

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04073

研究課題名（和文）フローサイトメトリ法による血液凝固構造の完全な3D情報復元と新規血液診断法の創出

研究課題名（英文）Complete 3D reconstruction of blood coagulation structures using flow cytometry and creation of a new diagnostic method for blood testing

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、広視野かつ非侵襲・非染色にリアルタイム3次元観察が可能なデジタルホログラフィック顕微鏡を実装したフローサイトメトリ法により、流路内の血液細胞が回転しながら流れることを利用してコンピュータトモグラフィ処理を適用し、血液凝固構造の3次元形状情報を完全に復元する方法を開発した。また、復元した凝固構造の3次元形状パラメータの統計データを用いた細胞識別・分類法を開発し、新規な血液診断基準の創出や血液凝固構造の形成メカニズム解明への新知見取得のための基礎的な成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、オートフォーカス法を適用したフローセル内の流れ場の3次元空間および血球分布の可視化に加えて、流路内での血液細胞の回転を利用したコンピュータトモグラフィ処理により、デジタルホログラフィック顕微鏡の立体情報の再生能力を十分に活用して血液凝固構造の3次元形状を完全に復元する方法を開発した。また、フローサイトメトリ法の実装により3次元形状パラメータの統計データから、多変量解析による細胞識別・分類法の提案・確立し、新規な血液診断基準の創出への基礎的な成果を得た。このような研究は国内外に例を見ず、学術的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a method to completely reconstruct the 3D shape information of blood coagulation structures using flow cytometry with digital holographic microscopy, which realizes wide-field, non-invasive, non-staining, real-time 3D observation, and computer tomography processing using rotating blood coagulation structures flowing through a channel. We also developed a cell identification and classification method using statistical data on geometrical parameters of 3D shape of blood coagulation structures and obtained basic results for the creation of new blood diagnostic criteria and the acquisition of new knowledge for clarifying the formation mechanism of blood coagulation structures.

研究分野：光工学，光計測，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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因の6割以上は生活習慣病が根源となる重大疾患(がん, 心臓病, 脳卒中)であり, 超高齢化社会化と若年層の発症による患者数の急速な増加により, 大きな社会問題となっている。生活習慣病による高コレステロールが原因となる動脈硬化で生じる血栓症は, 血管内の血液凝固反応で形成された血栓が血管から剥がれて詰まる血流障害であり, 脳卒中や心筋梗塞などの死亡率の高い症例を引き起こす。血栓性疾患は血液凝固特性が密接に関連しており, 血栓形成メカニズムの解明, 各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。

申請者は, 新規な光学顕微鏡として近年提案されたデジタルホログラフィック顕微鏡(DHM)が血液凝固特性の計測に最適であると着目し, 流路内での血液凝固構造の形成過程をリアルタイム3次元(3D)計測する研究を行ってきた。DHMはデジタルホログラフィ技術に基づいており, レーザ光を2分割して被検物体からの物体光と参照光の干渉縞画像(ホログラム)をCCDカメラで取得し, PCによる光伝搬解析で物体の振幅と位相を持つ完全な3D像を再生する。DHMの特徴は以下のとおりである。

- マルチオートフォーカス法を用いた計算機による後処理で3D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3D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。

DHMでの3D細胞観察における奥行情報は, レーザの照射方向に投影された位相分布が, 細胞の厚みに比例する関係から取得しており, 実際の3D形状と異なる。この形状誤差は, 単一の赤血球では主要な形状情報が投影位相に反映されており, 3D細胞観察および診断精度への影響は小さい。一方で, 多数の赤血球で複雑に構成された血液凝固構造は, 投影位相から実際の3D形状の推定は不可能であり, 血液診断の致命的な誤差となるため利用された前例はない。

2. 研究の目的

本研究では, 流路内を流れる血液細胞が流路方向に回転することに着目し, DHMを用いて各角度の投影位相分布を取得後にコンピュータトモグラフィ(CT)処理を適用した, トモグラフィック・フローサイトメトリ(TFC)法により, 血液凝固構造の3D形状情報を完全に復元する方法を提案・実現する。また, フローセル内で血液凝固過程をリアルタイム3D観察し, 凝固構造の表面形状・サイズなどの3D形状パラメータの統計データを用いた細胞識別・分類による, 新規な血液診断基準の創出および血液凝固構造の形成メカニズム解明への新しい知見の取得を目的とする。

