高速ビジョンとマイクロ流路を用いた実時間赤血球硬さ評価

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*****

Online Red Blood Cell Stiffness Evaluation System by Utilizing a High Speed Vision and Micro Channel

Yuki HIROSE*, Wataru FUKUI*, Mitsuru HIGASHIMORI*, Kenjiro TADAKUMA*,
Makoto KANEKO*, Tatsuo ARAI**, Yasushi SAKATA***, Kazuhiro YAMAMOTO****,
Tomohiro KAWAHARA*****, Yoko YAMANISHI***** and Fumihito ARAI*****

This paper challenges online stiffness evaluation of red blood cell (RBC) by using both a micro channel and a high speed vision system. When a RBC passes through a micro channel, the passing time mainly depends upon its stiffness, diameter, and the pressure difference between the input and output ports of the channel. In other words, the stiffness of cell can be evaluated by measuring these three parameters. With the assistance of high speed vision system, we succeeded in evaluating the stiffness of RBC with less than 5[msec/cell]. The biggest advantage for utilizing a high speed vision is that we can know exactly what is actually happening in the channel, while it is really hard for other approaches. We also introduced the stiffness evaluation map, by which we can compare the stiffness of RBCs of patients with those of healthy persons.

Key Words: cell stiffness, red blood cell, high speed vision, online measurement

1. はじめに

動脈硬化や血液の粘性が大きくなると血管内の流動抵抗が増し、循環器疾患や脳梗塞を起こす原因になることはすでに知られている。一方、血球の90%以上を占める赤血球の硬さと疾患との関係については、マラリアに感染すると赤血球が硬くなること^{1)~3)}、また糖尿病患者の赤血球に硬さ変

化の兆候が見られるという報告⁴⁾がある程度でいまだよく知られていない。その一番の原因は赤血球の高速硬さ評価装置がないことによる。赤血球の硬さは原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて測ることができるが^{5), 6)}、単一赤血球の硬さを測るのに最低でも分オーダーの時間を要する。また幅 $4\mu\text{m}$ 程度のマイクロ流路内に赤血球を通過させ、その通過時間や回復時間を高速カメラで計測し、赤血球の硬さを評価する方法^{7)~9)}も提案されているが、従来計測方式はいずれもオフラインであるため、処理時間を含めると単一赤血球の評価に要する時間はやはり分オーダーとなる。したがって統計的処理を行なうために1,000個の赤血球の硬さを測ろうとすると、丸一日を費やしてしまう。赤血球は生体から採血した時点から劣化が始まり、3時間も経つと一部の赤血球で明確な変質が観測される。したがって細胞一つ当たり分オーダーの計測では群としての赤血球の正確な統計的データを得ることは難しい。一方、 $2\mu\text{m}$ 程度の極端に細いマイクロ流路内に赤血球を通過させ、その出入り口に取り付けた電気抵抗方式セルカウンターで赤血球の個数をカウントし、途中で破壊される赤血球数から赤血球の強度を評価する方法¹⁰⁾も提案されているが、この方法の最大の欠点は、内部で何が起きているかわからないことである。たとえば、赤血球の滞留が起こったり、破壊された赤血球の殻部までカウントされていてもそれを調べる手立て

* 大阪大学大学院工学研究科 吹田市山田丘 2-1

** 大阪大学大学院基礎工学研究科 豊中市待兼山町 1-3

*** 大阪大学大学院医学系研究科 吹田市山田丘 2-2

**** 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター
吹田市山田丘 2-2

***** 名古屋大学大学院工学研究科 名古屋市千種区不老町

* Faculty of Mechanical Engineering, University of
Osaka, 2-1 Yamadaoka, Suita

** Faculty of System Science, University of Osaka, 1-3
Machikaneyama-cho, Toyonaka

*** Graduated School of Medicine, University of Osaka, 2-
2 Yamadaoka, Suita

**** The Center for Advanced Medical Engineering and In-
formatics, University of Osaka, 2-2 Yamadaoka, Suita

***** School of Engineering, Nagoya University, Furo-cho,
Chikusa-ku, Nagoya

(Received November 15, 2010)

(Revised April 6, 2011)

