

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23656186

研究課題名（和文）

実時間赤血球硬さ計測に挑戦

研究課題名（英文）

Challenge of real time stiffness measurement of red blood cells

研究代表者

金子 真 (KANEKO MAKOTO)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70224607

研究成果の概要（和文）：

幅 $4\ \mu\text{m}$ のマイクロ流路に直径 $6\sim 8\ \mu\text{m}$ の赤血球を通過させるとき、その通過時間 T は細胞の大きさ D と細胞の硬さ K の関数になることが知られている。本研究では、マイクロ流路出入り口に小さなウィンドウを設け、通過時間 T と大きさ D を高速ビジョンにより実時間で計測する方法を構築し、ヒトの赤血球を用いて、最速 400 個/秒で計測できることを実験的に検証した。

研究成果の概要（英文）：

It has been known that when a red blood cell with the size of 6 through 8 micro meter passes through a micro channel whose width is 4 micro meter, the passing time T is a function of the stiffness K and the size D of red blood cell. This project constructed the system where both T and D can be measured in real time, and confirmed that it can measure them with speed of 400 cells/sec in maximum for red blood cells picked from human body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：Bio Engineering, Measurement

科研費の分科・細目：機械工学（分科）、知能機械学・機械システム（細目）

キーワード：赤血球、硬さ評価、マイクロ流路、高速ビジョン

1. 研究開始当初の背景

(1)循環器系疾患に関連して、これまで血管の硬さについては多くの知見が報告され、また血管弛緩剤も開発されているものの、高速性と高信頼性を維持した赤血球の硬さ評価法は構築されていない。

(2)マイクロ加工技術の革新により、 $4\ \mu\text{m}$ レベルのマイクロ流路の製作が容易に行えるようになった。

(3)実用レベルで使える高速ビジョンが開発され、顕微鏡に取り付けて容易に利用できるようになった。

2. 研究の目的

赤血球のマイクロ流路通過特性に着目し、10,000 枚/秒の実時間処理対応型の超高速ビジョンを使って、世界初の高速ビジョン対応型実時間赤血球硬さ評価システムを構築し、ひいては“赤血球の硬さに基づく医療診断”という新しい医療診断領域を構築することを目的としている。

3. 研究の方法

(1)図 1 のような計測システムを使って実験を行う。計測システムは、大きくマイクロ流路を内蔵した PDMS マイクロチップ、マイクロ流路内の赤血球の動きを拡大する顕微鏡、さらにマイクロチップ内の赤血球を計測

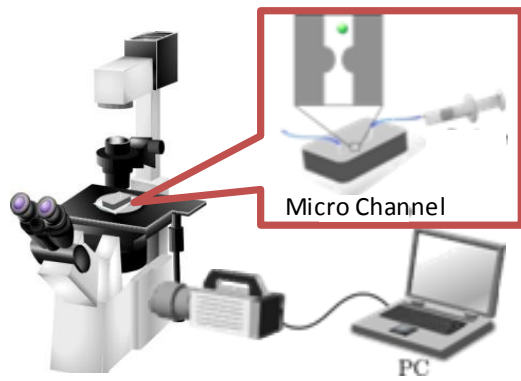


図 1 実験装置

する高速ビジョンによって構成されている。

(2)高速化と高信頼性: マイクロ流路入口と出口だけにウィンドウを配置した **Two-Gate** 方式を導入した。図 2 にその概要を示す。入口ゲートの輝度値の変化から、細胞の接近を捉えることができる。輝度値が増加して最高点に到達後、輝度値は減少に転じる。その後、最初の極値を与える時刻を赤血球進入時刻 T_1 と定義する。この赤血球はやがて入口ゲートを通過し、マイクロ流路内を移動して出口ゲートに近づく。出口ゲートでも入口ゲートと同じ輝度値の変化が現れ、赤血球進入時刻 T_2 を定義することができる。ここでは赤血球の通過時間 T を $T = T_2 - T_1$ で定義する。これにより、見かけの通過時間を測ることができるが、この通過時間 T が入口ゲートを通過した際に定義された T_1 に対応する赤血球の通過時間である保証はない。例えば、 T_1 が測定された赤血球の前に別の赤血球が出口ゲート手前にいてその赤血球が出口ゲートに到着した時刻 T_2 を使って通過時間を算出している可能性があるからである。このような複数の赤血球がマイクロ流路内に存在する可能性が起こる。この問題は次の流路内複数赤血球対処で解決した。

