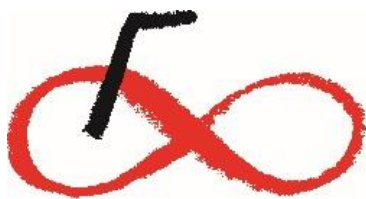


研究報告書

平成27年度 血流内血栓 4 D 可視化計測システムの開発 補助事業

平成 29 年 5 月

千葉大学大学院工学研究科
教授 武居 昌宏



RING!RING!
プロジェクト
競輪の補助事業

目次

ステージ1

緒言 (ステージ1)	5
------------------	---

ステージ【1-1】【1-2】

1. 研究目的.....	9
2. 理論.....	9
2.1. 電氣的等価回路.....	9
2.2. レジスタンス CT	10
2.3. 導電率とヘマトクリットの関係.....	12
3. 静的状態の血液の電気特性実験.....	13
3.1. 実験装置.....	13
3.2. 実験方法.....	14
3.3. 実験結果.....	15

ステージ【1-3】

1.EIT シミュレーション	35
1.1. シミュレーション方法.....	35
1.2. プログラムと計算条件.....	35
1.3. シミュレーション結果.....	37

ステージ【1-4】

1.赤血球の沈降実験.....	41
1.1. 実験装置.....	41
1.2. 実験条件.....	41
1.3. 実験方法.....	43
1.4. 実験結果.....	43
2. 結言.....	49

ステージ【1-5】

1. 目的.....	51
2. 理論.....	51
2.1. 血液凝固反応メカニズム.....	51
2.2. 赤血球凝集.....	53
2.3. Cole-Cole 解析	54

2.3.3 データフィッティングの仕方.....	57
2.4 直径が一定の円管内を流れる血流の流体力学.....	59
3. 緩和周波数 f_c を用いた血液凝固反応過程における赤血球凝集速度.....	60
3.1 赤血球凝集と緩和周波数 f_c の関係.....	60
3.2 緩和周波数 f_c を用いた血液凝固反応過程における赤血球凝集速度.....	64
4. 流動中における血液凝固反応過程の緩和周波数 f_c 計測.....	76
4.1 実験装置.....	76
4.2 血液サンプル.....	76
4.3 実験条件.....	77
4.4 実験方法.....	77
4.5 実験結果及び考察.....	78
5. 結言.....	83
ステージ 2	
緒言(ステージ 2).....	87
ステージ【2-1】	
1. 研究目的.....	89
2. 理論.....	89
2.1. 積層電極内装型マイクロチャンネル.....	89
2.2. 電気インピーダンス・スペクトロスコピー (EIS) 法.....	90
3. EIS 法を用いた細胞の誘電特性計測.....	91
3.1. EIS 法を用いた静止場における細胞の誘電特性計測.....	91
3.2 EIS 法を用いた流動場における細胞の濃度計測.....	97
ステージ【2-2】	
1. 電気インピーダンス・トモグラフィー (EIT) 法.....	100
2. EIS 法を用いた細胞の誘電特性計測.....	109
2.1. シミュレーション.....	109
2.2. 積層電極内装型マイクロチャンネル内における EIT 法による細胞濃度計測.....	114
3. 結言.....	116
ステージ【2-3】	
1. 緒言.....	119
1.1. 研究目的.....	119
2. キャパシタンスと赤血球の関係.....	119
3. 血液流量変化実験.....	121
3.1. 血流量とキャパシタンス分布.....	121

3.2. 血液と球状微粒子サスペンションとの比較.....	126
4. 静止場中の血栓形成過程の計測.....	129
4.1. 実験目的.....	129
4.2. 実験装置と試料.....	129
4.3. 実験条件と方法.....	130
4.4. 実験結果と考察.....	130
5. 流動中の血栓形成過程の計測.....	131
5.1. 実験目的.....	131
5.2. 実験装置と試料.....	131
5.3. 実験条件と方法.....	132
5.4. 実験結果と考察.....	133
6. 結言.....	136
ステージ【2-4】	
1. 研究目的.....	139
2. 血栓計測.....	139
2.1 Cole-Cole 解析のプログラム	139
2.2. Hanai の式.....	141
2.3. 緩和周波数と赤血球の関係.....	143
3. 血液流量変化実験.....	145
3.1. 実験目的.....	145
3.2. 実験装置と試料.....	145
3.3. 実験条件と方法.....	147
3.4. 実験結果と考察.....	147
4. 流動中の血栓形成過程の計測.....	149
4.1. 実験目的.....	149
4.2. 実験装置と試料.....	149
4.3. 実験条件と方法.....	150
4.4. 実験結果と考察.....	150
5. 結言.....	155

ステージ 1

「微小血栓 4 D 可視化計測システムの構築」

達成目標	プロセス・スペクトロ・スコピー(PST)センサとその電気回路を開発し、各ハードウェアのアセンブルを行い、画像再構成アルゴリズム精度を従来法よりも 10%向上させる。そして、静止血液状態で実験を行い既知の血栓量などの実験条件に対する結果をデータベース化することを目標とする。
実施項目	研究内容および方法
【1-1】 ユニットのアセンブル	ネットワーク・アナライザに、マルチプレクサ・モジュールと制御用 PC をアセンブルし、可視化計測システムを完成させる。多周波数で PST 計測可能となるように同期をとる。
【1-2】 センサ開発	20 個の電極を備えた PST センサを製造する。電極間の超高速スイッチングと電位印加の同期を取る。
【1-3】 画像再構成アルゴリズム精度の向上	【1-1】 で開発したシステムをフィブリノゲン溶液に適用し緩和周波数 f を正確に求め、誘電容量変動 $\pm 1\text{pF}$ と抵抗変動 $\pm 3\text{m}\Omega$ で計測できるように調整する。その f を用いて、フィブリン量をパラメータとして、血栓ファントム画像を再構成する。
【1-4】 静的条件における実験	活性化凝固時間(ACT)値、ヘマトクリット値、粘度および血漿タンパク凝固因子の濃度を変えて、静止状態の動物新鮮血を用いて、他のタンパクの緩和周波数を考慮し、 【1-1】 で開発した可視化計測システムの精度の検証実験を行う。電場印加による血液、血栓の影響も考慮し、その影響を与えない計測条件を求める。
【1-5】 考察と総合討論	フィブリンを計測しているのか顕微鏡写真とも比較し、PST 法を総合的に討論する。

緒言 (ステージ 1)

人工心肺(CPB)、経皮的心肺補助 (PCPS)、体外膜型酸素化(ECMO)、左心・右心室補助 (LVAD, RVAD) などの体外循環が幅広く医療現場で用いられるようになった。人工心肺は虚血性心疾患や心臓弁膜症などの心疾患の手術の際に用いられる装置である。また経皮的な心肺装置は、急性期の心配補助に使用される人工心肺装置である。本邦で年間の経皮的な心配装置使用例は 700-800 に上っている。これらの装置は心臓と肺の機能を代行する役割があるため、主な構造として血液循環のためのポンプとチューブ構造、そして血液ガス交換装置である。従って、これらの体外循環装置を使用する上で、血液はチューブやポンプなどの人工物に接触することになり、血栓形成の問題が多く報告されている。基礎研究で材料や構造の改善により血栓形成の問題が改善されつつあるものの、未だにこれらの装置を使用する際、抗凝固治療法が行われている。血液の抗凝固治療とは、定期的に血液を取り出し、活性化全血凝固時間(ACT)、プロトロンビン時間(PT)や活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)などの血液凝固検査を行い、血液凝固能を測定し、抗凝固剤を投与することにより、血栓形成を防いでいる。しかし、抗凝固剤を投与することによる出血などの副作用の問題が多く報告されている。その原因は抗凝固剤の投与量及び投与タイミングがオフラインで行われる血液凝固検査結果による判断で、リアルタイムの血液凝固状態が反映されていないからである。そこで、血液抗凝固治療法を最適化するために、体外循環中つまり流動中の血液の凝固状態をリアルタイムでモニタリング必要がある。しかしながら、現在そのようなシステムが存在していない。



