OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Digital holographic microscopy for label free assessment of single cells in microfluidic systems
Author(s)	Bansode, Vaibhav Balasaheb
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/106982
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name （BANSODE VAIBHAV BALASAHEB）	
Title	Digital holographic microscopy for label free assessment of single cells in microfluidic systems (マイクロ流路における単一細胞の無標識評価のためのデジタルホログラフィック顕微鏡法)

Abstract of Thesis

Single-cell analysis is essential for understanding cellular heterogeneity and dynamic biological processes that are masked in population-averaged measurements. Microfluidic technologies have emerged as powerful platforms for single-cell manipulation and analysis by enabling precise control over cellular microenvironments. However, microfluidic geometries and operational modes, such as trapping and flow, can significantly influence cellular morphology and optical properties, thereby affecting measurement accuracy and biological interpretation. In addition, many microfluidic single-cell studies rely on fluorescence-based imaging, which requires exogenous labels and may perturb intrinsic cellular states, limiting their suitability for non-invasive and quantitative assays.

This doctoral research establishes a label-free, quantitative framework for single-cell analysis by integrating digital holographic microscopy (DHM) with microfluidic platforms, addressing both trapped and flowing cell measurements. Off-axis DHM is employed to enable quantitative phase imaging, providing non-invasive access to intrinsic cellular morphology and optical phase without the need for fluorescent labeling. Jurkat T cells are used as a model system to systematically investigate how static (trapped) and dynamic (flowing) microfluidic environments influence cellular morphology and phase characteristics.

To enable practical and scalable microfluidic measurements, a low-cost, low-coherence optical system is developed using a superluminescent diode as the illumination source. While low-coherence sources reduce coherence noise, they introduce challenges in achieving large field-of-view imaging. This work overcomes these limitations by implementing an off-axis DHM configuration with coherence-plane tilting, enabling stable interference across a large imaging area. The resulting system achieves short exposure times suitable for flowing cells, high signal-to-noise ratio, and excellent spatial and temporal phase stability, allowing parallel, high-throughput imaging of multiple cells in microfluidic flow. An integrated, flow-controlled microfluidic platform is further designed to ensure sedimentation-free operation without sheath flow or complex hydrodynamic focusing.

Using this integrated DHM-microfluidics system, quantitative comparisons between trapped and flowing cells are performed. Automated image processing, segmentation, and statistical analysis reveal that microfluidic trapping can induce measurable morphological and phase alterations, whereas cells imaged under flow preserve their native morphology. These results demonstrate that microfluidic conditions themselves constitute a critical experimental variable and must be carefully considered for reliable single-cell characterization.

Finally, to address computational limitations associated with high-throughput holographic imaging, this thesis introduces a deep learning-based, reconstruction-free analysis framework. Convolutional neural networks trained on experimentally acquired raw holograms enable direct extraction of morphological features without explicit phase reconstruction, significantly reducing computation time while maintaining quantitative consistency with conventional quantitative phase imaging analysis. This approach provides a scalable pathway toward real-time, imaging flow cytometry-compatible single-cell analysis.

Overall, this work demonstrates a cost-effective, label-free, and high-throughput single-cell analysis platform that integrates low-coherence digital holographic microscopy, microfluidic control, quantitative phase imaging, and deep learning. The proposed framework advances reliable single-cell characterization and has strong potential for applications in biomedical research, drug screening, and disease diagnostics.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ BANSODE VAIBHAV BALASAHEB ）		
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	藤田　克昌
	副 査	教授	吉川　洋史
	副 査	教授	井上　康志
	副 査	教授	バルマ　プラブハット
	副 査	教授	永井　秀典

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、マイクロ流体デバイス内における単一細胞計測に対し、デジタルホログラフィック顕微鏡（Digital Holographic Microscopy: DHM）を統合することで、蛍光標識に依存しない非侵襲・定量的な単一細胞解析基盤を確立するものである。特に、トラップされた静的環境下の細胞と、マイクロ流路における動的環境下の細胞を対象とし、計測環境が細胞形態および光学位相特性に与える影響を系統的に評価している。その成果は以下のとおりである。

オフアクシス DHM に基づく定量位相イメージングを採用し、蛍光標識を用いずに細胞の形態情報および光学位相情報を取得可能な計測手法を構築している。モデル細胞として Jurkat T 細胞を用い、マイクロ流体内でのトラップ条件およびフロー条件が細胞形態と光学位相特性に与える差異を、定量的に比較可能な手法を提示している。

構築したマイクロ流体 DHM システムを用い、トラップ条件とフロー条件における細胞の形態および光学位相特性の定量比較を実施している。自動画像処理、セグメンテーション、統計解析により、マイクロ流体トラップが細胞に対して形態および光学位相特性の変化を誘起し得る一方、フロー下で観察された細胞はより本来の形態を保持することを示している。これらの結果は、マイクロ流体条件そのものが単一細胞特性評価における重要な実験変数となることを示すものであり、信頼性の高い単一細胞計測のために、計測環境を慎重に設計・解釈すべきことを明確化している。

DHM の細胞解析への実用性と拡張性の向上のため、超広帯域発光ダイオードを用いた低コヒーレンス・低コストの光学系を開発している。低コヒーレンス光源によるコヒーレンスノイズ低減の利点を活かしつつ、広視野での光干渉性の確保のためのコヒーレンス傾斜法を実装することで、広い撮像領域にわたる安定なホログラフィ計測を実現している。その結果、フロー中の細胞計測に適した短時間露光での撮像、高い信号対雑音比、および優れた空間・時間位相安定性を達成し、マイクロ流体内で複数細胞を並列に高スループット観察可能な計測基盤を確立している。さらに、試料沈降の影響を抑制しつつ安定運用可能なフロー制御一体型マイクロ流体デバイスを組み込むことで、流路内での計測条件を安定化し、実験系由来の計測誤差を低減した単一細胞位相計測を可能としている。

加えて、高スループットなホログラフィ計測における位相再構成計算の負荷軽減のため、深層学習を用いた画像再構成が不要な解析法を提案している。実測のホログラムデータを用いて学習した畳み込みニューラルネットワークにより、画像再構成を経ずに形態特徴量を抽出可能であることを示し、従来法と整合する定量性を維持しながら計算時間を大幅に低減している。本手法は、DHM のリアルタイム解析やセルソーターへの拡張性を向上させるものである。

以上のように、本学位論文は、低コヒーレンス DHM、マイクロ流体制御、定量位相イメージング、および深層学習解析を統合することで、低コスト・非標識・高スループットな単一細胞定量解析基盤が実現可能であることを示したものである。マイクロ流体環境が計測結果に与える影響を明確化するとともに、再構成不要な細胞解析による計算的ボトルネックの解消に成功している。これらの成果は応用物理学、特にバイオフォトニクスに寄与するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものとして認める。