

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25289027

研究課題名(和文) デジタルホログラフィック計測と共焦点マイクロPIVを用いた血球挙動の3次元計測

研究課題名(英文) Three-dimensional measurement of blood cell behavior using digital holographic microscopy and confocal micro-PIV

研究代表者

大石 正道 (Oishi, Masamichi)

東京大学・生産技術研究所・技術専門職員

研究者番号：70396901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：細動脈内の血液流動に大きな影響を及ぼしている、赤血球の変形や膜の回転運動、軸集中挙動を解明するために、新たに“デジタルホログラフィック顕微鏡(DHM)”を開発し、血球と周囲流動の3次元計測を試みた。

まず、高倍率DHMを用いて血球の3次元形状を計測し、さらに周囲流体に混入したトレーサ粒子の3次元位置を追跡して流れ場の速度分布を計測するDHM-PTVを構築した。空間解像度および位置検出精度としてサブミクロンを達成している。

また、血球計測の再現性を向上させるために、流れによって血球の位置制御が可能な流路を設計した。DHMを用いてその性能を検証した結果、約5μmの範囲内に制御可能とした。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the specific behavior of red blood cells (RBCs) such as deformation, rotational motion of the membrane and axial migration which have a large influence on the blood flow in the capillaries, we developed the "digital holographic microscope (DHM)" and tried to measure the three-dimensional motion of RBCs and its surrounding flow.

Firstly, three-dimensional shape of RBC was measured using high magnification DHM. Then, the DHM-PTV (Particle Tracking Velocimeter) system which can measure the three-dimensional flow field was developed by detecting and tracking tracer particles dispersed in the surrounding flow. This system achieved submicron spatial resolution and particle position detection accuracy.

In addition, in order to improve the reproducibility of RBC measurement, we designed microchannels that can control the position of RBCs passively by flow. As a result of verifying the performance of these channels using DHM, RBCs were controlled within the range of about 5μm.

研究分野：工学

キーワード：赤血球 デジタルホログラフィ 3次元計測 マイクロPIV 粒子追跡法

1. 研究開始当初の背景

動脈と毛細血管をつなぐ直径100~10 μ mほどの細動脈は血圧の調整に大きな役割を果たしており、高血圧や脳梗塞などの病変と密接に関係があると言われている。それは、血液中に高い体積割合で混在する赤血球とサイズスケールが近くなり、特殊な流動挙動を示すためである。例えば、赤血球が血管の中心軸に向かって移動をする軸集中挙動は、血液の流動抵抗を低減する効果がある。

直径約8 μ mの両凹円盤形状で膜構造を持つ赤血球は、周囲流との相互作用によって変形、タンプリング(剛体回転)、タンクトレッド(膜の回転)などの挙動を示し、これらが軸集中への力を生じさせている。つまり、赤血球と周囲流体の相互作用を調べる事で、高血圧などの病変のメカニズムを解明できる可能性がある。

従来は位相差や微分干渉など通常の顕微鏡による定性的で血球のみの観察が主であった研究において、研究代表者はマイクロ流路内を流れる血球の挙動と周囲流体との相互作用を同時計測することのできる“多波長共焦点マイクロPIV(Particle Image Velocimetry: 粒子画像流速測定法)システム”を開発し[Oishi et al, Meas. Sci. Tech., 2011]、さらに、高倍率で高速移動する血球を追跡計測できる“並進ステージシステム”の開発を行った。その結果、周囲流体がタンクトレッド運動をしている赤血球を回り込むように流れている様子を定量的に計測でき、周囲流体のせん断速度分布によって血球の変形量とタンクトレッド運動の回転速度に関連性があることを明らかにした[Oishi et al, Meas. Sci. Tech., 2012]。

研究代表者の先行研究は赤血球のタンクトレッド運動と周囲流体の速度場を定量的に同時計測した初めての例であったが、共焦点システムの長所でもあり短所でもある、流路を薄くスライスする2次元計測の特長があるために、3次元の流れや血球の形状が分からない。また、血球の流れる位置を制御できていないため、計測断面以外の部分に隠れている血球の影響を排除できていない、固体差のある生体細胞に対して統計的なデータを取るための、実験の再現性が低いという課題が残った。

