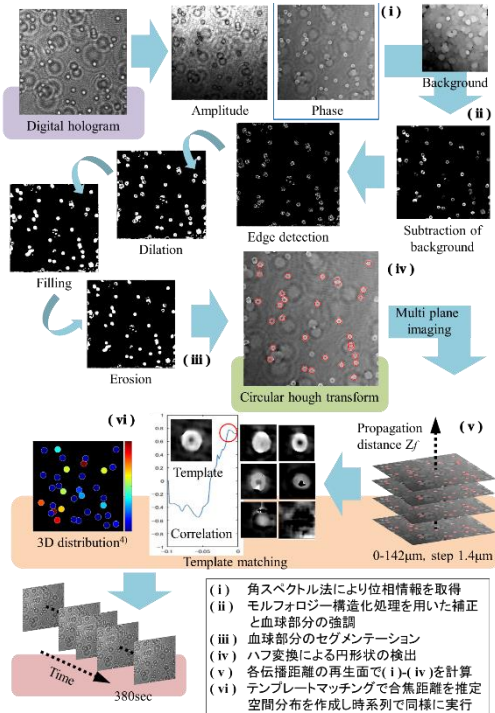


図2：マルチオートフォーカス法による赤血球の3次元検出の解析プログラムの概略図。

した結果である．時間経過とともに血球数が増加することが確認できる．

上記の方法で検出した各赤血球の平均位相値，最大および平均厚みなどの幾何学的形状から14種類の3次元形状に関連した特徴パラメータを計算するプログラムを開発した．図4は検出した赤血球の位相分布を示しており，カラーバーは赤血球の厚みを示している．また，図5は約3000個の赤血球に対して計算された，平均直径，平均最大厚み，体積のヒストグラムである．この図における赤線は文献値から計算した各パラメータの値域であり，青線は非回転血球のみの値域を示している．14種類のパラメータのヒストグラム結果から，11種のパラメータで文献値から計算した値域に収まっており，各パラメータの統計的特性は概ね妥当な結果が得られた．一方で，図5の平均最大厚みのように，文献値による値域からかなり逸脱したパラメータが3種あった．この誤差の原因は，再生像の位相ノイズであり，ノイズ低減による計測精度の向上が今後の課題となる．

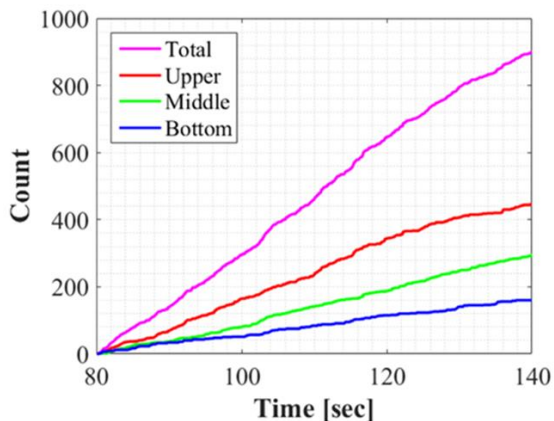


図3：血球計数の解析結果．

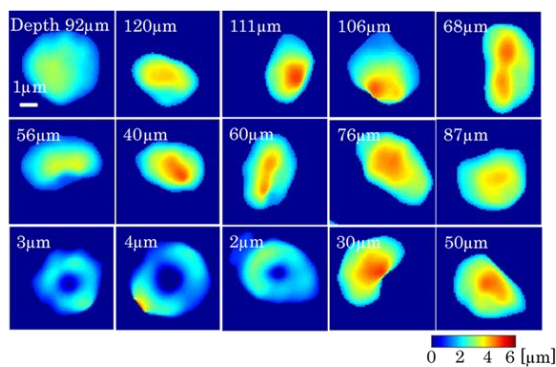


図4：赤血球の位相分布．

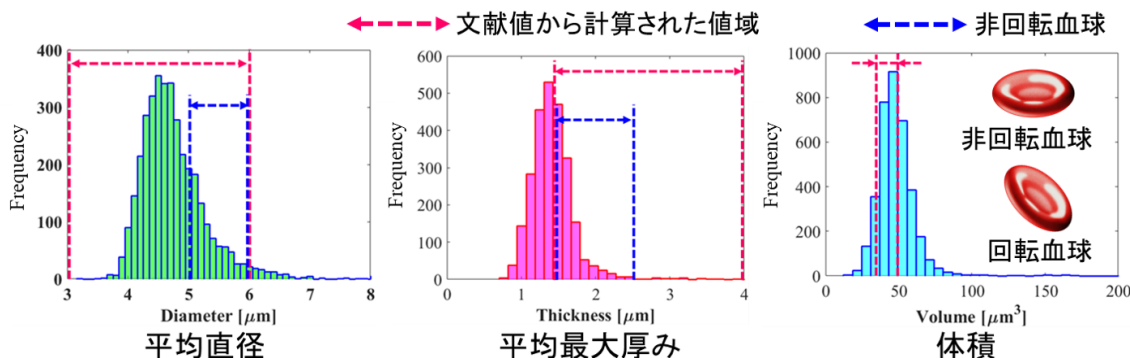


図5：赤血球の特徴パラメータのヒストグラム．

さらに詳細な赤血球の3次元情報を取得するために，フローセル内を流れる血液細胞が流路方向に回転することを利用して，各角度で投影された位相分布を複数取得し，CT処理を適用して血液細胞の完全な3次元構造を復元した．復元した構造の画質が投影数に依存するため， 2048×2048 ピクセルの高画素数で72fpsの高速撮像が可能なCCDカメラを使用し，129枚の投影画像を使用した．また，CT処理の投影位相を作成する際に，各細胞を追跡する必