がない。

このような従来研究の問題を踏まえ、本論文では高速処理ボードを搭載した高速ビジョンを使って赤血球がマイクロ流路を通過する時間、赤血球の大きさを実時間で計測できるシステムを提案するとともに、得られた情報から健康者と患者の赤血球の硬さを相対的に評価することが可能な赤血球硬さ評価マップを導入することを目的としている。本研究では赤血球の硬さを陽に測定することはしない。硬さを陽に計測しなくても、健康者と患者と赤血球の硬さの相対的な比較はできる。重要なことは、採血後、いかに素早く赤血球の硬さ特性を取得するかであるが、この問題は高速ビジョン方式やセルカウンター方式を用いれば解決できる。このように、高速センシングという点では高速ビジョン方式もセルカウンター方式もニーズにこたえることができるが、両者の最大の違いは、高速ビジョンを用いる場合、必要に応じてデータログとして映像を残すことができるので、マイクロ流路内で実際に何が起きているのかを確認することができるという点である。さらに、オンライン処理ソフトの妥当性は、オフラインで事前に解析した真値とデータ照合することによって確認できるという利点も有している。本研究で開発したオンラインソフトは、オフラインでのテストの結果、成功率 92% を達成することができた。また最速で赤血球 1 個当たり 5msec 以内に計測することにも成功した。

本論文の構成は以下のとおりである。第 2 章では従来研究をサーベイし、本研究の位置付けを明確にする。第 3 章では赤血球の硬さを評価するための硬さ評価マップを導入し、第 4 章では赤血球の流路入口および出口への進入を判定する Two-gate-monitor とマイクロ流路内の赤血球が単一かどうかを判定する Cell-state-checker という二つの高速化対応アルゴリズムを提案し導入する。第 5 章では実験装置について説明した後、提案する処理アルゴリズムの有効性を確認するため、まずオフラインによりすでに真値がわかっているデータを使っての動作検証試験を行なう。つぎに、オンライン実験を行ない、実時間で計測されたデータを元に硬さ評価マップを構築した結果について示す。第 6 章で実験結果の考察を行ない、第 7 章で本論文をまとめる。

2. 従来研究の中での位置づけ

硬さ計測の基本は、対象物に力を加え、そのときの変形を計測することによって硬さ情報に変換することである^{11)~14)}。AFM を用いた硬さ計測^{5), 6)}、力センサ付プローブによる硬さ計測¹²⁾など、従来方法の多くは、この方法によってヤング率やばね定数といった物理パラメータに変換している。筆者らがこれまで行ってきた真の眼圧を推定するための非接触角膜硬さ計測¹⁵⁾、非接触肺腫瘍検出センサ¹⁶⁾、非接触胃内壁硬さセンシング¹⁷⁾などもこれに分類することができる。一方、力と変位を陽に計測することなく、間接的に硬さを評価する方法がある。たとえば、マイクロ流路内にそれより直径が大きい細胞を通過させると、その変形度合いと細胞の硬さ

Fig. 1 Behavior of RBC in micro channel

に応じて壁面との粘性抵抗が変化し、結果的にマイクロ流路内の通過時間が変化する。つまり細胞の硬さは通過時間の関数になる^{7), 8)}。前者の例からわかるように硬さを直接的に計測する方式は対象物の位置決めなどに時間がかかる半面、後者の例のように硬さ情報を間接的に取得する方式は直接的な計測方式に比べ、計測時間を大幅に短縮することができる利点を有している。ただし、間接的に硬さを評価する方法では、一般にヤング率のような物性値に変換することが難しいため、絶対的な評価指標には向かないが、本研究のように患者と健康者との相対的な比較を行なうことを目指するのであれば、その特徴を生かすことができる。

一方で、赤血球の硬さを評価する研究は数多くある^{2), 3), 6)~10), 18)~20)}。中でも計測の高速化を期待できるマイクロ流路を用いた赤血球の硬さ評価が行なわれている^{3), 7)~10), 18)~20)}。赤血球はその変形能力によってマイクロ流路内で細長く変形し、流路から流出すると元の形状に回復し始める。大場ら⁹⁾は、マイクロ流路から解放された赤血球の回復時定数により硬さを評価している。一般に硬い赤血球ほど回復時定数が小さくなる。また、Huang ら³⁾、Hirose ら⁸⁾、Kim ら¹⁸⁾もマイクロ流路を用いて赤血球の硬さを評価する方法を提案しているがいずれもオフライン計測にとどまっている。また一方で、赤血球の硬さをオンラインで評価する方法として、電気抵抗の変化に着目して、通過した赤血球数をカウントする方法¹⁰⁾や赤血球の変形率を計測する方法¹⁹⁾があるが、これらの方法の最大の問題点はマイクロチャンネル内の赤血球の真の挙動を観察しているわけではないので、どのようなシステムを構築したとしても、真値との比較ができない点である。この点を踏まえて、本研究では映像のデータログにより真値が確認できる高速ビジョン方式を提案している。

実時間高速ビジョンについては石川、石井らによる先駆的な基礎研究および応用研究^{21), 22)}がある。たとえば石川らは顕微鏡下でゾウリムシの繊毛運動を観察するために高速ビジョンを用いて平均速度を計測し、ゾウリムシの重心が常に視野の中心にくるようにテーブルをフィードバック制御することに成功している。ただし、筆者らが知る範囲において、赤血球の硬さを実時間高速ビジョンを使って実時間評価した例はない。