(3) 複数赤血球対処: **Cell-State-Checker** の導入。流路内に複数の赤血球が存在すると、見かけ上赤血球の通過時間が短く評価されるため、複数の赤血球が流入していると見なされるデータはすべて捨て、単一の赤血球の流入流出が確認できたデータのみ格納する方法の導入。マイクロ流路内に二個以上の赤血球が流入すると流体抵抗が大きくなり通過時間は一気に長くなる。ところが、**Two-gate-monitor** は赤血球数の区別ができないため、入口ゲートで T_1 が検出された後、 T_2 を検出するため出口ゲートを調べにいつてしまう。これがマイクロ流路内に二個以上の赤血球が流入した場合のファントムデータとなる。本研究では、複数の赤血球が流入

していると見なされるデータはすべて捨て、単一の赤血球が流入して流出したことが確認できた場合のみデータとして残すために **Cell-state-checker** を導入した。図 2 は T_2 が計測された時点でマイクロ流路の中心線上の全画素に対して、輝度値を中心軸(x軸)に対してプロットしたものである。ここで図 2 は二個の赤血球が流路内に入っている場合の輝度値の変化パターンを示したものである。単一赤血球の場合には、出口ゲートに存在している赤血球による輝度値の変化以外は観察されないが、二個の赤血球が入っている場合には、一個目と入口ゲートの間に二個目の赤血球による輝度値の変化が観察される。このように 1 画素ラインの輝度値変化を調べるだけで、複数の赤血球が入っているかどうかたちどころにチェックすることができる。もし、複数の赤血球が入っていると判定された場合には、そのときに得られたすべてのデータはメモリに記録しないで捨てる。その後、この 1 画素ライン上の輝度値が

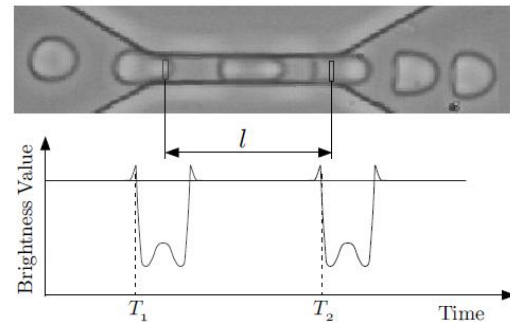


図 2 Two-gate monitor method

一様になったことを確認して、入口ゲートの T_1 計測から始める。また図 2 の 1 画素ライン上の輝度値の空間軸変化パターンから赤血球の長さ L も同時に計測することができる。

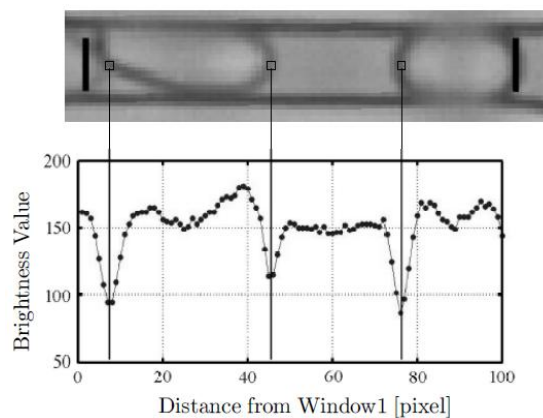


図 3 Cell-State-Checker

4. 研究成果

(1)高速計測の確立：図2に Two-Gate 方式により、赤血球がマイクロ流路内を通過する様子の一例を示す。ここで出入り口にある細長い四角形がウィンドウで、この内部の輝度値の変化から、赤血球の有無を判定している。このようにウィンドウを小さくすることによって最大 400 個/秒で赤血球のマイクロ流路通過時間を計測することに成功した。図3は Cell-State-Checker によって、マイクロ流路内に同時に二個侵入した赤血球が検出された一例を示したものである。

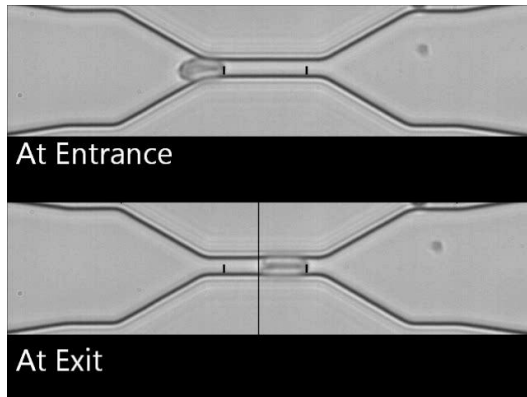


図4 データログの一例

(2)データログによる信頼性向上：入口ウィンドウと出口ウィンドウ内の輝度値が閾値を超えた際の映像をそれぞれ1フレームずつ抜き取り、データログとして残すことにより、計測後に正しく判定できているかを目視によりチェックする方法を導入した。図4にデータログの一例を示す。この方法は、計測が正しく行われているかどうかだけを判別するものであり、短時間で行うことができるだけでなく、結果に対する信頼性の向上に役立つ。