3. 研究の方法

血液凝固構造の3D形状情報を完全に復元するTFC法の確立および新規な血液診断基準の創出のために, 次の5つの研究を行う。また, 本研究は申請者と大学院生2名により実施した。

- (1) 光学素子とCMOSカメラおよび, 細胞に非侵襲な波長域の赤色レーザを光源に使用し, 安定した細胞形状観察が可能なDHMを構築した。また, この光学系のサンプル配置部にフローセルを組み込むことによってTFCを構築し, 血液細胞の流れ場の観察を実施する。
- (2) DHMで取得したホログラム動画の各2次元画像から, フローセル内の血液細胞の3D空間分布および3D細胞形状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。
- (3) 赤血球および血液凝固構造が流路方向に回転しながら流れることを利用して, 各角度での投影位相を取得した後にCT処理を適用するTFC法を実行し, 完全な3D形状情報を復元する。
- (4) 赤血球および血液凝固構造の表面形状, サイズなどの全18種の3D形状パラメータを計算し, それらに多変量解析を適用した細胞識別・分類の解析プログラムを作成し, 結果の比較・検討を行う。
- (5) 本研究で構築した装置および開発した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

(1) DHM光学系の設計および構築

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)からの出射光をハーフミラーHMにより2つに分割する。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により平行化され, 参照光として用いられる。透過光は顕微鏡観察するサンプルに照射された後, 対物レンズOB₂によって拡大され, レンズL₂によって平行化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, CMOSカメラによ

り光干渉縞であるホログラムが記録される。

TFCを用いた血液細胞イメージングを行うために、馬保存血液を生理食塩水および血漿で希釈してヘマトクリット値を0.01%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CMOSカメラにより記録する。本研究で観察する血液細胞は赤血球とそれらが複数凝集した血液凝固構造とする。

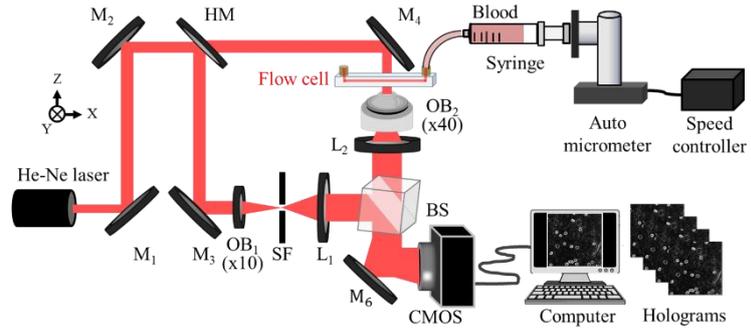


図1：DHMの実験系。M：ミラー；HM：ハーフミラー；OB：対物レンズ；SF：スペーシャルフィルタ；L：レンズ；BS：ビームスプリッター。

(2) 各ホログラムから流路内の血液細胞の3D分布および全焦点画像を再生するプログラムの開発

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3D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。その再生法の概要を図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、DHMにおける再生法の1つである角スペクトル法を適用してフローセルの底面付近を合焦距離として流れ場の2次元複素振幅分布の画像を再生する。この複素振幅分布の位相情報のみを抽出し、背景ノイズの除去、2値化処理およびノイズ除去処理などの画像処理を適用しつつ、各血液細胞の2次元的位置を検出する。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3D分布を復元しつつ、上記と同様の画像処理を適用する。2次元平面上において各血液細胞が検出された位置周辺の位相分布のコントラスト値を合焦距離の評価関数として用い、各血液細胞の奥行き方向の位置を取得することで、血液細胞の3D検出が実現された。図3に上記の方法で検出された単一の赤血球および血液凝固構造の3D位相分布をいくつか示す。