3. 赤血球硬さ評価マップ

Fig. 1 にマイクロ流路内における赤血球に作用する力を示す。ここで D_0 , B ($D_0 > B$), l , h , τ , U , μ はそれぞれ赤血球の初期直径, 流路幅, マイクロ流路の長さ, マイクロ流路と赤血球との隙間, セン断応力, マイクロ流路内赤血球の平均速度, および粘性係数とする。いまマイクロ流路出入口で圧力差 ΔP が与えられているものとする。赤血球の直径より流路幅が小さいため, 赤血球は **Fig. 1** のように変形した状態でマイクロ流路内を通過する。このとき壁面と赤血球の間の流れに着目すると, 一般に (1) 式のような線形速度分布になることが知られている²³⁾。

$$u(y) = \frac{Uy}{h} \quad (1)$$

ここに y は壁面を基準にとった座標で $u(y)$ は局所的な速度分布を表わす。このときせん断応力 τ は (2) 式で与えられる。

$$\tau = \mu \frac{du}{dy} \quad (2)$$

このせん断応力によって作られる抗力 F_d は, 次式となる。

$$F_d = \frac{\mu\pi ULB}{h} \quad (3)$$

ここで L はマイクロ流路内での赤血球の長さを表わす。この抗力は圧力差 ΔP が作る力とバランスするので, (4) 式が成立する。

$$\frac{\pi\Delta PB^2}{4} = \frac{\mu\pi ULB}{h} \quad (4)$$

(4) 式より,

$$U = \frac{\Delta PhB}{4\mu L} \quad (5)$$

(5) 式より,

$$T = C \frac{L}{\Delta Ph} \quad (6)$$

ただし, $C = 4\mu l/B$ は定数とみなすことができる。ここで $L \sim D_0$ かつ $h = h(K, D_0)$ とみなすことができるから, $K = f(T, D_0, \Delta P)$, つまり硬さは赤血球の通過時間 T , 初期直径 D_0 , 圧力差 ΔP の関数とみなすことができる。定性的に説明すると, 圧力差一定の下, 同一の大きさの赤血球では通過時間が長いほど硬い。圧力差一定の下, 同一の硬さの赤血球では, 大きな赤血球ほど通過時間が長い。また大きさ一定の下, 同一硬さの赤血球では, 圧力差が大きいほど通過時間は短くなる。このことは赤血球の硬さを評価するマップとして, たとえば T - D_0 面上に ΔP をパラメータとして表示する方法や T - ΔP 面上に D_0 をパラメータとして表示することによって硬さが評価できることを意味している。ここではこのようなマップを総称して赤血球の硬さ評価マップと呼ぶことにする。なお, 圧力差 ΔP を測るためには圧力センサが必要になるが, ΔP を液柱 (ヘッド) に置き換えて, 出入口間の高さを調整することで, 理想的な状態が実現できれば

Fig. 2 Single-gate monitor method and two-gate-monitor method

圧力センサは不要になる。また D_0 はマイクロ流路内の赤血球の長さ L で置き換えてもよい。このようにパラメータにはさまざまな選択肢があるものの, 三つのパラメータが支配的であることに留意されたい。

4. Two-gate-monitor および Cell-state-checker アルゴリズムの提案

4.1 Two-gate-monitor

3 章では, 赤血球の硬さを評価するパラメータとして, T , D_0 (または L), ΔP (または V_0) を計測すればよいことを説明した。本章ではこれらのパラメータのうち, ΔP は液柱高さを調整することを前提とし, 赤血球の通過時間 T と赤血球の大きさに関係するパラメータ D_0 (または L) を高速ビジョンで実時間計測する問題を取り扱うことにする。石川らはターゲットより少しだけ大きい Window を対象物の重心とともに動かすことによって, 取り扱う画素数を格段に少なくし, ビジョンシステムの高速化を実現している。このように取り扱う画素数を減らすことは高速処理を実現する上での基本である。この考え方に立つと, **Fig. 2** (a) のようにマイクロ流路全体に Window を設置するよりも, **Fig. 2** (b) のようにマイクロ流路出入口に限定した Window を設置したほうが高速処理に適している。その上, **Fig. 2** (b) のように Window 領域を狭くしたほうが輝度値の変化が大きく, 結果的に閾値変動に対するロバスト性を確保することができる。

つぎに赤血球がマイクロ流路を通過するときの実際のデータを用いて, 通過時間の計測アルゴリズムについて説明する。**Fig. 3** (a) に示すような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り、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 が入口ゲートを通り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どこにもない．たとえば、 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とを前提とした上で、アルゴリズムを構築しなければならない．次節では、複数の赤血球が同時刻にマイクロ流路内に存在しているかどうかを判定する Cell-state-checker について説明する．