図 1 血栓形成後の人工心臓

これまで、オフライン血液凝固検査装置作成のために、静止状態で超音波、光や電気手法を用いて、血液凝固反応に関する研究が多く発表されている。Huang らは超音波を用いて、ブタ血液に塩化カルシウム溶液を添加し、血液凝固反応過程をモニタリングした結果、血栓形成による血液の液体状態から固体状態に変化によって、超音波後方散乱信号が安定することを発見した。また、Lim らは同じように、人血液に塩化カルシウムを添加し、光計測で血液凝固反応をモニタリングした結果、フィブリン形成により透過光強度が減少したことを発見した。しかしながら、これらの計測方法では、体外循環に生体適合性材料や、コーティングを用いた場合の応用が困難であることや、血栓と気泡の判別が困難であるといった問題点が存在する。

そこで、これらの代替となるモニタリング方法として、電気計測が挙げられる。電気計測のパラメータで一般的に用いられるのはインピーダンス Z 、誘電率 ϵ 、緩和周波数 f_c である。これらのパラメータを用いた研究結果が多く報告されている。Berney, Helen らがマイクロチップを用いてヘパリンで抗凝固された人血液凝固反応の電気インピーダンスモニタリングを行った。抗凝固が維持される血液とプロタミンで抗凝固が解消される血液の違いを示している。また、Lei らもマイクロチップで行った血液凝固反応実験結果を発表し、血液凝固によるインピーダンスが増加することを示した。次に誘電率の計測として、Hayashi らは血液凝固反応にある血液と抗凝固が維持される血液では、血液の比誘電率の変化が異なることを明らかとし、血液凝固反応において、比誘電率は増加すると結論付けた。しかし、朝倉らは血液凝固反応において血液の比誘電率を計測した結果、血液の比誘電率が減少することを示している。布施らが血液中の血栓体積及び血栓ヘマトクリット H (血液内の赤血球の体積割合)を変化させた場合における比誘電率変化を計測した結果、比誘電率と血栓の体積及びヘマトクリット H の比例的関係が確認できるのは 100kHz-600kHz の周波数帯だけである。このように、比誘電率を用いた計測では、比誘電率計測結果は計測周波数に依存する。これを克服するために、NGUYEN らは計測周波数に依存しない緩和周波数 f_c に着目し、血液凝固反応における緩和周波数 f_c の変化を明らかにし、血液凝固により緩和周波数 f_c が減少したことを明らかにしている。

しかし、流動中の血液凝固反応モニタリング結果は多く報告されていないのが現状である。これまで迫田らが光計測を用いた研究結果しか報告されていない。迫田らがフィブリノゲンの赤血球凝集及び血液凝固における役割に着目し、赤血球凝集速度変化を計測することで血液凝固反応をモニタリングできる可能性を示した。しかし、この結果は幼児用体外循環に使うチューブ上（直径サイズ：1/4inch）の計測で、成人に使用することができない。赤血球凝集の電気計測として、入交らが血液の流れを急に止め、赤血球凝集させ計測した結果、フィブリノゲンがある血液では、比誘電率が増加し、フィブリノゲンがない血液では変化がないことを示した。また、Oguz K. Baskurt らがシリンジポンプを使用した実

験で、赤血球凝集に伴いインピーダンス及びキャパシタンスが減少することを示した。しかし、赤血球凝集と緩和周波数 f_c の関係が明らかにされていない。また、血液凝固反応における緩和周波数 f_c を用いた赤血球凝速度の変化も明らかにされていない。

私達の研究室では、管内の液体及び固体による流動状態を非破壊で把握することができる CT (COMPUTED TOMOGRAPHY)、すなわちコンピュータ断層撮影を用いた研究が行われている¹⁾。CT は医療分野において特に目覚ましく発展してきており、対象物に対し外部より X 線などの可視光線を照射して多数の透過像を得ることにより、非破壊で内部の状態の可視化を可能にするものである。現在では、工業用パイプライン、産業機械、化学工業機器などの混相流機器等において、抵抗削減、物質輸送や物質混合の効率化、閉塞防止、挙動観察等の多くの観点から管内の混相流の流動状態を可視化する方法が多く取り入れられている。しかし、X 線を用いた CT は非常に高価であり大きいため最適な方法とは言い難い。そこで、一般的な産業に応用する場合に装置が安価で簡便なキャパシタンス、レジスタンス方式の CT が考えられるが、従来の技術では管内の粒子などの速度が速いものについては、時間解像度が非常に低く、その応用は非常に困難だった。

しかし、近年、管路内の混相流挙動を可視化する方法として、プロセス・トモグラフィ法が英国のマンチェスター工科大学 (UMIST) の研究グループによって研究されており、高い評価を受けている。この CT 法は、瞬時に管内の混相流の挙動を取得でき、X 線などによる CT に比べて安価であり、装置が簡便なキャパシタンス方式を採用したものである。

そこで、私たちはキャパシタンス方式の技術を応用し、レジスタンス方式による CT 法を提案する。

ステージ【1-1】【1-2】

【1-1】 ユニットのアSEMBル

【1-2】 センサ開発

1. 研究目的

プロセス・トモグラフィ法を用いて、人工心臓内における血栓等の赤血球濃度分布を可視化計測することを最終目的とし、そのための基礎実験として、血液が静止した時の血液、血栓、血漿の電気特性を計測するとともに、プロセス・トモグラフィ法を用いて赤血球沈降挙動を可視化しその詳細を考察することを目的とする。

2. 理論

2.1. 電氣的等価回路

基本理念は 1873 年に J.C.MAXWELL によって公表された伝導性の流体の中で分散した伝導性の球状のセルと透過な抵抗が公式されたものに基づいている。

抵抗 ρ_f の流体中で分散している半径 r 、抵抗 ρ_s の球体 N を考える。また、球体が図 2.1(A)で示されるような半径 R の球体で囲まれると仮定する。図 2.1(A)の中の組織は図 2.1(B)の中で示されるような抵抗 ρ_t の半径 R の 1 つの球によって表すことができ、 ρ_t は式(2.1)のように表される²⁾。

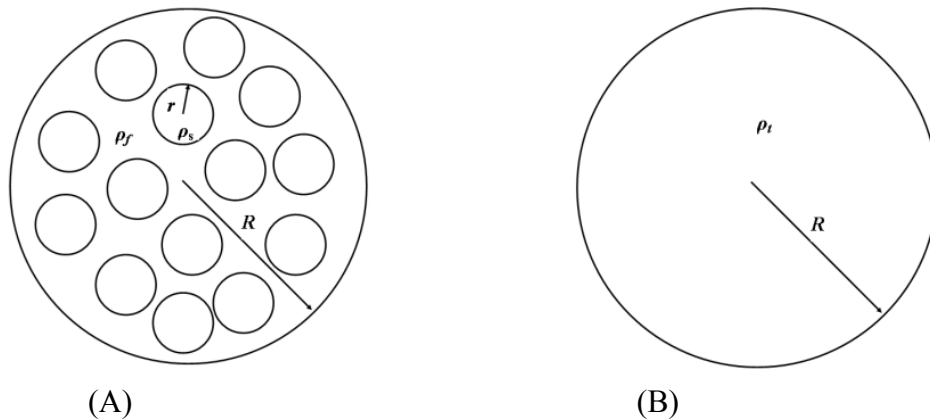


図 2.1 (A)は半径 r 、抵抗 ρ_s の球体 N が半径 R 、抵抗 ρ_f 中に分散したものであり、(B)は(A)の球体と電氣的に等価な半径 R 、抵抗 ρ_t の球体

$$\rho_t = \rho_f \frac{(1 - V_{con})\rho_f + (2 + V_{con})\rho_s}{(1 + 2V_{con})\rho_f + 2(1 - V_{con})\rho_s} \quad (2.1)$$