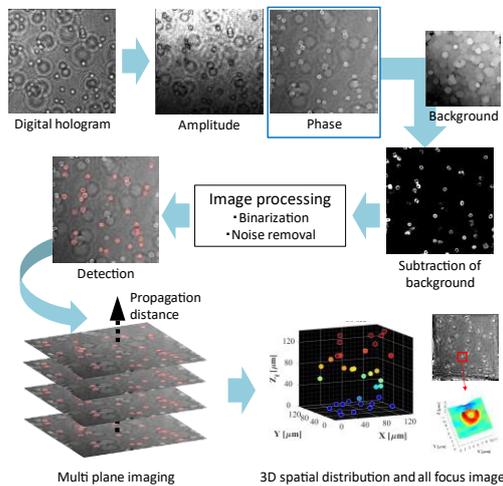


図2：マルチオートフォーカス法による血液細胞の3D位置検出および全焦点画像の生成法。

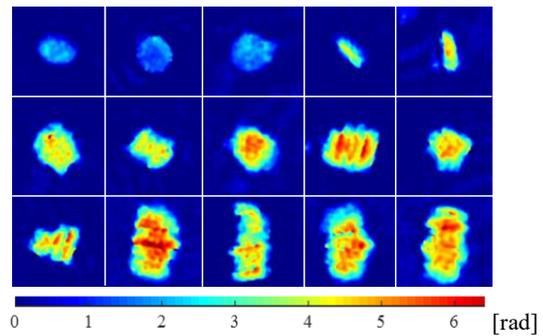


図3：検出された赤血球（上段）と血液凝固構造の位相分布。

(3) CT処理による血液細胞の完全な3D形状情報を復元するプログラムの開発

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3D構造を復元する。このCT処理の概要を図4に示す。まず、位相接続処理を適用後、各フレームにおける同一の血液細胞の位相分布データにおける各行のサイノグラムを作成する。このデータにCT処理における再生法の1つであるフィルターバックプロジェクション法(FBP)を適用して、血液細胞の2次元位相画像を取得する。各行のサイノグラムから作成された2次元位相画像のデータを積層して、完全な3D形状情報を復元する。図5にCT処理を適用して復元された単一の赤血球および血液凝固構造の完全な3D形状情報を示す。

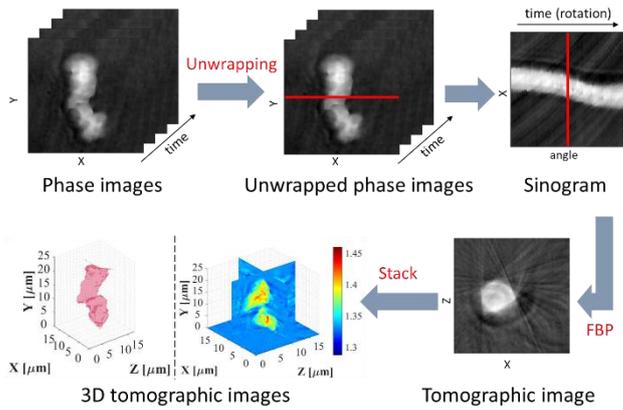


図4：血液細胞のトモグラフィックイメージング法の概略図。

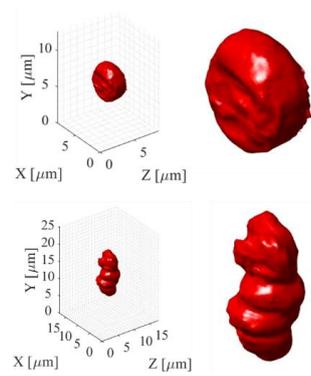


図5：赤血球（上図）および血液凝固構造（下図）の3D形状。

(4) 血液細胞の3D形状パラメータの統計データの取得および多変量解析による細胞識別・分類の解析プログラムの開発

上記の方法で取得した血液細胞の3D形状を自動的に取得するプログラムを作成し、各細胞に対して平均位相値、最大および平均厚みなどの幾何学的形状から18種類の3D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。その概略図を図6に示す。この際に流路の底面付近の血液細胞を検出したが、単一の赤血球と血液凝固構造では細胞の厚みが異なるので、赤血球に焦点を合わせて再生すると血液凝固構造は焦点から外れてボケた状態で再生される。そのため、上記で作成済みのマルチオートフォーカス法により、2つの焦点距離で再生した後に画像処理の解析を実施し、各形態パラメータの統計データとしてヒストグラムを取得した。図7に356個の単一の赤血球および141個の血液凝固構造から得られた、5つの形態パラメータのヒストグラムを示す。