4.2 Cell-state-checker

マイクロ流路内に 2 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長くなる．ところが、Two-gate-monitor は赤血球数の判別ができないうまま、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くてしまう．これがマイクロ流路内に 2 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み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 を導入する．Fig. 3 (b), (c) 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、輝度値を空間軸 (x 軸) に対してプロットしたものである．ここで Fig. 3 (b) は単一赤血球の場合、Fig. 3 (c) は 2 個の赤血球が入っている場合の輝度値の空間軸パターンである．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、2 個の赤血球が入っている場合には、1 個目と入口ゲートの間に 2 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 画素ライン上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をどこ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、つぎの赤血球に対して入口ゲートの T_1 計測から始める．また Fig. 3 (b) 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 が計測できる点にも留意されたい．ただし、複数の赤血球が重なって入っている場合や、赤血球ではなくマイクロダストを察知してしまう場合があるため、安全を見込んで、実際にはあり得ない L_{min} と L_{max} を設定して $L_{min} < L < L_{max}$ の条件を満たさない赤血球のデータはすべてはじくようにプログラムする．第 4 章第 1 節の Two-gate-monitor と本節の Cell-state-checker を

(a) Brightness value in Window1

(b) One cell in the channel

(c) Two cells in the channel

Fig. 3 Brightness value in the window and channel checker

組み合わせることにより、理想的には単一の赤血球の場合の通過時間と赤血球の変形長さ L だけがデータとして残されることになる．条件に合わないデータはすべて捨ててしまうというのが本方式の基本コンセプトである．Fig. 4 は以上の流れをフローチャートにしたものである．実際には入口ゲートにフラグを設け、 T_1 が計測された時点でフラグを立て、フラグが立っている間は、出口ゲートのみ着目し、 T_2 が計測された時点で Cell-state-checker ライン上を探索し、マイクロ流路内には単一赤血球しかないということが確認された時点で T, L をメモリに格納し、フラグを元に戻し、再び入口ゲート

Fig. 4 Flow chart of online algorithm

Fig. 5 Experimental system

のループに戻る。生理食塩水で血液を希釈したとしても大量の赤血球がづきからづきにマイクロ流路内に送りこまれてくることを考えると、この“疑わしきはすべて罰する”方式は正確な硬さ評価マップを得る上できわめて自然かつ有効な手段であろう。

5. 実験

5.1 実験装置

Fig. 5 に実験装置の概要を示す。実験装置は大きく、マイクロ流路を内蔵したチップ、血液を蓄えるマイクロタンク、マイクロ流路に血液を送り込むシリコンチューブ、顕微鏡、さらに高速ビジョンシステムから構成されている。マイクロ流路は PDMS によるマイクロファブリケーション技術を駆使して製作している。正常な赤血球の直径が $6\sim 8\mu\text{m}$ であることを考慮し、マイクロ流路幅は $4\mu\text{m}$ に設定した。またマイクロ流路前後には一様流が確保できるように十分な幅を与えている。顕微鏡としては位相差顕微鏡 IX71 (オリンパス社製) を使用している。高速ビジョンシステムは高速度カメラと高速ビジョン処理ボードから構成されており、いずれもアイアイラボ社製である。赤血球は $30\mu\text{m}$ を 5msec 以内に通過するため、その高速変形動作をしっかりと捉えるため、高速度カメラのフレームレートは 6000fps に設定する。

5.2 実験結果 (オフライン)

Fig. 6 は 2 種類の赤血球がマイクロ流路内を通過してい

Fig. 6 Sequence photograph of normal RBC and spherical RBC

るとき連続写真を示す。ここで Fig. 6 (a), (b) はそれぞれ正常な赤血球および球状赤血球と呼ばれる異常赤血球が通過しているようすである。なお、それぞれの細胞の上部に、最も左の細胞の位置を 0msec とした際の、各細胞のその位置に達するまでの経過時間を記している。正常な赤血球の直径が $D_0 = 6\sim 8\mu\text{m}$ であるのに対し、球状赤血球は $D_0 = 5\sim 7\mu\text{m}$ と小さいが、正常な赤血球より硬くなっていることが知られている。赤血球の挙動を観察するとマイクロ流路内で赤血球が大きく変形し、マイクロ流路を出たところから回復し始める。Fig. 6 からわかることは正常な赤血球より球状赤血球のほうが早く回復していることである。これより回復時の映像から球状赤血球のほうが硬いことが読み取れる。