V_{con} は式(2.1)で半径 r の球体が半径 R の球体で囲まれた場合の半径 r の粒子の濃度を表したものであり、次式で表される。 $V_{con} =$

$$\frac{N \times \frac{4}{3}\pi r^3}{\frac{4}{3}\pi R^3} \quad (2.2)$$

この式は生物物理学研究の中で広く利用され、初期の時点では、このモデルはより小さな体積分率($V_{con} < 0.3$)のみで有効であると考えられていたが、有限要素法と同様に後の実験結果も、モデルが高濃度($V_{con} > 0.8$)にも有効であることを示した。

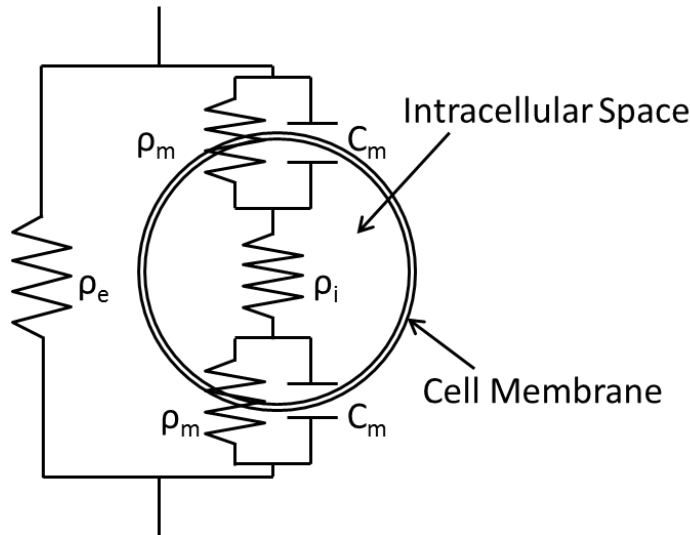


図 2.2 電氣的等価回路

図 2.2 では、血液において血球成分すなわち赤血球と液体成分である血漿にはこのような電氣的等価回路が成り立つ。このような等価回路において、赤血球の膜の抵抗が非常に高いために、一般的に低周波数では血漿のみ電流が流れるが、高周波になると赤血球の膜のキャパシタンス成分に電流が流れるため、赤血球の抵抗も考慮する必要がある。ここで、この電氣的等価回路のインピーダンスは以下のように表される。

$$Z^* = \rho_e \frac{(1 - V_{con})\rho_e + (2 + V_{con}) \left[\rho_i + \frac{Z_m^*}{r} \right]}{(1 + 2V_{con})\rho_e + 2(1 - V_{con}) \left[\rho_i + \frac{Z_m^*}{r} \right]} \quad (2.3)$$

式(2-3)の Z^* は、抵抗 ρ_e の N 個の球体におけるそれぞれの複雑なインピーダンスに等しい。 ρ_i は赤血球内部の抵抗である。また、 Z_m^* は赤血球の膜のインピーダンスを表す。 Z_m^* は式(2-4)を使用して決める。

$$Z_m^* = \rho_m - \frac{j}{2\pi f C_m} \quad (2.4)$$

2.2. レジスタンス CT

レジスタンス CT とは、図 2.3 に示すように円周上に等間隔に取り付けられた電極で、隣り合う電極をペア(1-2 等)にして電流を入力し、残りの隣り合う電極をペア(3-4、4-5、5-6、・・・15-16)にして電圧をリアルタイムスキャン測定する。得られたデータを元に断面全体の電気抵抗率の空間分布を計算し、断層画像(コンピュータトモグラフィ：CT)として表示するものである。レジスタンス CT の対象となる二相流は連続相としては高導電性物質(水などの液体)であり、拡散相としては抵抗物質(粒子などの液体)である。測定物理量は印可電流に対する電位であり、求める物理量は導電率分布である。

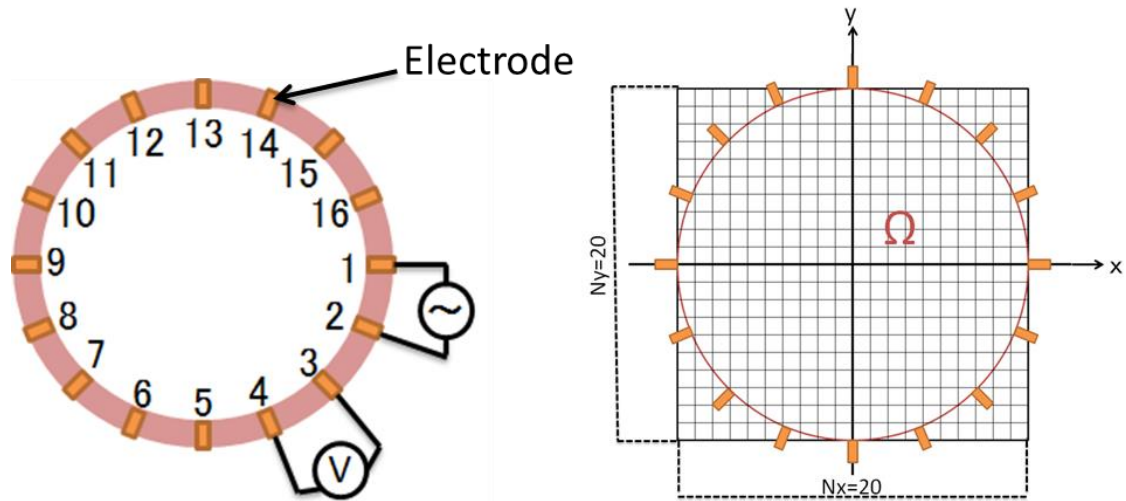


図 2.3 管路断面の電極配置とピクセル数

ここで、レジスタンス CT の画像再構成手法について説明する。電極間における電位 \mathbf{U} と抵抗率 ρ の間には以下の関係が存在する。

$$\mathbf{U} = \mathbf{J}\rho \quad (2.5)$$

ここで、電位 \mathbf{U} と抵抗率 ρ をつなぐものとして、ヤコビ関数 \mathbf{J} が存在する。このヤコビ関数は順問題から計算されたものである。式(2.3)において、測定値 \mathbf{U} と既知 \mathbf{J} から未知数 ρ を求める画像再構成過程は、式数よりも未知数の方が多く、 ρ の解が無限数存在してしまう不適切問題となるために逆問題を解くことによって抵抗率を算出した。本研究では、バックプロジェクション法を用いて近似的に二次元粒子分布を示す導電率画像を求める。そこで、順問題によって求めるヤコビ関数は式(2.6)のような形になる。

$$\mathbf{J} = \begin{pmatrix} \frac{\partial U_1^1}{\partial \rho_1} & \dots & \frac{\partial U_1^1}{\partial \rho_N} \\ \frac{\partial U_2^1}{\partial \rho_1} & \dots & \frac{\partial U_2^1}{\partial \rho_N} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial U_1^K}{\partial \rho_1} & \dots & \frac{\partial U_1^K}{\partial \rho_N} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial U_L^K}{\partial \rho_1} & \dots & \frac{\partial U_L^K}{\partial \rho_N} \end{pmatrix} \quad (2.6)$$

ここで、 K は電極の組み合わせ、 L は電極番号、 N は要素数を表す。

今回は、抵抗率分布を計算するために逆問題の手法について説明する。逆問題では、順問題で求めた電極上の電位と順問題で求めたヤコビ関数を用いて、管内の抵抗値を求める。抵抗率を求める際に、式(2.5)を成り立たせるとともに、式(2.6)の関係を成立させるために抵抗率の繰り返し計算を行い、管内の最適な抵抗率を算出する。

$$\text{MIN}_{\delta\rho} \|\delta V - J\delta\rho\| \quad (2.7)$$

この繰り返し計算に用いられる式はニュートンラプソン法の一般解であり、式(2.8)で表される。

$$\rho^{k+1} = \rho^k + (J^T J + \alpha I)^{-1} \{J^T (V - U(\rho))\} \quad (2.8)$$