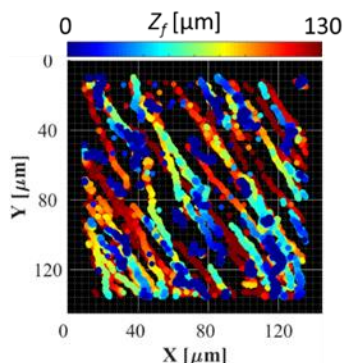


図6：3次元追跡プログラム．

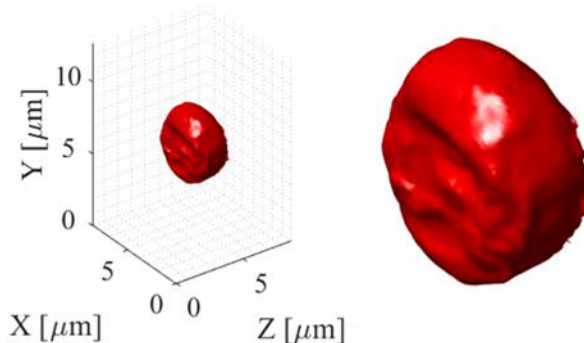


図7：CT処理による赤血球の3次元形状の復元．

要があるため、各フレームの赤血球の重心値を用いた3次元追跡プログラムを作成した。図6と図7に3次元追跡プログラムの実行結果と復元した赤血球の3次元形状を示す。図6のカラーバーは奥行方向の距離 Z_f である。この構造から表面積や重心などの7種類の新規特徴パラメータを取得した。

以上から得られた血液細胞の位相情報に基づく3次元形状の特徴パラメータを利用した、細胞識別・分類法についての研究を実施した。それぞれの形状パラメータの統計的特性を取得するために、フローセルを流れる約100個の赤血球のデータを用いた。これらの赤血球の形状に対して適用する主成分分析のプログラムを開発した。その後、形状が大きく異なる2種の赤血球を用いて細胞識別・分類を実証する予定だったが、諸事情で入手できず実施できなかった。しかしながら、当初の目標はおおよそ達成しており、今後は上記のような2種以上の赤血球の入手ルートを確保し、取得したデータに解析プログラムを適用することが目的となる。最後に、本研究で構成した装置および解析プログラムに基づき、小型・簡便・低コスト化が容易な可搬型の装置設計を行った。使用機器は2分岐ファイバ付き半導体レーザー、対物レンズ、フローセル、小型ビームスプリッタ、CCDカメラ、注射器、ノートPCである。顕微鏡部を構成する対物レンズからCCDカメラまでの寸法はおおよそ高さ30cm×幅10cm×奥行き10cm以内であり、可搬設計が可能であることがわかった。図8に設計した装置の概略図を示す。

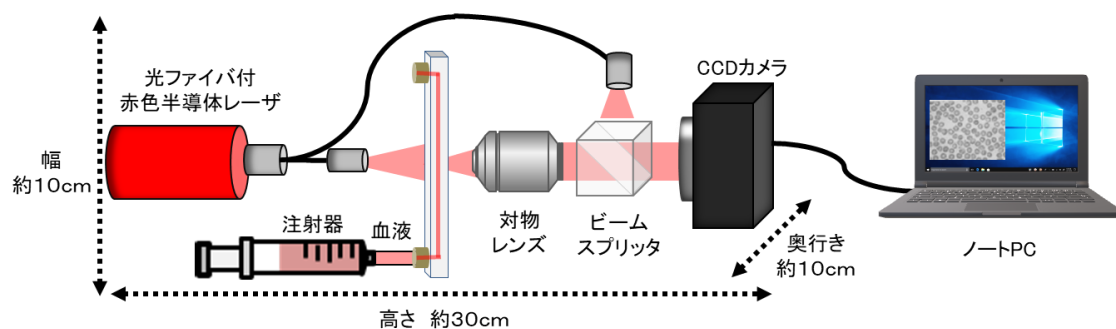


図8：DHMを実装したフローサイトメータの可搬設計の概略図。

以上から、本申請課題における研究は当初の申請書に記載したタイムスケジュールから大きく遅れることなく進行し、概ね予定通りの研究成果を得ることができた。これらの研究成果を国際ジャーナル論文4編、国際学会7件（招待講演1件）、国内学会12件で発表した。