Fig. 7 (a) は高速度カメラの映像を保存し、マニュアル操作で赤血球の通過時間 T および赤血球のマイクロ流路内長さ L を求め、硬さ評価マップ上にプロットしたものである。Fig. 7 (a) より、この被験者の場合、赤血球群として大きく二つのグループに分けることができる。一つはマイクロ流路内の赤血球の長さ $L = 7\sim 14\mu\text{m}$ でかつ通過時間 $T = 2\sim 3\text{msec}$ のグループでもう一つはマイクロ流路内の赤血球の長さ $L = 6\sim 8\mu\text{m}$ でかつ通過時間 $T = 4\sim 9\text{msec}$ のグループである。両群はほとんどオーバーラップすることなく明確に分離することができる。このうち前群の赤血球は正常な振る舞いに近いが、後群の赤血球は球状赤血球の振る舞いと一致する。このように硬さ評価マップ上に取得した赤血球の全データをプロットすることにより、球状赤血球が正常赤血球に対して 10%程度混在しているといった、被験者の赤血球の特性を明確に把握することができる。Fig. 7 (b), (c) はオンラインソフトを事前に記録されたデータに適用して、硬さ評価マップを作成したものである。なお、オンラインソフトを用いた場合、計測された全赤血球のうち 15%が流路内に複数細胞が進入していると判定され、これらは計測時にすでにエラーデータとして破棄されている。また、Fig. 7 (b), (c) はそれぞれ赤血球の長さ L に真値を用いて、通過時間 T だけオンラインソフトを用いて処理して構築した硬さ評価マップ

(a) Cell stiffness map for a patient

(b) Comparison with the length of RBCs fixed

(c) Comparison with the passing time fixed

Fig. 7 Cell stiffness map

と、通過時間 T に真値を用いて、赤血球の長さ L だけオンラインソフトを用いて処理して構築した硬さ評価マップを示したものであり、オンラインソフトを用いた場合の値と、それに対応する真値は互いに直線で結ばれている。ここで真値というのは、マニュアル操作で単一赤血球しかマイクロ流路内に存在していないことを逐一確認しながら処理して得られた値のことである。一方のパラメータに真値を用いることで、誤差を作り出す要因を明確に把握できるのがこのような表示法にした一番の理由である。ここで真値とのマップ上での誤差 E を (7) 式で定義する。

$$E = \frac{Q_{comp} - Q_{true}}{Q_{true}} \quad (7)$$

ただし Q は T または L を表わし、添え字 comp および true はそれぞれオンラインソフトで処理した結果および真値

Fig. 8 Log of vision data taken online

を表わす。ここで、(7) 式で定義される誤差 E の許容範囲について考える。まず、通過時間に関して誤差 E を適用する場合、高速度カメラの撮影および実時間処理のフレームレートは 6000fps で行なっているため、連続するフレーム間の時間は 0.17msec となり、よって入口および出口ウィンドウでのそれぞれの反応時間差によって算出される通過時間の計測誤差は最大で 0.34msec である。一方、Fig. 7 (b) を見ると、赤血球の通過時間は最大でも 3.0msec であり、オンラインソフトとマニュアル操作を行なった場合との最大計測誤差は、赤血球通過時間の 10% に相当する。また、赤血球長さに関して誤差 E を適用する際に、オンラインソフトとマニュアル操作を行なったそれぞれの場合において計測誤差が細胞膜の両端で 1pixel ずつ発生するものとする、高速度カメラの映像の空間分解能が $0.25\mu\text{m}/\text{pixel}$ であることを考慮して、赤血球長さにおける両者の最大誤差は 4pixel、つまり $1\mu\text{m}$ となる。一方で、Fig. 7 (c) より、平均的な赤血球長さはおよそ $10.5\mu\text{m}$ であり、最大誤差はこれに対して 10% の値に相当する。以上を踏まえて、通過時間と赤血球長さ計測それぞれにおいて誤差 E が ± 0.1 未満のものを成功、 ± 0.1 以上のものを失敗とみなす。このとき、Fig. 7 (b), (c) において、それぞれの計測成功率はそれぞれ 96% および 92% であった。

5.3 実験結果 (オンライン)

Fig. 8 は Two-gate-monitor, Cell-state-checker アルゴリズムを適用して赤血球の実時間計測を行なった際のビジュアルデータをモニター画面に表示した例である。なお、実時間処理は、高速度カメラのフレームレートと同期させて 6000fps で行なっている。Fig. 8 (a), (b) はそれぞれ入口部および出口部での Window が赤血球を明確に捉えているようすを示したものである。また、**Fig. 9** は健常者の赤血球を使って得られた赤血球の硬さマップである。1 分間に赤血球 100 個以上の割合で計測を行なったが、健常者の赤血球を用いたこの場合、Fig. 7 (a) に見られるような球状赤血球は全く観察されなかった。また、全体的に赤血球長さ L に対する通過時間の変化はほとんど見られないことがわかる。これは健常者の赤血球を用いた場合に現われる典型的な硬さマップである。