ここで、 αI は正規化パラメータ、 V は算出された電位、 $U(\rho)$ は測定された電位である。

図 2.4 に逆問題のフローチャートを示す。

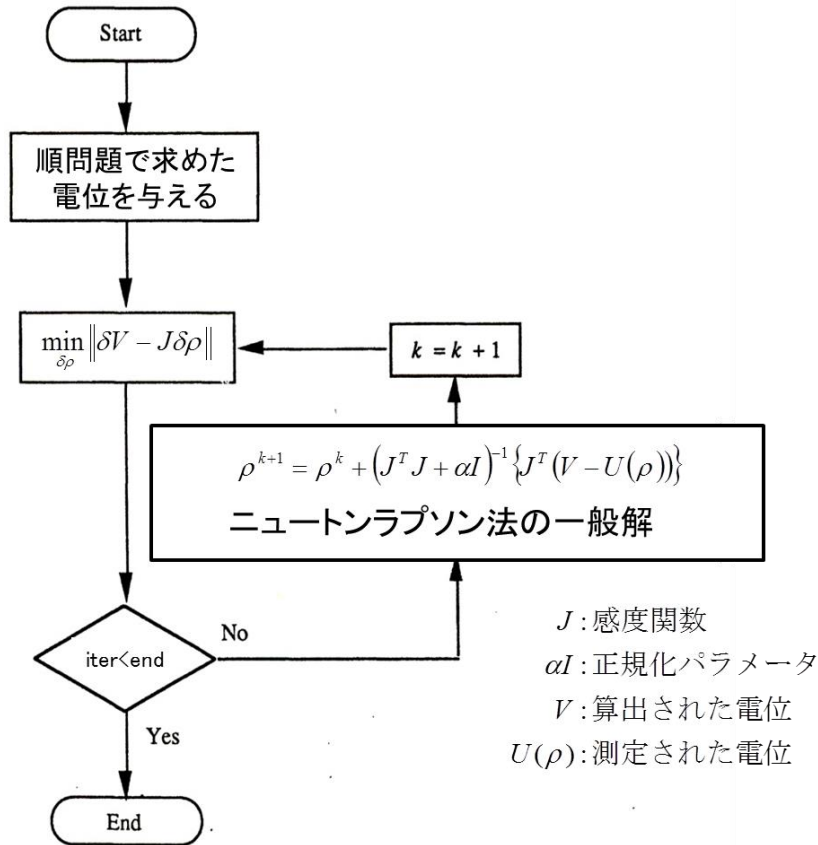


図 2.4 逆問題のフローチャート

2.3. 導電率とヘマトクリットの関係

FRICKE(1924)は均一な電界と均一な導電媒体中の均質の楕円体の懸濁液の導電率に関する理論を発展させた³⁾。この理論で場に平行な3本の軸のうちの本による楕円体で生じる電場の障害は3本の軸の各々によって計算される。ランダム配向に関する導電率は場に平行な異なる軸による導電率の平均値である。FRICKEの理論を血液に適用する際には、赤血球は短軸を長さA(対称軸)、2つの長軸は等しい長さBの扁平楕円体によって近似される。人間を含む大部分の種に関して、赤血球の導電率が血漿の導電率に比べて小さいとすると血液の導電率は、次式で表される。

$$\sigma_{bl} = \frac{\sigma_p}{1 + \frac{H}{100 - H} C} \quad (2.9)$$

ここで、 σ_{bl} は血液の導電率[S/M]、 σ_p は血漿の導電率[S/M]、 H はヘマトクリット値[%]、 C は定数であり、赤血球が低導電率の場合、 C は a/b の関数と電場による赤血球の配向の方向の分布によって決まる。赤血球がランダム配向の場合の C は a/b の関数だけによって決まる。平行配向に関する C は a/b の関数と電場に関する赤血球の方向の分布によって決まる。

ランダム配向 C_r に関する C は次式で示される。

$$C_r = \frac{1}{3}(C_a + 2C_b) \quad (2.10)$$

ここで、 C_a は場に平行な対称軸における赤血球の配向に関する C の値であり、 C_b は場に垂直な対称軸における配向に関する C の値である。 C_a と C_b は両方、パラメータ M の関数として表されることができる。そして、それは単に a/b で決定される。

$$C_a = \frac{1}{M} \quad (2.11)$$

$$C_b = \frac{1}{2 - M} \quad (2.12)$$

$$M = \frac{[\varphi - \text{SIN}(2\varphi)/2] \text{COS } \varphi}{\text{sin}^3 \varphi} \quad (2.13)$$

ここで、 $\text{COS}(\varphi) = a/b$ かつ $0 < a < b$ (FRICKE,1924)である。 M は $0(a/b = 0)$ と $2/3(a/b = 1)$ の間の値をとる。

3. 静的状態の血液の電気特性実験

3.1. 実験装置

実験装置を図 3.1 に示す。今回は、血液用の電極、AGILENT E4980A プレシジョン LCR メータ、PC を使用した。また、使用した AGILENT E4980A を図 3.2、血液用の電極を図 3.3 に示す。

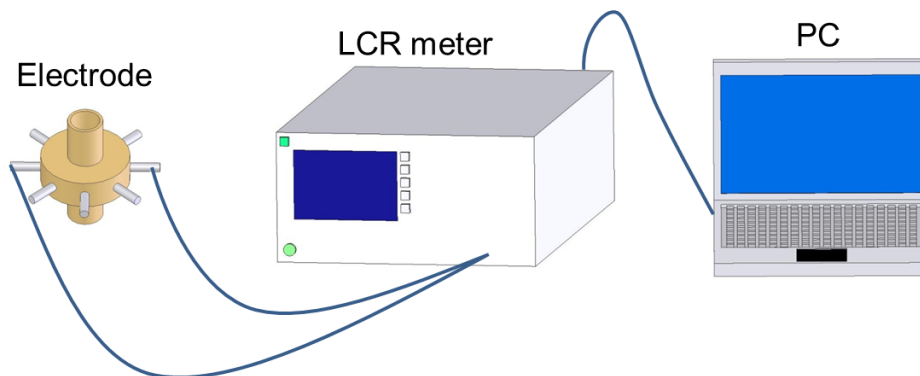


図 3.1 実験装置



図 3.2 AGILENT E4980A



図 3.3 血液用電極

今回用いた電極は直径(内径)10MM であり、電極は内部が直径 1MM、外部の LCR メータとの接続する部分は直径 3MM である。管路に対して電極が 8 個つけられている。

LCR メータは AGILENT 製の E4980A を使用した。E4980A は 20HZ~2MHZ のすべての周波数に対して優れた確度を備えており、USB(USB TMC)、LAN、GPIB インターフェイスから制御でき、GPIB で PC と接続することによって、低インピーダンスと高インピーダンスのどちらに対しても高速測定が可能であり、さらに他製品と比較して、5 倍以上の高速で測定することができる。今回 OPEN と SHORT 補正を行ってから 2MHZ までの測定を行っているが、ケーブルの保証周波数が 100KHZ であるために、100KHZ までは高精度で計測しているが、それより高周波数になると、寄生成分の影響により精度がかなり悪くなる。

3.2. 実験方法

血液の特性測定の実験方法

芝浦臓器(株)より購入した、前日に採取した血液 5 検体と産業技術総合研究所(以下産総研)より提供していただいた北海道産の 1 検体の合計 6 検体における血液の性質の測定として、溶血状況、フィブリノゲン濃度、ヘモグロビン濃度、粘度、ヘマトクリット値の 5 項目を産総研の装置によって計測を行った。

血液の抵抗測定の実験方法

まず、生理食塩水(SALINE)を 2ML と生理食塩水 1.8ML とトロンビン 0.2ML 加えたものの 2 種類の周波数をスイープさせてインピーダンス(20HZ から 2MHZ まで 10KHZ 間隔でスイープ、以下同様)を計測する。これは、血液を凝固させるためのトロンビンと呼ばれる液体そのものがインピーダンスに影響が存在するかを確認するためである。次に、血液 2ML を電極に充填し、インピーダンスを計測するのを 6 検体分行う。ただし、前の血液が残っていることを防ぐため、1 検体計測終了ごとに生理食塩水で十分に電極内部の洗浄を行う。また、芝浦臓器で購入した 1 検体と産総研より提供された 1 検体の血液に関しては、血液 1.8ML と生理食塩水 0.2ML を加えたものの周波数をスイープさせてインピーダンスの計測を行った。