本申請課題における研究では、DHMを実装したフローサイトメータが、小型化・低コスト化が容易なことに着目し、最終的には開業医レベルでの導入や集団検診および在宅医療の出張診断に可搬である装置開発を目的とした。この装置による検査は商用の血糖値測定器以下の血液量で可能であり、患者の身体的負担は極めて少ない。将来的には一般人も購入可能な家庭用ヘルスマonitoringシステムを構成し、IT社会での医療データベースとインターネット遠隔医療に適合する。本研究成果は血液検査に関連する様々な症例の早期発見に大きく貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 H. Funamizu, J. Uozumi, Y. Aizu	4. 巻 2
2. 論文標題 Enhancement of spatial resolution in digital holographic microscopy using the spatial correlation properties of speckle patterns	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 OSA Continuum	6. 最初と最後の頁 1822 ~ 1837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OSAC.2.001822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 H. Funamizu, K. Sugata, J. Uozumi, Y. Aizu	4. 巻 128
2. 論文標題 Two-wavelength digital holographic microscopy using speckle illuminations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Optics and Lasers in Engineering	6. 最初と最後の頁 105993 ~ 105993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.optlaseng.2019.105993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 H. Funamizu, Y. Aizu	4. 巻 24
2. 論文標題 Three-dimensional quantitative phase imaging of blood coagulation structures by optical projection tomography in flow cytometry using digital holographic microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/1.JBO.24.3.031012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 H. Funamizu, J. Uozumi	4. 巻 27
2. 論文標題 Statistics of derivatives of intensity and phase in fractal speckles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asian Journal of Physics	6. 最初と最後の頁 568 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 H. Funamizu
2. 発表標題 Tomographic imaging of blood coagulation structures in flow cytometry using digital holographic microscopy
3. 学会等名 Imaging, sensing and optical memory 2020 (ISOM'20) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 H. Funamizu, T. Tokushima, J. Uozumi, Y. Aizu
2. 発表標題 Digital holographic microscopy using speckle patterns generated from a moving diffuser
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference 2020 (BISC'2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神田 航輔, 船水 英希, 相津 佳永
2. 発表標題 デジタルホログラフィック顕微鏡を用いたフローサイトメトリー法による血液凝固構造の自動検出およびカウンティング
3. 学会等名 春季第68回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田 航輔, 船水 英希, 相津 佳永
2. 発表標題 デジタルホログラフィック・フローサイトメトリーによる位相情報に基づく赤血球凝集構造の自動検出およびカウンティング
3. 学会等名 第56回応用物理学学会北海道支部/第17回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳島 竜弥, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 二重散乱スペックル照明によるデジタルホログラフィック顕微鏡の高空間分解能化
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳島 竜弥, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 移動拡散板から生成されたスペックルを用いたデジタルホログラフィック顕微鏡
3. 学会等名 春季第67回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳島 竜弥, 菅田 滉太, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 二重散乱スペックルによるデジタルホログラフィック顕微鏡の高空間分解能化
3. 学会等名 第55回応用物理学学会北海道支部/第16回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅田 滉太, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 デジタルホログラフィにおける伝搬距離を用いた画質改善
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 俊樹, 船水 英希, 相津 佳永
2. 発表標題 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光トモグラフィ像の画質改善
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Funamizu, J. Uozumi, Y. Aizu
2. 発表標題 Noise reduction of digital holography using speckle correlation properties in longitudinal direction
3. 学会等名 SPIE Optical metrology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Funamizu, Y. Sakazume, J. Uozumi, Y. Aizu
2. 発表標題 Suppression of speckle noise in digital holography using speckle correlation properties of out-of-plane direction
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference 2019 (BISC'2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Funamizu, Y. Onodera, J. Uozumi, Y. Aizu
2. 発表標題 Digital holographic microscopy using speckle illuminations and two-wavelength method
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Funamizu, R. Goto, Y. Aizu
2. 発表標題 Tomographic phase imaging of RBCs in blood coagulation structures using digital holographic microscopy
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Funamizu, J. Uozumi, Y. Aizu
2. 発表標題 Enhancing spatial resolution of two-wavelength digital holographic microscopy using speckle patterns generated from ring-slit apertures
3. 学会等名 7th International Conference on Speckle Metrology (Speckle2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂爪 良樹, 小野寺 裕星, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 デジタルホログラフィにおける伝搬距離を用いた画質改善
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅田 滉太, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 二波長法を用いたスペckル照明デジタルホログラフィック顕微鏡
3. 学会等名 第54回応用物理学会北海道支部/第15回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 俊樹, 船水 英希, 相津 佳永
2. 発表標題 デジタルホログラフィック顕微鏡を用いた赤血球凝集構造のトモグラフィック位相イメージング
3. 学会等名 第54回応用物理学会北海道支部/第15回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅田 滉太, 坂爪 良樹, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 伝搬距離を用いたデジタルホログラフィのノイズ低減法におけるオフアクシス角の影響
3. 学会等名 春季第65回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 俊樹, 船水 英希, 相津 佳永
2. 発表標題 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における角度補正
3. 学会等名 春季第65回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------