2. 研究の目的

本研究では3次元である赤血球の形状変化や軸集中挙動を計測するため、新たな3次元マイクロ計測手法である、“デジタルホログラフィック計測”の開発を行う。本手法を従来の2次元共焦点マイクロPIV計測結果と比較することにより、血球の流動メカニズムの解明を目指す。

本研究の目的は大きく分けて3つある。それらは デジタルホログラフィック計測の開発、血流のマイクロ流動の解明、新たな血液診断デバイスへの開発応用、である。

3. 研究の方法

具体的な研究項目としては、(1)DHM-PTVシステムの構築と精度評価、(2)粒子位置制御流路の設計、(3)血球と周囲流動の3次元計測、の順に進めていく。

まず(1)について、血球およびトレーサ粒子の3次元位置取得のため、3次元計測に特化したデジタルホログラフィック顕微鏡(DHM)システムを新たに構築し、さらに倍率や計測対象によって異なるアルゴリズムを開発することにより、粒子位置検出精度の検証を行う。粒子位置を精度良く検出できる光学系およびアルゴリズムを確立した後、粒子を流して時系列で追跡するPTV(Particle Tracking Velocimeter: 粒子追跡法)を用いて、新たな流れ場の3次元速度分布計測手法“DHM-PTV”を確立する。

(2)については、血球挙動計測において精度の高い統計データを取得するために、実験の再現性を向上させる粒子位置制御流路を設計し、DHM-PTVによりその性能を評価する。

最後に(3)として、血球の微視的挙動(変形やタンクトレッド運動)と巨視的挙動(軸集中)、血球周囲流体の流動挙動を3次元で取得し、血球のマイクロ流動メカニズムの解明を目指す。

4. 研究成果

(1) DHM-PTVシステムの構築と精度評価

図1にDHM装置の概要を示す。光学系とデジタルカメラ、レーザにより構成されるDHM-PTVシステムを構築した。ホログラフィ方式としては位相シフトが必要なインライン式ではなく、参照光を傾けるオフアクシス式を採用し、さらに撮像素子にハイスピードカメラを用いることで高速流れの時系列計測を可能としている。

球形粒子の3次元位置検出にはホログラフィから3次元再構築した複数枚の位相画像を解析することで行われる。球形粒子の場合は光の位相がすべて同様に歪められるため、そのパターンを検出することで位置を特定できる。実験ではまず粒径の揃った標準粒子を用いて計測精度を検証した。

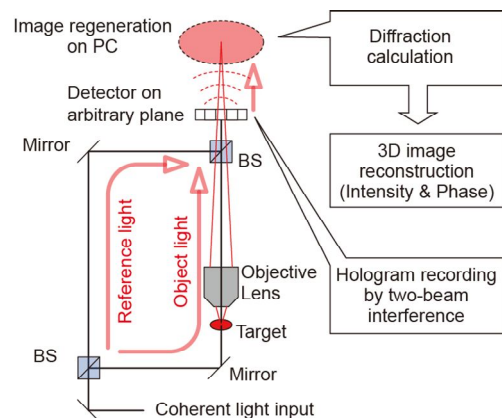


図1 DHM装置の概要

20 倍の対物レンズを用いて一辺がおよそ 280 μm の立方体を測定体積とし、トレーサ粒子として 2 μm の球形粒子を使用した場合、粒子位置の検出精度は図 2 に示すように類似度関数 ZSAD 法を用いることで xyz すべての方向に 0.3 μm 以下に抑えることに成功した。これは、xy 分解能と同等以下であり、PTV を行う上で十分であると考えられる。次に、矩形流路に定常流を流し、PTV を行った結果、図 3 に示すように流れ方向速度成分はポアズイユ流の理論解と良く一致した。

また、血球の膜運動や周囲流動を PTV 計測する場合には、より高倍率にてより小さなトレーサ粒子を用いる必要がある。本研究では、100 倍の対物レンズ、0.5 μm のトレーサ粒子を用いて、光学系および画像解析アルゴリズムの改善により、血球挙動の解明に十分な計測精度で DHM-PTV が可能であることが示された。