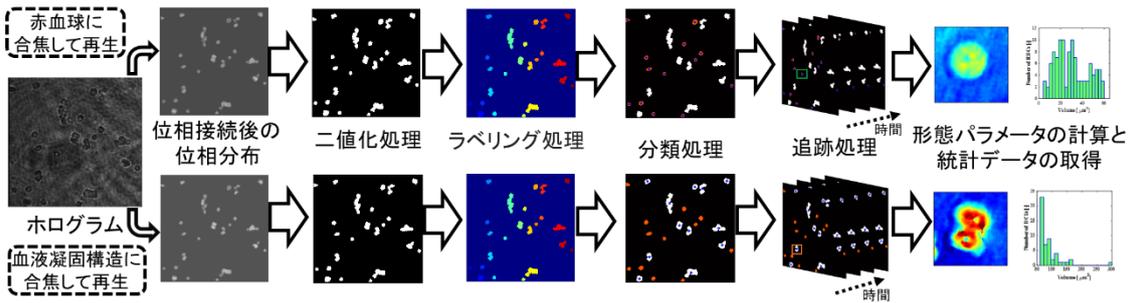


図6：血液細胞の識別・分類と各形態パラメータの統計データの取得の概略図。

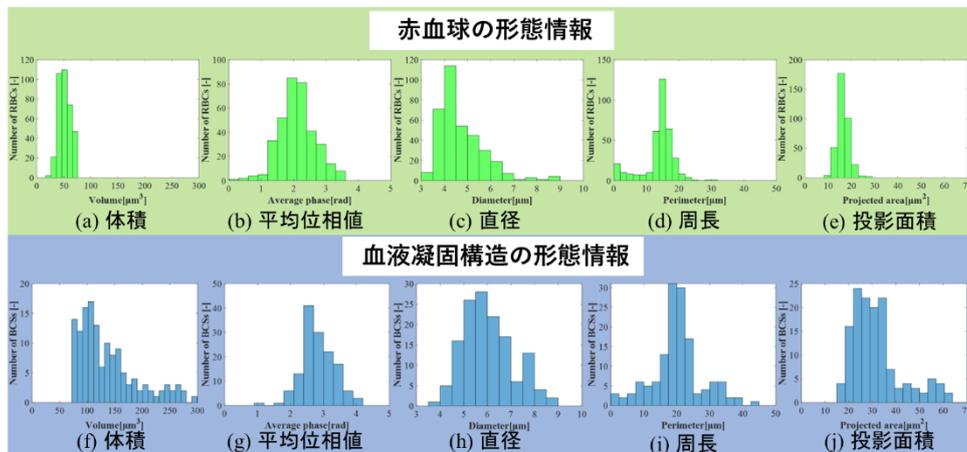


図7：各形態パラメータのヒストグラム。

次に、このデータに多変量解析を適用した。最も単純な分類と考えられる、単一の赤血球と血液凝固構造を分類する多変量解析を実行した。各パラメータ間を相関係数により定量化しつつ、学習データに用いるパラメータ数および組み合わせに対して主成分分析と判別分析を適用し、全パターンの正答率を確認した。その結果、形態パラメータの1つである体積値のみにより約8

8%の正答率が得られ、他のパラメータを追加しても1~3%増減する程度となることがわかった。これは、血液凝固構造が2個以上の赤血球を含む構造であるため、体積によるしきい値処理で比較的容易に分類可能であるということと、他のパラメータを追加しても逆にノイズを付与する効果となるという直感的な予測および理解と一致している。