(3)図5は正常赤血球(図5(a))と球状赤血球(図5(b))のマイクロ流路内の動きを連続写真で示したものである。図5より、球状赤血球は正常な赤血球より小さいにも関わらず通過時間は大きくなっている様子がわかる。このことは球状赤血球の方が単位体積あたりに換算して硬いことを裏付けるものである。

(4)実時間診断応用：図6は実時間で赤血球の硬さを評価した一例である。横軸と縦軸はそれぞれ赤血球の長さDと通過時間Tを示す。この結果より、赤血球の優れた変形能力により、赤血球の大きさが多少変化しても、通過時間Tはほぼ一定になっていることがわかる。臨床応用を目指す場合、採血を行ってから医師が診断を下すまでに要する時間を10分程

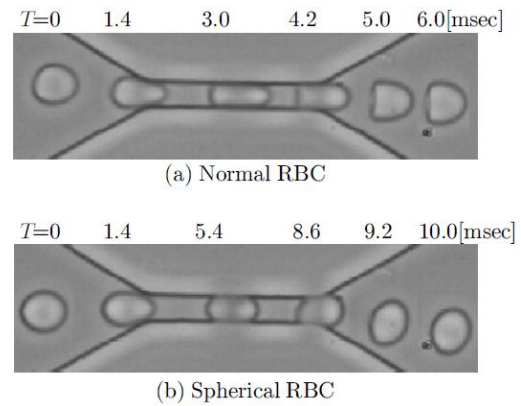


図5 マイクロ流路内の連続写真

度と見積もり、その間に統計的な数値結果を出す必要がある。したがって、1分間に100個以上の赤血球硬さが評価できるようになれば、臨床応用に十分利用できるものと考えている。

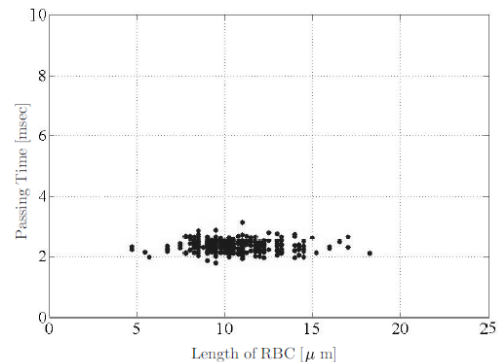


図6 実時間計測結果の一例

今後は、実用化を目指し、循環器系患者と健康者の赤血球の硬さにどのような違いがあるのかという点に焦点をしばって研究を進めていく予定である。

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1件)

①廣瀬優紀, 福井航, 東森充, 多田隈建二郎, 金子真, 新井健生, 坂田泰史, 山本一博, 川原知洋, 山西陽子, 新井史人, 高速ビジョンを用いた実時間赤血球硬さ評価, 計測自動制御学会論文集, 査読有, Vol.47, No.5, 2011, pp.221-229

〔学会発表〕(計5件)

①廣瀬優紀, オンライン/オフラインハイブリッドによる赤血球の高速硬さ評価, SI2011,

2011年12月24日，京都

②廣瀬優紀，High Speed Cell Stiffness Evaluation toward 100% Reliability，SENSORS2011，2011年10月30日，アイランド

③廣瀬優紀，100%信頼性を目指した赤血球の高速硬さ評価，生体医工学シンポジウム，2011年9月17日，長野

④Makoto Kaneko，Real Time Vision Based Cell Stiffness Evaluation toward 100% Guarantee，AIM2011，2011年7月5日，ハンガリー

⑤廣瀬優紀，高速ビジョンを用いた赤血球硬さの評価実験，ROBOMECH2011，2011年5月27日，岡山

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 真 (KANEKO MAKOTO)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70224607

(2) 研究分担者

東森 充 (HIGASHIMORI MITSURU)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30346522

山口 康隆 (YAMAGUCHI YASUTAKA)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：30346192