血栓の抵抗測定の実験方法

3.3と同様に、血液 1.8ML にトロンビン 0.2ML を加え、1分経過後血液全体が血栓になったことを確認してから、周波数をスイープさせてインピーダンスの測定を 6 検体について行う。また、この測定についても、先ほどと同様に、1 検体終了ごとに生理食塩水で十分に電極内部の洗浄を行う。

血漿の抵抗測定の実験方法

遠心分離器を用いて、血液を血球と血漿に分離し、血漿を 6 検体について取り出す。取り出した血漿を電極に 2ML 充填し、周波数をスイープさせてインピーダンスを計測する。また、血漿 1.8ML に生理食塩水 0.2ML を加えたもののインピーダンスの計測も行った。

血漿凝固の抵抗測定の実験方法

血漿 1.8ML とトロンビン 0.2ML を加えたものを電極に充填し、周波数をスイープさせてインピーダンスを計測する。

血液凝固の時間変化の抵抗測定の実験方法

産総研より提供された血液 10ML に対して、塩化カルシウム 350 μ L を加えたものを作成し、そこから 2ML 取り出し、電極内に充填する。それを 1分経過ごとにインピーダンスを計測する。ただし、精度をよくするために、100KHZ で周波数を固定して測定を行う。

3.3. 実験結果

血液の特性測定結果

図 3.4 に血液 6 検体の溶血状況、図 3.5 にフィブリノゲン濃度、図 3.6 にヘモグロビン濃度、図 3.7 に粘度、図 3.8 にヘマトクリット値の実験結果を示す。