6. 考 察

オンラインソフトとマニュアル操作の比較において、通過

Fig. 9 Online cell stiffness map

時間、赤血球長さの判定ともに成功率は90%を超えたが、計測に失敗した例について考察する。まず、Fig. 7 (b)において、通過時間に関してマニュアル操作とオンラインソフトの結果を比較すると、誤差 E が ± 0.1 以上である3例は、いずれも Fig. 10 (a) のように、入口ウィンドウでの判定にて本来反応すべき細胞膜の右端で閾値を超えず、間違っ左端で反応していることにより起こったエラーである。また、Fig. 7 (c) においては、細胞長さに関して誤差 E が ± 0.1 以上である全6例のうち、5例がオンラインソフトによって真値よりも小さい値を得ている。これは、細胞の長さを計測する際に、細胞膜の左端の正しい位置を判定できずに起こったエラーである。また、残りの1例は Fig. 10 (b) に示すように、複数細胞が同時に流路に進入し、かつ細胞膜が薄く映った場合である。このとき、オンラインソフトでは複数細胞を単一細胞と誤認識し、間違った位置を細胞の左端と認識している。

以上のエラーは、細胞膜の位置を判定する際に、正しい位置でウィンドウ内輝度値の閾値を超えなかったことに起因している。それぞれの細胞に対して細胞膜を判定するための最適な閾値が存在するが、リアルタイム計測において、各細胞に対して逐一閾値を変更することは不可能であり、このため今回のようなエラーが発生した。これらの問題に対処するためには、オンライン計測時において、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が考えられる。この方法は、計測が正しく行なわれているかどうかだけを判別するものであり、短時間で済む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ものと思われる。なお、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筆者らは考えている。

Fig. 10 Two examples of error data

7. 結 論

本論文で得られた主な結果は以下のとおりである。

- (1) マイクロ流路と高速ビジョンシステムを用いた赤血球の実時間硬さ計測システムを提案した。
- (2) マイクロ流路内の赤血球の力学的特性の解析結果を元に、硬さ評価に関する三つのパラメータ（マイクロ流路内通過時間、赤血球の大きさ、印加圧力差）を導出するとともに硬さ評価マップを新たに導入した。
- (3) 赤血球の位相差顕微鏡での光学的特性を考慮し、実時間処理用として Two-gate-monitor および Cell-state-checker アルゴリズムを提案し、オフラインデータにより基本的動作の検証を行なうとともにオフラインでの動作確認を行なった。

今後は、マイクロ流路の高精度化・均一化、血液マイクロタンク内微小圧力の可制御化を中心に研究を進めていく予定である。

謝辞 本研究は、大阪大学グローバル COE プログラム (医・工・情報学融合による予測医学基盤創成) からの支援をいただいた。ここに心からの感謝の意を表したい。また本研究を進めるに当たり広島大学工学研究科石井抱教授から特に高速ビジョンに関して多大なる助言をいただいた。ここに心より謝意を表したい。

参 考 文 献

- 1) F.K. Glenister, R.L. Coppel, A.F. Cowman, N. Mohandas and B.M. Cooke: Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells, *Blood*, **99**-3, 1060/1063 (2002)
- 2) J.P. Mills, M.D. Silva, D.J. Quinn, M. Dao, M.J. Lang, K.S.W. Tan, C.T. Lim, G. Milon, P.H. David, O.M. Puijalon, S. Bonnefoy and S. Suresh: Effect of plasmodial RESA protein on deformability of human red blood cells harboring plasmodium falciparum, *PNAS*, **104**-22, 9213/9217 (2007)
- 3) S. Huang, H. Bow, M. Diez-Silva and J. Han: Applying a microfluidic 'Deformability Cytometry' to measure stiffness of malaria-infected Red blood cells at body and febrile temperatures, *The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2010)*, 259/261 (2010)
- 4) K. Tsukada, E. Sekizuka, C. Oshio and H. Minamitani:

- Direct measurement of erythrocyte deformability in diabetes mellitus with a transparent microchannel capillary model and high-speed video camera system, *Microvascular Research*, **61**, 231/239 (2001)
- 5) G. Binnig, C.F. Quate and Ch. Gerber: Atomic force microscope, *Physical Review Letters*, **56-9**, 930/933 (1986)
 - 6) M. Lekka, M. Fornal, G. Pyka-Fosciak, K. Lebed, B. Wizner, T. Grodzicki and J. Styczen: Erythrocyte stiffness probed using atomic force microscopy, *Biorheology*, **307/317** (2005)
 - 7) Y. Hirose, K. Tadakuma, M. Higashimori, T. Arai, M. Kaneko, R. Iitsuka, Y. Yamanishi and F. Arai: A new stiffness evaluation toward high speed cell sorter, *Proc. of the IEEE Int. Conf. on Robotics and Automation (ICRA10)*, 4113/4118 (2010)
 - 8) 廣瀬 飯塚, 山西, 新井史人, 新井健生, 東森, 多田隈, 金子: 細胞の高速硬さ計測に向けて, 第10回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (SI2009) 論文集, **3G3-1**, 1655/1658, (2009)
 - 9) Y. Imamura, T. Tajikawa, K. Ohba and T. Takubo: Measurement of the time constant of shape recovery of human erythrocyte using a micro-channel technique, *Mechanical Engineering Congress 2009*, **6-09-1**, 197/198 (2009)
 - 10) S. Youn, D.W. Lee and Y.H. Cho: Cell-deformability-monitoring chips based on strain-dependent cell-lysis rates, *Journal of Microelectromechanical Systems*, **17-2** (2008)
 - 11) I. Kato, K. Koganezawa and A. Takanishi: Automatic breast cancer palpation robot: WAPRO-4, *Advanced Robotics*, **3-4**, 251/261 (1988)
 - 12) P.S. Wellman and R.D. Howe: Modeling probe and tissue interaction for tumor feature extraction, *1997 ASME Summer Bioeng. Conf.*, **35**, 237/238 (1997)
 - 13) T. Irie, H. Oka and T. Yamamoto: Measurement of hardness on human skin with impact force, *Medical and Biological Engineering and Computing*, **32-2**, 231/233 (1994)
 - 14) S.E. Cross, Y.S. Jin, J. Rao and J.K. Gimzewski: Nanomechanical analysis of cells from cancer patients, *Nature*, **2**, 780/783 (2007)
 - 15) Y. Kurita, R. Kempf, Y. Iida, J. Okude, M. Kaneko, H.K. Mishima, H. Tsukamoto, E. Sugimoto, S. Katakura, K. Kobayashi and Y. Kiuchi: Contact based stiffness sensing of human eye, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, **55-2**, 739/745 (2008)
 - 16) M. Kaneko, C. Toya and M. Okajima: Active strobe imager for visualizing dynamic behavior of tumors, *Proc. of the 2007 IEEE International Conf. on Robotics and Automation*, 3009/3014 (2007)
 - 17) T. Kawahara, S. Tanaka and M. Kaneko: Non-contact stiffness imager, *The International Journal of Robotics Research*, **25-5/6**, 537/549 (2006)
 - 18) W. Kim and A. Han: A micro-aspirator chip using vacuum expanded microchannels for high-throughput mechanical characterization of biological cells, *The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2010)*, 253/255 (2010)
 - 19) 藤原, 巽, 中部: マイクロ流路内における電気抵抗時系列変化を用いた赤血球の変形能計測, 日本機械学会関西学生会平成21年度卒業研究発表講演会, 313 (2010)
 - 20) J. Wan, W.D. Ristenpart and H.A. Stone: Dynamics of shear-induced ATP release from red blood cells, *PNAS*, **105-43**, 16432/16437 (2008)
 - 21) I. Ishii and M. Ishikawa: High speed target tracking algorithm for 1 ms visual feedback system, *J. Robotics Soc. Japan*, **17**, 39/45 (1999)
 - 22) T. Komuro, I. Ishii, M. Ishikawa and A. Yoshida: A dig-

ital vision chip specialized for high-speed target tracking, *IEEE Trans. Electron. Devices*, **50**, 191/199 (2003)

23) F.M. White: Viscous fluid flow, 426/428 (1974)

[著者紹介]

廣瀬 優 紀

1987年5月9日生。2010年大阪大学工学部応用理工学科機械工学科目卒業。現在大阪大学大学院工学研究科機械工学専攻在学中。細胞の高速硬さ評価システムに関する研究に従事。

福井 航

1988年6月7日生。2011年大阪大学工学部応用理工学科機械工学科目卒業。現在大阪大学大学院工学研究科機械工学専攻在学中。赤血球硬さと疾病の関係に関する研究および細胞の高速マニピュレーションに関する研究に従事。

東 森 充 (正会員)

1974年3月9日生。98年広島大学大学院工学研究科博士課程前期修了。同年株式会社東芝入社。2002年広島大学大学院工学研究科助手, 2006年大阪大学大学院工学研究科助手, 2008年同准教授, 現在に至る。博士(工学)。ロボットハンド, アクティブセンシングの研究に従事。日本ロボット学会, 日本機械学会, 日本生体医工学会, IEEEの会員。

多田隈 建二郎 (正会員)