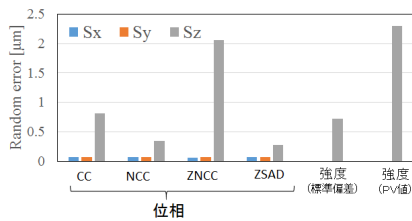


図 2 静止粒子の 3 次元位置検出における偶然誤差の平均値

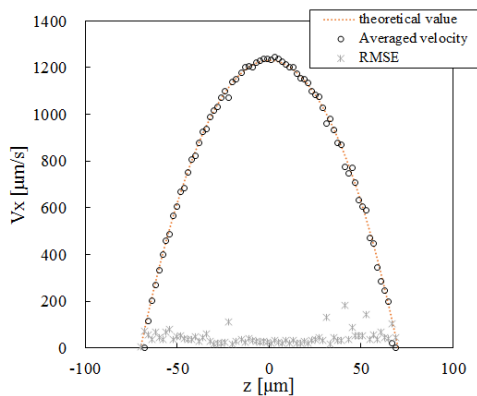


図 3 矩形流路内ポアズイユ流の DHM-PTV 計測結果 (流路中央 XZ 断面平均速度分布)

(2) 粒子位置制御流路の設計

曲がりやジャンクションなどの流路形状により生成される Dean flow (2 次流れ) や Sheath flow (平行流れ) を用いて、パッシブに血球などの位置制御を行う流路を 2 種類デザインし、DHM-PTV およびマイクロ PIV により評価を行った。

一つ目のデザインは、図 4 に示すように Sheath flow を生成するジャンクションを立体的に組み合わせた。メイン流路の断面寸法は幅 100 μm × 深さ 50 μm である。これに血球に近いサイズの 10 μm 粒子および、血球を流入させた時の出口部における粒子位置分布

は、図 5 に示すようにおよそ 5~6 μm と、粒子半径程度に制御できている。本デザインの重要な特長は、入口の流量比パラメータによって粒子位置のバラつきを制御できることであり、無用に流速を上げずに済む点がある。

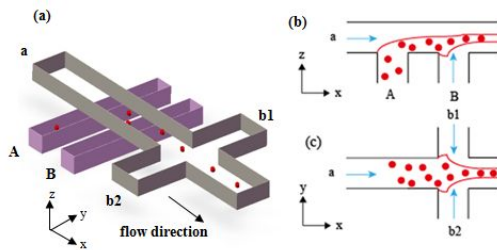


図 4 血球位置制御のための 3 次元 Sheath flow 流路

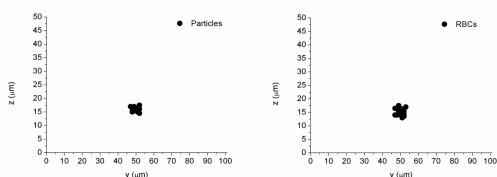


図 5 3 次元 Sheath flow 流路を用いた粒子位置制御の DHM 計測結果 (左: 10 μm 球形粒子、右: 赤血球)

二つ目のデザインは、矩形断面の直線流路に狭窄ステップを配置することで Dean flow を励起し、複数の狭窄ステップを粒子が通過することにより、粒子の位置を 3 次元的に制御するものである (図 6) [Lee et al, Lab. Chip, 2009]。この流路の特長は流路形状が 2 次元であるため製作が容易で、かつ流入ポートの数が少ないため、流れの制御を非常にシンプルにすることができる。

こちらの流路においても、計測により血球サイズ粒子の位置制御を確認し、また数値シミュレーションによって狭窄ステップのサイズや流入条件を最適化する指針を得ることができた。ただし、Sheath flow タイプと比べて流速レンジが速いことから、さらに流路を長くし、ステップ数を増やすなどの検討を行っている。

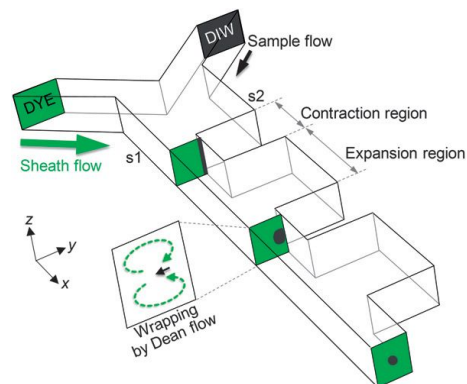


図 6 Dean flow による粒子位置制御流路

(3) 血球と周囲流動の3次元計測

血球の膜挙動や血球近傍の流れ場の情報を得るには、100倍の対物レンズを用いた高倍率計測が必要である。まず、赤血球を本研究で構築したDHMで撮影、再生した例を図7に示す。赤血球の径8 μm および厚さ2 μm の形状が本装置で取得できることが示された。なお、空間分解能はxy平面内が0.056 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 、深さ方向も数十nmであり、血球の細かな形状を捉えるには十分である。