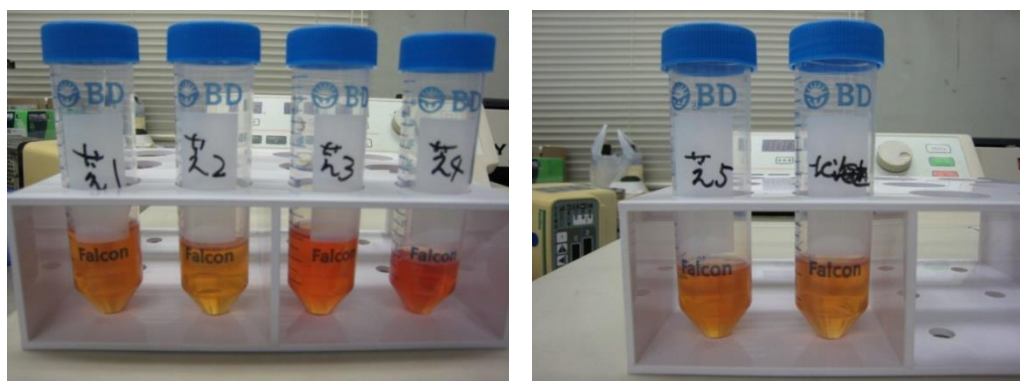


図 3.4 溶血状況

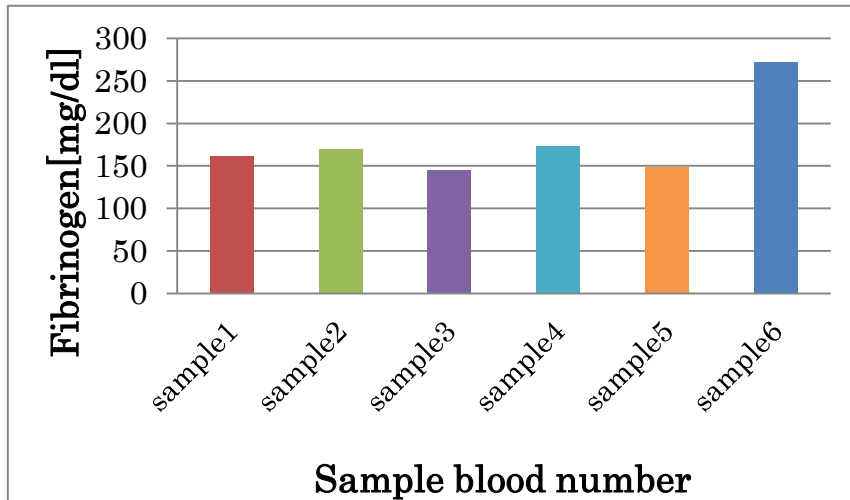


図 3.5 フィブリンゲン濃度

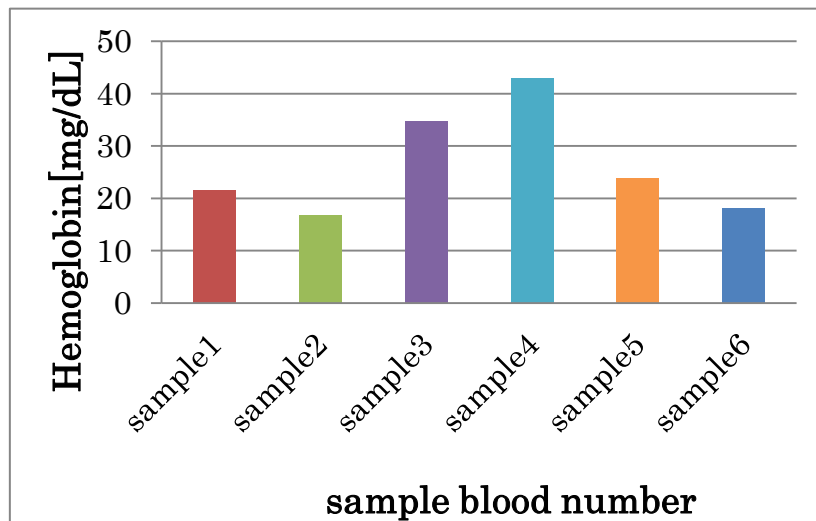


図 3.6 ヘモグロビン濃度

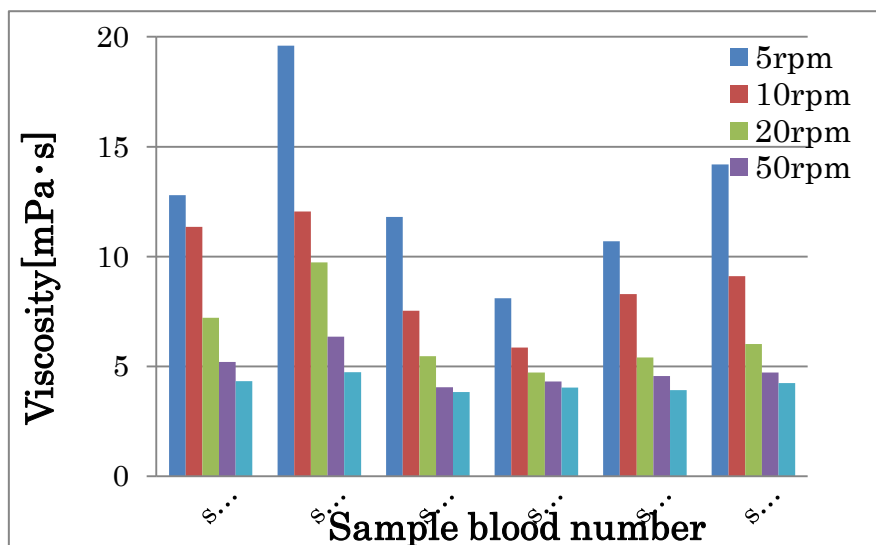


図 3.7 粘度

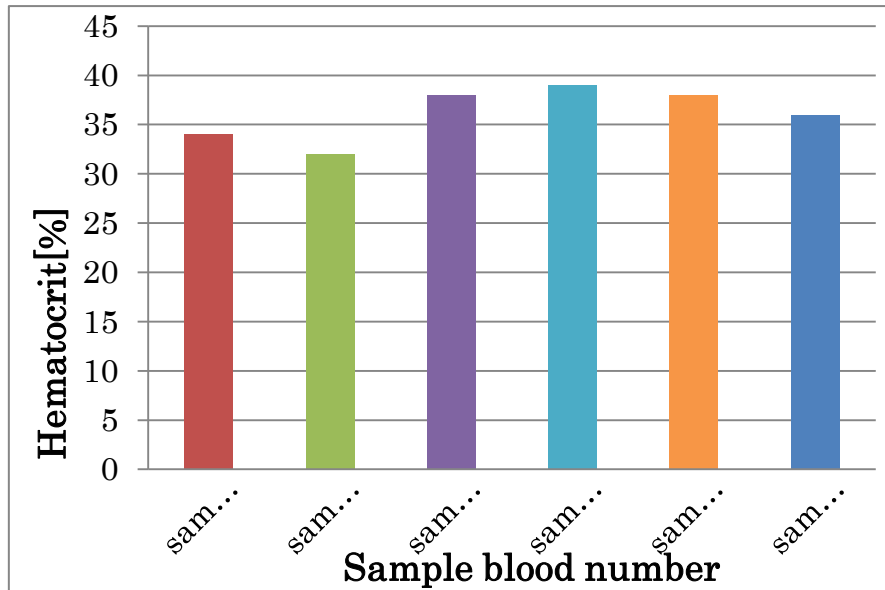


図 3.8 ヘマトクリット値

ここで、SAMPLE1 から SAMPLE5 までは、芝浦臓器より購入したウシの検体の血液を表し、SAMPLE6 は産総研で用意した北海道産の血液である。また、溶血に関しては芝 1 から芝 5 までは SAMPLE1 から SAMPLE5 に該当し、北海道は SAMPLE6 に該当する。

以上の結果から、図 3.4 から SAMPLE3 と SAMPLE4 において非常に溶血が進行していることが分かる。溶血が比較的少ない検体は SAMPLE2 と SAMPLE6 である。また、図 3.5 から血液を凝固させる因子であるフィブリノゲン濃度は SAMPLE1 から SAMPLE5 まではほとんど同じ値を示しているが、SAMPLE6 は非常に高い数値を示している。図 3.6 のヘモグロビン濃度は SAMPLE3 と SAMPLE4 が非常に高いことが分かる。これは、溶血状況がひどい 2 検体と一致するため、溶血がひどい検体ほど濃度が高いと考えられる。図 3.7 の粘度に関しては回転粘度計を用いて粘度を算出しているため、回転数によって粘度が異なる。しかし、一般的に用いられる回転粘度計の粘度は 100RPM での粘度である。この粘度の結果から、SAMPLE2 の粘度は非常に高いが SAMPLE4 の粘度は低い。すなわち、ヘモグロビン濃度が高いほど粘度が低いという傾向がみられる。図 3.8 のヘマトクリット値の結果から、32%から 39%までの範囲であることが分かる。このことから、ほぼ一定のヘマトクリットであることが分かる。

血液の抵抗測定結果

図 3.9 に生理食塩水と生理食塩水とトロンビンを加えたものに関する 10KHZ から 2MHZ までスイープさせたときのインピーダンスを示す。また、10KHZ から 100KHZ までのインピーダンス結果も図 3.10 に示す。図 3.11 に血液 6 検体の 10KHZ から 2MHZ までスイープさせたときの抵抗インピーダンスを示し、図 3.10 に 10KHZ から 100KHZ までのインピーダンスを示す。これは、ケーブルの精度が 100KHZ までであるため、誤差のほとんどない