2007年東京工業大学大学院理工学研究科機械宇宙システム専攻博士課程修了。同年 Massachusetts Institute of Technology Department of Mechanical Engineeringにて Postdoctoral Associate。2008年東北大学大学院航空宇宙工学専攻産学官連携研究員。同年電通大・電気通信学部知能機械工学科助教, 2009年より大阪大学大学院工学研究科機械工学専攻助教, 現在に至る。全方向移動機構, 不整地移動機構, グリップ機構など, ロボット機構の研究開発に一貫して従事。

金 子 真 (正会員)

1954年1月18日生。81年東京大学工学系研究科博士課程卒業。工学博士。通産省工業技術院機械技術研究所, 九州工業大学助教授, 広島大学教授を経て, 2006年より大阪大学教授, 現在に至る。医療診断システム, アクティブセンシング, ヒトの能力を超えたロボットの研究に興味をもつ。日本機械学会奨励賞(83), 日本ロボット学会論文賞(94, 2007), 計測自動制御学会論文賞(96, 2002, 2008), 日本コンピュータ外科学会講演論文賞最優秀賞(2004), IEEE RAS Best Trans. Paper Award(2003)などを受賞。

新 井 健 生 (正会員)

1952 年 1 月 6 日生。77 年東京大学大学院工学系研究科情報工学専攻修了 (修士)。同年通商産業省機械技術研究所入所。86 年東京大学工学博士 (論文)。86~87 年 MIT 客員研究員。97 年大阪大学教授、現在に至る。ロボットの機構設計と制御、ナノ・マイクロロボティクス、作業移動型ロボット、パラレルメカニズムなどの研究に従事。日本ロボット学会、日本機械学会、IEEE などの会員。

新 井 史 人 (正会員)

1963 年 8 月 1 日生。88 年東京理科大学修士課程修了。93 年名古屋大学博士 (工学)。98 年名古屋大学助教授、2005 年東北大学教授、2010 年名古屋大学教授、現在に至る。マイクロ・ナノシステム工学、オンチップロボティクスなどの研究に従事。2000 年 Early Academic Career Award, RAS, IEEE, 2004 年 RSJ 論文賞、2007 年本会論文賞、2010 年本会技術賞など。JSME Fellow。

坂 田 泰 史

1967 年 6 月 30 日生。93 年大阪大学医学部卒業。2002 年大阪大学大学院医学研究科修了。同年より米国テキサス州バイラー医科大学に 2 年間留学。2006 年より大阪大学助教、2008 年より大阪大学医学部講師。医学博士。病院診療業務とともに、心不全、特に拡張不全の診断・治療戦略確立を目指す研究に従事。日本内科学会認定医、日本循環器学会専門医、日本超音波医学会認定専門医。

山 本 一 博

196 年 3 月 7 日生。86 年大阪大学医学部卒業。94 年大阪大学大学院医学研究科修了。2 年間の米国 Mayo Clinic 留学を経て 98 年大阪大学助手。2005 年大阪大学臨床医工学融合研究教育センター特任助教授 (医学系研究科循環器内科兼任)。2007 年大阪大学臨床医工学融合センター特任教授 (医学系研究科循環器内科兼任)、現在に至る。医学博士。心不全の発症機序解明、病態診断を含む治療戦略確立を目指す研究に従事。

川 原 知 洋 (正会員)

1979 年 8 月 13 日生。2006 年広島大学博士課程後期修了。博士 (工学)。2006 年 10 月より同大医学部ポスドク研究員。この間、2004 年-2006 年日本学術振興会特別研究員 (DC1)、2006 年-2009 年日本学術振興会特別研究員 (PD)。2010 年 1 月より東北大学助教を経て、2010 年 4 月より名古屋大学 COE 特任助教、現在に至る。非接触硬さセンシング、低侵襲手術用デバイス、オンチップロボティクスの研究に興味をもつ。計測自動制御学会学術奨励賞 (04)、日本ロボット学会研究奨励賞 (06)、日本ロボット学会論文賞 (07)、日立メデイコ賞 (09) などを受賞。

山 西 陽 子

1972 年 5 月 7 日生。2003 年ロンドン大学インペリアルカレッジ機械工学科熱流体専攻 Ph.D コース修了。2004 年芝浦工業大学機械工学特任講師、2006 年東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻産学官連携研究員。2008 年同助教。2009 年科学技術振興機構 (JST) さきがけ専任研究員。2010 年名古屋大学大学院工学研究科機械理工学専攻客員准教授、2011 年名古屋大学大学院工学研究科マイクロ・ナノシステム工学専攻准教授。現在に至る。マイクロ混相流体、微細作業システム、マイクロ・ナノバイオシステムなどの研究に従事。