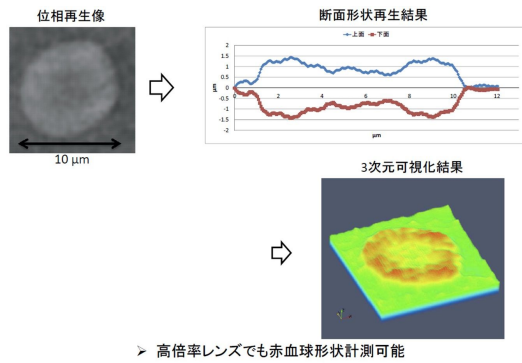


図7 DHMによる赤血球形状計測

血球形状と周囲流動を同時計測するには、血球とトレーサ粒子がDHMの光軸方向に重なった時に、それぞれによって歪められた位相が重複してしまうため、その影響を検証する必要がある。そこで、似たような状況として微小液滴内の3次元流動構造をDHM-PTVを用いて計測した。

微小液滴は、マイクロ生化学システムにおいて液体を定量的にハンドリングしたり、内部の流動渦を用いて混合を促進させるなど、最も頻繁に使われるアプリケーションである。そのため、研究代表者は過去に共焦点マイクロPIVを用いて計測を試みてきたが、肝心な情報である液滴界面形状および流れ場の直接3次元計測は不可能であった。その点DHMは2次元ホログラムに記録された3次元情報を用いて、PTVによる流れ場の計測だけでなく、界面の3次元形状も計測することができる。血球も液滴も、界面近傍の挙動が流動現象に与える影響が大きく、またガス交換などを定量的に検証する上でも、界面の形状や面積が精度良く計測できることが望ましい。

図8に示すT字型マイクロチャネルにおいて、油中に水相の液滴が生成される現象をDHM計測した例を図9に示す。液滴界面による位相の歪みとトレーサによる位相の歪みを空間周波数フィルタにより分離することで、3次元界面形状と液滴内部流れを同時計測することに成功した。

この周波数フィルタリングアルゴリズムをベースとして、高倍率DHMにて血球とトレーサ粒子の位相像分離を試みた。しかし現状では、血球、トレーサ粒子ともに位相の変化量が液滴実験より少なく、また、トレーサ粒

子のサイズが光学的回折限界に近いことから、ぼやけた像になってしまっており、分離が困難であった。今後は、トレーサ粒子としてより強くシャープな位相もしくは強度像が得られるように、ハード、ソフトの両面から改善を図っていく予定である。

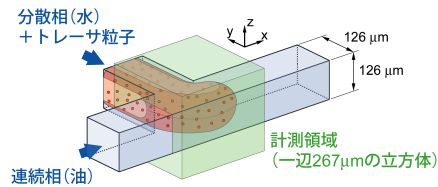


図8 T字型マイクロチャネルにおける液滴生成現象のDHM計測セットアップ

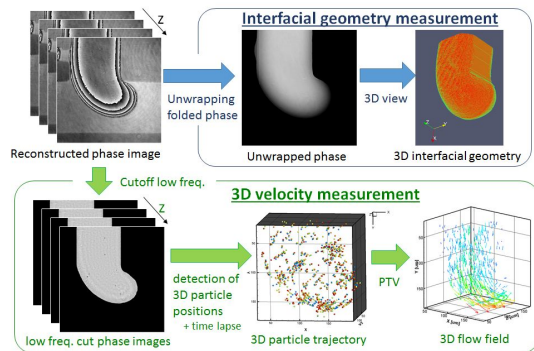


図9 DHMによる液滴の3次元界面形状と内部流動の同時計測

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2件)

Xiao-Bin Li, Masamichi Oishi, Tsukasa Matsuo, Marie Oshima, Feng-Chen Li, Measurement of viscoelastic fluid flow in the curved microchannel using digital holographic microscope and polarized camera, ASME Journal of Fluids Engineering, 査読有, Vol.138 (2016), pp.091401-1-8.