(5) TFC装置の可搬設計

本研究で構成した装置および解析プログラムに基づき、可搬型のTFC装置の作成の可能性を検討した。使用機器は2分岐ファイバ付き赤色半導体レーザ、対物レンズ、フローセル、小型ビームスプリッタ、CMOS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CMOSカメラまでの寸法および市販の半導体レーザのサイズから、通常サイズのアタッシュケース1つに収納が可能であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 N. Yokoi, T. Yuasa, I. Niskanen, K. Hibino, H. Funamizu, Y. Aizu	4. 巻 31
2. 論文標題 Monitoring of the formation of biofilm inside a glass tube using light scattering patterns	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Optical Review	6. 最初と最後の頁 225-235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10043-024-00864-w	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 船水 英希	4. 巻 56
2. 論文標題 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赤血球の形態イメージング	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 56～59
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 無
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 松本 大樹, 船水 英希	4. 巻 43
2. 論文標題 振動モード計測のための時間平均パルスストロボデジタルホログラフィ干渉法	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 可視化情報学会論文集	6. 最初と最後の頁 1～8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3154/tvsj.43.1	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22件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 N. Yokoi, T. Yuasa, I. Niskanen, J. Raty, K. Hibino, H. Funamizu, Y. Aizu
2. 発表標題 Estimation of the growth of biofilm using light scattering patterns
3. 学会等名 The 14th Japan-Finland Joint Symposium on Optics in Engineering（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 S. Taneda, H. Funamizu, J. Uozumi
2. 発表標題 Improvement of Hologram Recording in Digital Holographic Microscopy Using Speckle Illuminations
3. 学会等名 International Symposium on Imaging, Sensing, and Optical Memory 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 H. Funamizu and S. Taneda
2. 発表標題 Improvement of spatial resolution enhancement in digital holographic microscopy using speckle illuminations
3. 学会等名 The 10th Biomedical Imaging and Sensing Conference 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 H. Funamizu
2. 発表標題 Auto-detection of red blood cells and blood coagulation structures in flow cytometry using digital holographic microscopy
3. 学会等名 The 10th Biomedical Imaging and Sensing Conference 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 種田 壮志, 船水 英希, 魚住 純
2. 発表標題 スペckル照明を用いたデジタルホログラフィック顕微鏡の空間分解能強調フィルタ
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野 隆哉, 船水 英希, 魚住 純
2. 発表標題 二値化スペックル照明を用いたデジタルホログラフィック顕微鏡の空間分解能特性
3. 学会等名 第59回応用物理学会北海道支部/第20回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 細川 竜宏, 船水 英希
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における赤血球の形態パラメータの拡張および時間変動特性の計算機シミュレーション
3. 学会等名 第59回応用物理学会北海道支部/第20回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 星野 隆哉, 種田 壮志, 船水 英希, 魚住 純
2. 発表標題 スペックル照明を用いたデジタルホログラフィの空間分解能強調フィルタ
3. 学会等名 春季第71回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 細川 竜宏, 船水 英希
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赤血球の形態パラメータの時系列データ
3. 学会等名 春季第71回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 種田 壮志, 三木 碧, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 スペックル照明を用いたレンズレス・デジタルホログラフィック顕微鏡による細胞イメージング
3. 学会等名 春季第70回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 種田 壮志, 三木 碧, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 スペックル照明を用いたデジタルホログラフィック顕微鏡の再生像の位相補正
3. 学会等名 第58回応用物理学学会北海道支部/第19回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田 匠, 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赤血球の形態パラメータの統計データ解析
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桐本 昌弥, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 二値化スペックルパターン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 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木 碧, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 スペckル照明を用いたデジタルホログラフィック顕微鏡のホログラム取得法の改善
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 船水 英希
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赤血球の形態パラメータの取得
3. 学会等名 ホログラフィック・ディスプレイ研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田 匠, 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赤血球の形態パラメータの時間変動特性
3. 学会等名 春季第69回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桐本 昌弥, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 スペckルリデューサから生成されたスペckルパターン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69回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木 碧, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 スペックル照明によるレンズレス・デジタルホログラフィック顕微鏡の空間分解能の向上
3. 学会等名 春季第69回応用物理学関係連合講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桐本 昌弥, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 電気活性ポリマー式拡散板から生成されたスペックルパターン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57回応用物理学学会北海道支部/第18回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三木 碧, 船水 英希, 魚住 純, 相津 佳永
2. 発表標題 スペックル照明を用いたレンズレス・デジタルホログラフィック顕微鏡の空間分解能の改善
3. 学会等名 第57回応用物理学学会北海道支部/第18回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田 匠, 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による赤血球観察における形態パラメータの時間変動特性
3. 学会等名 第57回応用物理学学会北海道支部/第18回日本光学会北海道地区合同学術講演会
4. 発表年 2022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血液凝固構造の自動検出
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2021
4. 発表年 2021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
---------	---------