

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

Auto-detection and counting of blood coagulation structures in flow cytometry using digital holographic microscopy

室工大院 [○](M1) 神田 航輔, 船水 英希, 相津 佳永

Muroran Inst. of Tech., [○]Kosuke Kanda, Hideki Funamizu, Yoshihisa Aizu

E-mail: funamizu@mmm.muroran-it.ac.jp

デジタルホログラフィック顕微鏡(DHM)は、無染色で動的に細胞観察が可能な定量位相顕微鏡として注目されている¹⁾。近年、DHMで取得される位相情報に基づく細胞の特徴検出法が提案されている²⁾。当研究室ではDHMにフローサイトメトリー法を適用して、流路を流れる赤血球の3次元的位置や形状の計測およびカウンティングを報告した³⁾。本研究では、流路内に赤血球と血液凝固構造が同時に流れる際に、DHMの位相情報から単一の赤血球と血液凝固構造を別々に自動検出およびカウンティングしたので結果を報告する。

本研究で用いたオフアキス型のDHMの光学系をFig.1に示す。半導体レーザ(660.0 nm, 120 mW)を光源とする。参照光は平面波とし、被検物体(フローセル)から生じる物体光はOB₃ (40倍, NA=0.65)により拡大した後、チューブレンズL₂によりコリメートされる。これらの光波の干渉縞がCCDカメラ(1024×1024 pixels, 画素ピッチ 3.45×3.45 μm²)で受光され、ホログラムが記録される。ホログラムの再生計算には、空間フィルタ法および角スペクトル法を用いた。ヘマトクリット値を0.1%

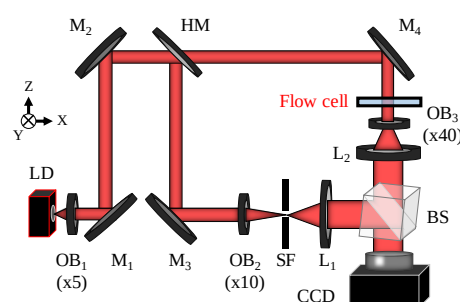


Fig.1 Experimental setup of DHM.

LD: laser diode; OB: objective lens;
M: mirror; HM: half mirror; L: lens;
SF: spatial filter; BS: beam splitter.

に調整したウマ血液 0.1 ml と、凝固時間測定試薬により作成した凝固試液 0.2 ml の混合液をシリレンジで採取し、チューブでフローセルと接続して注入した。ホログラムはフローセルの流路の底面に焦点を合わせ、105×105 μm²の範囲をCCDカメラにより25.6 fpsで10秒間撮影して取得する。各フレームのホログラムを再生し、位相情報を取得してアンラップ処理と2値化処理により単一の赤血球と血液凝固構造を分類する。Fig.2(a)はアンラップ処理を適用した位相分布、Fig.2(b)は分類した連結成分の画像である。この結果から、単一の赤血球(赤色)と血液凝固構造(白色)の検出および分類が可能であることが確認された。カウンティングの結果は当日報告する。

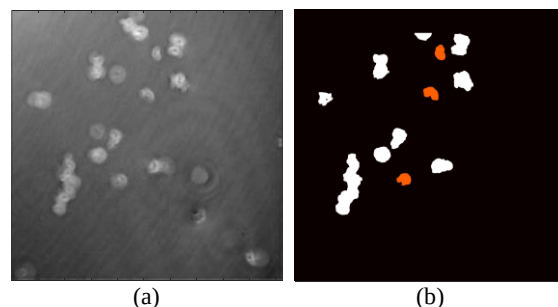


Fig.2 (a) Unwrapped phase image of red blood cells and blood coagulation structures in flow cell. (b) Classification of blood coagulation structures.

- 1) M. K. Kim, Digital holographic microscopy, (Springer, 2011).
- 2) I. Moon *et al*, Optics Express Vol.20 No.9 (2012) 10295.
- 3) H. Funamizu *et al*., Proc. SPIE Vol. 10251 (2017) 1025113.