Xiao-Bin Li, Masamichi Oishi, Marie Oshima, Feng-Chen Li, Song-Jing Li, Measuring Elasticity-induced Unstable Flow Structures in a Curved Microchannel Using Confocal Micro Particle Image Velocimetry, Experimental Thermal and Fluid Science, 査読有, Vol.75 (2016), pp.118-128.

[学会発表](計10件)

松尾司, 木下晴之, 安木政史, 大石正道, 大島まり, 藤井輝夫, 本篤志, デジタルホログラフィ技術による時系列マイクロ3D3CPTV, 次世代マイクロ化学チップコンソーシアム 第25回研究会, 東京

(2013.7.24)
Chao LI, Masamichi OISHI, Haruyuki KINOSHITA, Teruo FUJII, Marie OSHIMA, Lateral Migration and Deformation of Single Red Blood Cell, 第41回 可視化情報シンポジウム, 工学院大学, 東京 (2013.7.16-17)
Masamichi Oishi, Haruyuki Kinoshita, Teruo Fujii, Marie Oshima, Measurement of Three Dimensional Flow Structure during Microdroplet Formation using Phase-locked Multicolor Confocal Micro-PIV, The 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Freiburg Germany (2013.10.27-31).
大石 正道, 木下 晴之, 藤井 輝夫, 大島 まり, 共焦点マイクロ PIV 計測によるマイクロ液滴生成機構の力学的考察, 日本流体力学会年会 2015, 東京工業大学, 東京 (2015.9.26-28)
Masamichi Oishi, Haruyuki Kinoshita, Teruo Fujii and Marie Oshima, Investigation of micro droplet formation mechanism using confocal micro-PIV measurement, 11th International Symposium on Particle Image Velocimetry, Santa Barbara, USA (2015.9.14-16).
Xiao-Bin Li, Masamichi Oishi, Marie Oshima, Feng-Chen Li, Song-Jing Li, On the 3D structure of elasticity-induced unstable flow in the curved microchannel by using confocal micro-PIV and polarized camera, ASME 2015 International Conference on Nanochannels, Microchannels, and Minichannels (ICNMM2015), San Francisco, USA (2015.7.6-9).
Xiao-Bin Li, Masamichi Oishi, Tsukasa Matsuo, Feng-Chen Li, Marie Oshima, Measurement of 3D flow structure of viscoelastic fluid using digital holographic microscope, ASME-JSME-KSME Joint Fluids Engineering Conference, Seoul, South Korea (2015.7.26-31).
森田佳士之, 大石正道, 松尾司, 大島 まり, 藤井輝夫, Digital Holographic Microscopy による位相情報を用いた粒子位置の三次元計測, 可視化情報全国講演会 (京都 2015), 京都工芸繊維大学, 京都市 (2015.10.10-11)
Masamichi Oishi, Tsukasa Matsuo, Haruyuki Kinoshita, Teruo Fujii and Marie Oshima, Three-dimensional measurement of micro- multiphase flow using digital holographic microscopy,

18th International Symposium on the Application of Laser and Imaging Techniques to Fluid Mechanics, Lisbon, Portugal (2016.7.4-7)
Yoshiyuki Morita, Masamichi Oishi, Tsukasa Matsuo, Marie Oshima, Phase Image-based Particle Tracking Velocimetry Using Digital Holographic Microscopy, Imaging and Applied Optics Congress 2016, Heidelberg, Germany (2016.7.25-28)

〔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〕

ホームページ等

<http://www.oshimalab.iis.u-tokyo.ac.jp/japanese/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 正道 (OISHI, Masamichi)
東京大学・生産技術研究所・技術専門職員
研究者番号: 70396901

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大島 まり (OSHIMA, Marie)
東京大学・大学院情報学環・教授
研究者番号: 40242127

藤井 輝夫 (FUJII Teruo)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号: 30251474

木下 晴之 (KINOSHITA Haruyuki)
東京大学・生産技術研究所・特任助教
研究者番号: 40466850

(4) 研究協力者

なし