データが 100KHZ までである。図 3.12 にレジスタンス、図 3.13 にリアクタンスの 10KHZ から 2MHZ までの結果を示す。

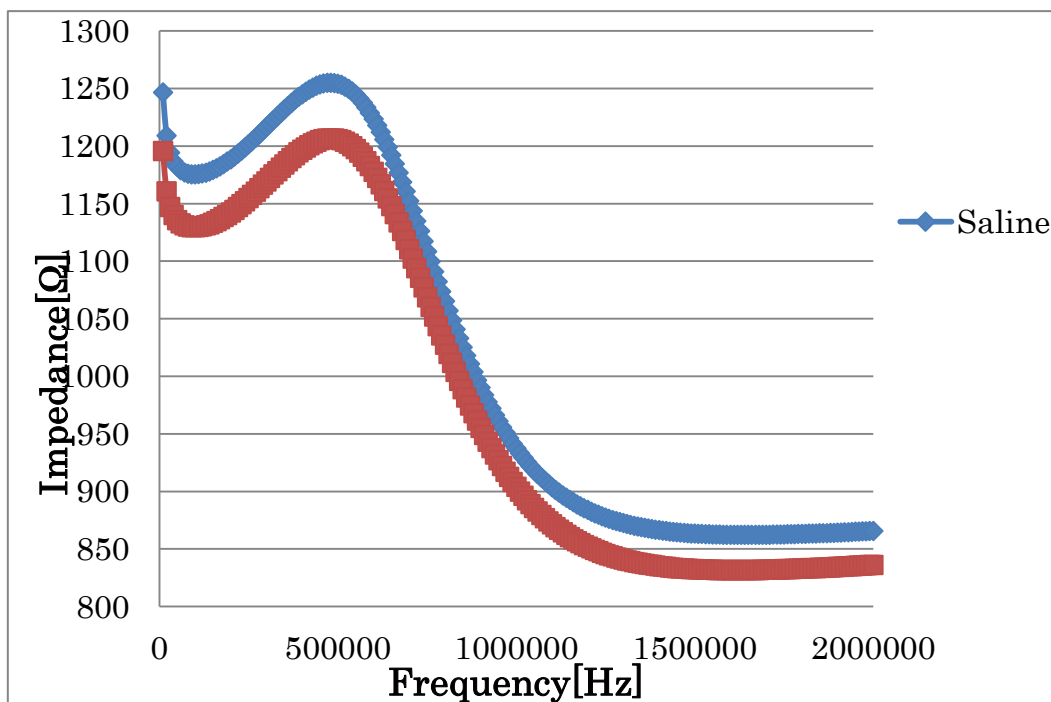


図 3.9 生理食塩水と生理食塩水とトロンビンのインピーダンス比較

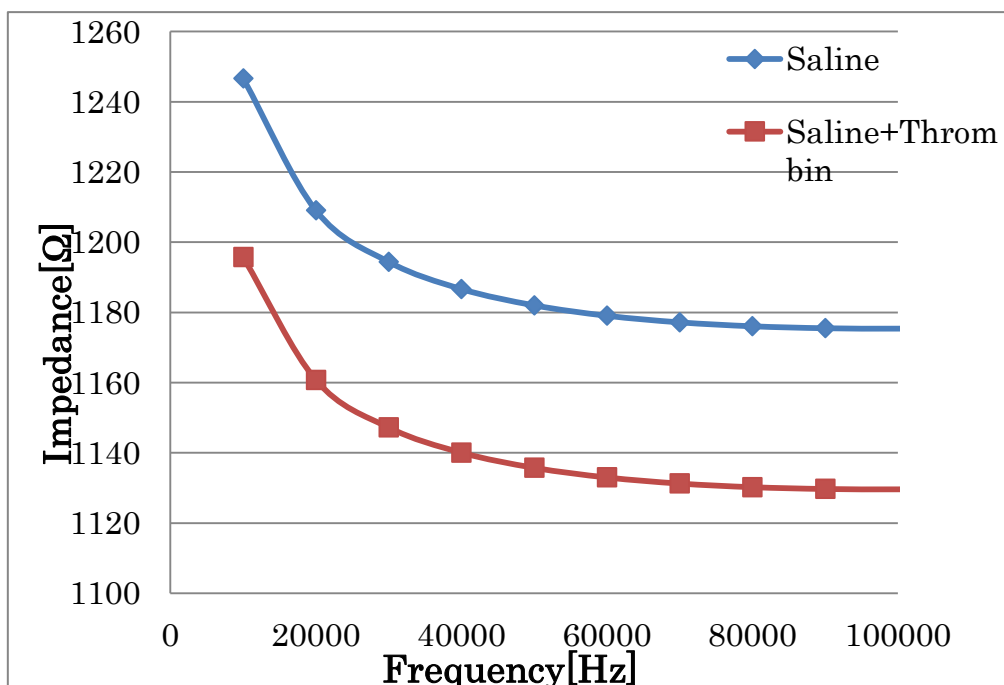


図 3.10 10KHZ から 100KHZ までの生理食塩水と生理食塩水とトロンビンのインピーダンス比較

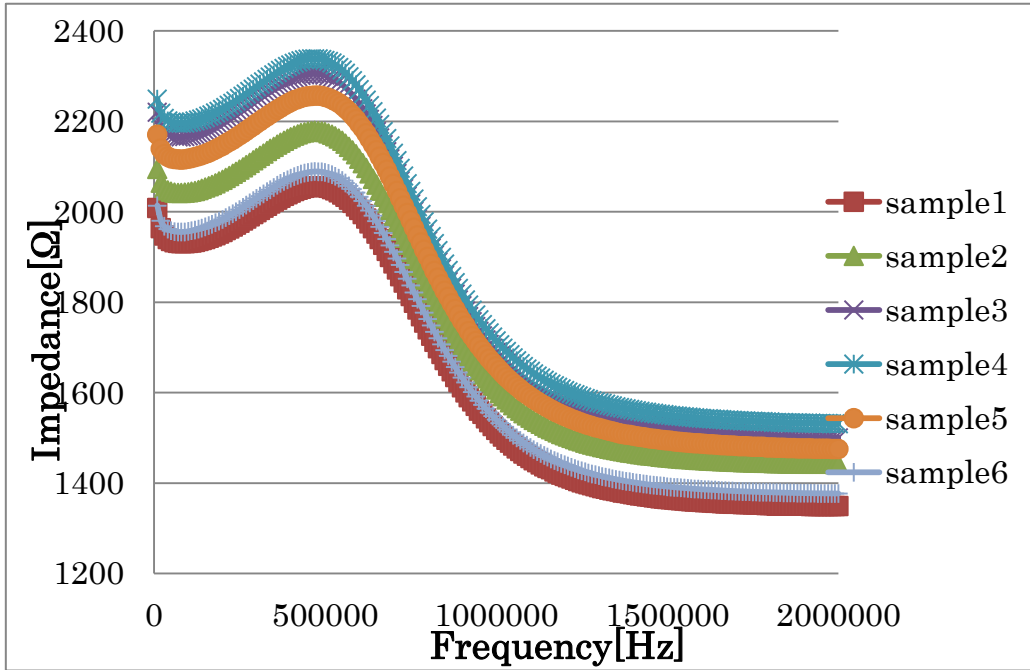


図 3.11 血液 6 検体のインピーダンス比較

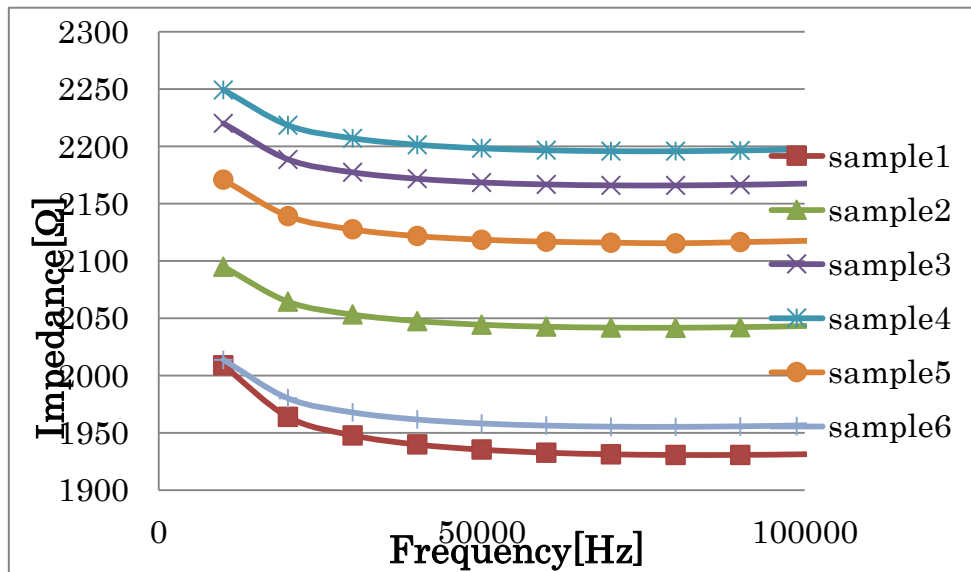


図 3.12 10KHZ から 100KHZ までの血液のインピーダンス比較

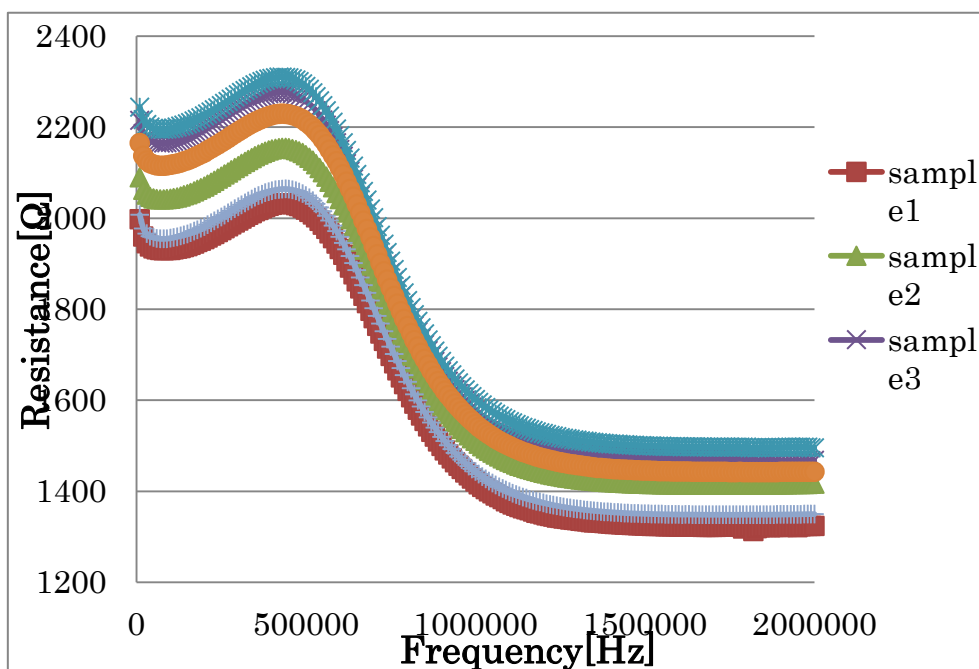


図 3.13 血液 6 検体のレジスタンス比較

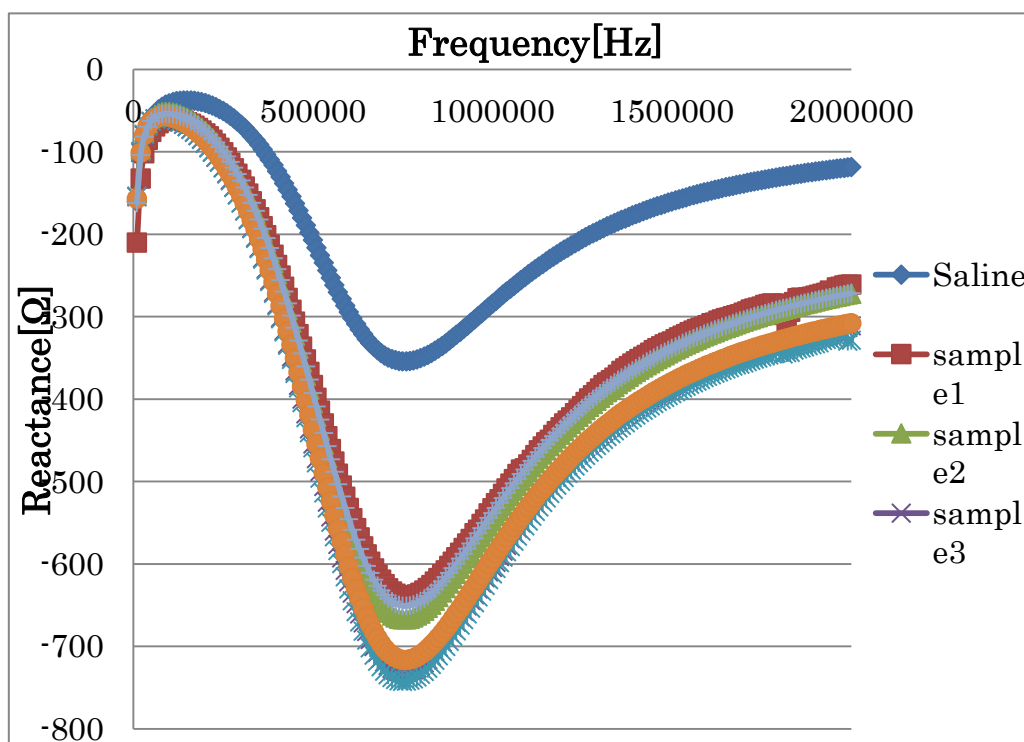


図 3.14 血液 6 検体のリアクタンス比較

以上の結果から、図 3.9、図 3.10 から、トロンビン添加によるインピーダンスの変化に関しては、トロンビンを添加することによって、インピーダンスが約 45Ω 減少することが分かった。また、図 3.11 と図 3.12 から生理食塩水よりも血液においてインピーダンスが約 800Ω 高いことが分かった。また、血液 6 検体の抵抗において約 250Ω 差があることについては、溶血による血漿にヘモグロビンが出ていることや検体によってヘマトクリットが違

うことによって変化していると考えられる。図 3.13 のリアクタンス結果から約 80KHZ まではリアクタンスが減少していることからキャパシタンスの影響が出ており、80KHZ 以降はインダクタンス(コイル)の影響が出ていると考えられる。

血栓の抵抗測定結果

図 3.15 に血栓形成したときのインピーダンス、図 3.16 にレジスタンスを示す。また、3.1.2 のように精度の問題から 10KHZ から 100KHZ までのインピーダンスの結果も図 3.17 に示す。また、血液に生理食塩水を添加にしたもののインピーダンスを図 3.18 に示し、SAMPLE5、SAMPLE6 において血液、血液+生理食塩水、血栓(血液+トロンビン)の比較結果についてもそれぞれ図 3.19、図 3.20 に示す。また、100KHZ までの結果をそれぞれ図 3.21、図 3.22 に示す。

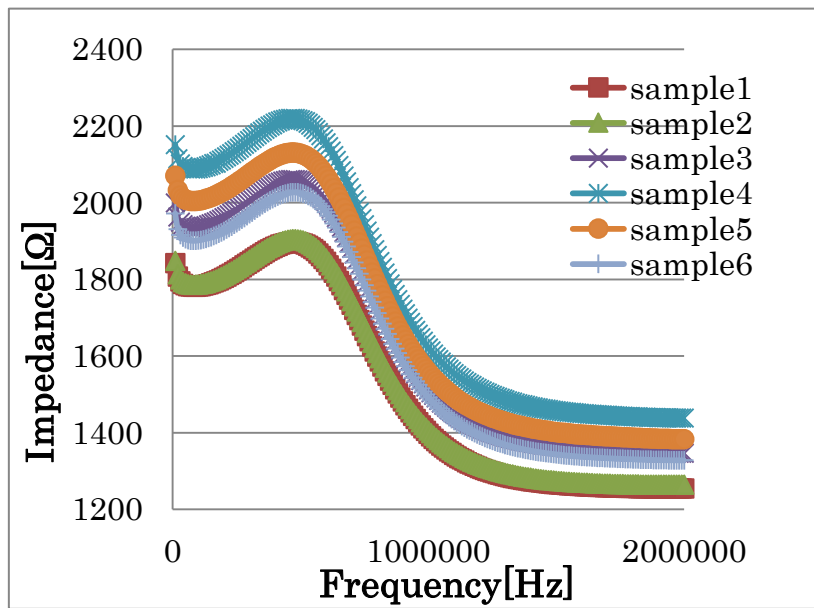


図 3.15 血液 6 検体の血栓時におけるインピーダンス比較

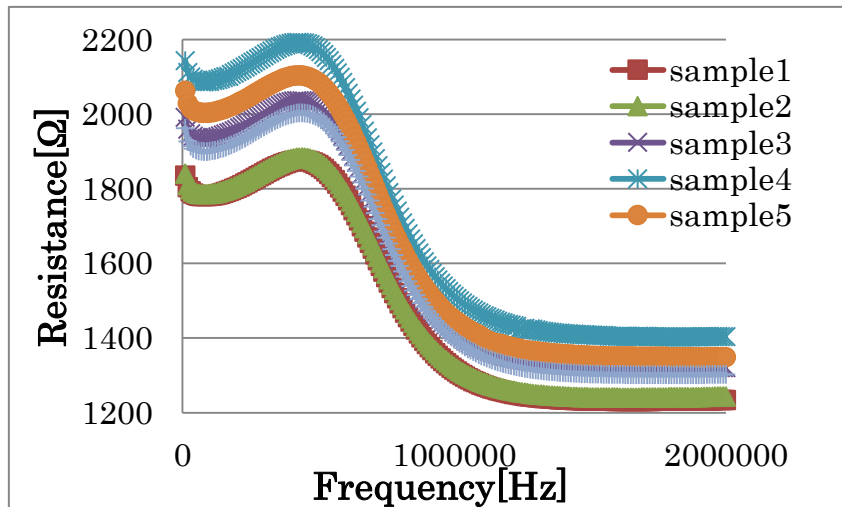


図 3.16 血液 6 検体の血栓時におけるレジスタンス比較

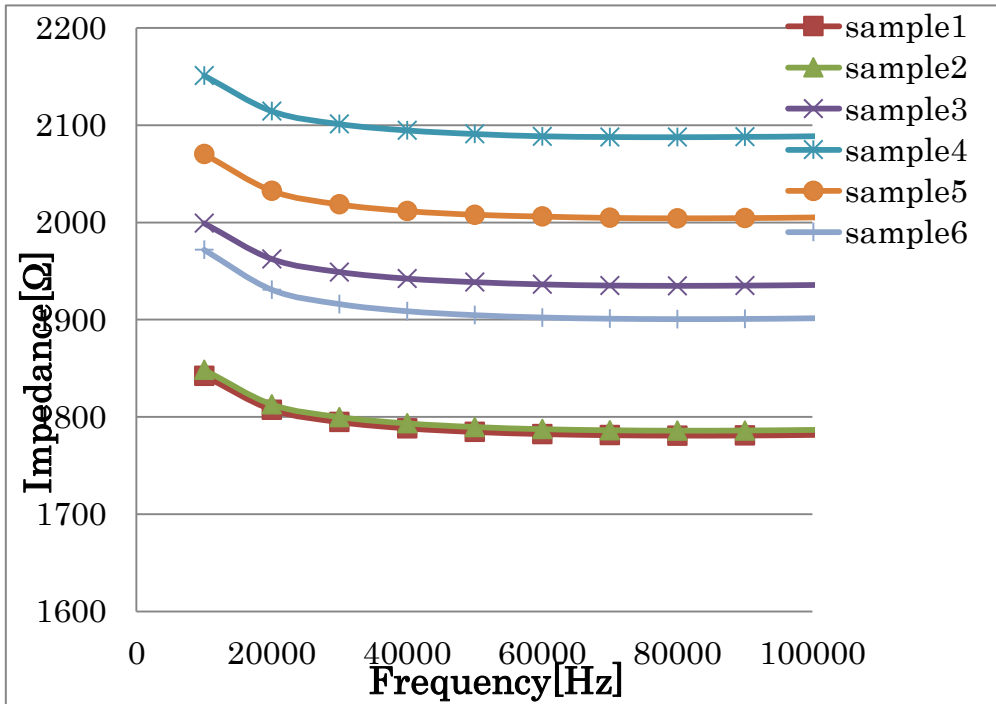


図 3.17 10KHZ から 100KHZ までの血栓時におけるインピーダンス比較

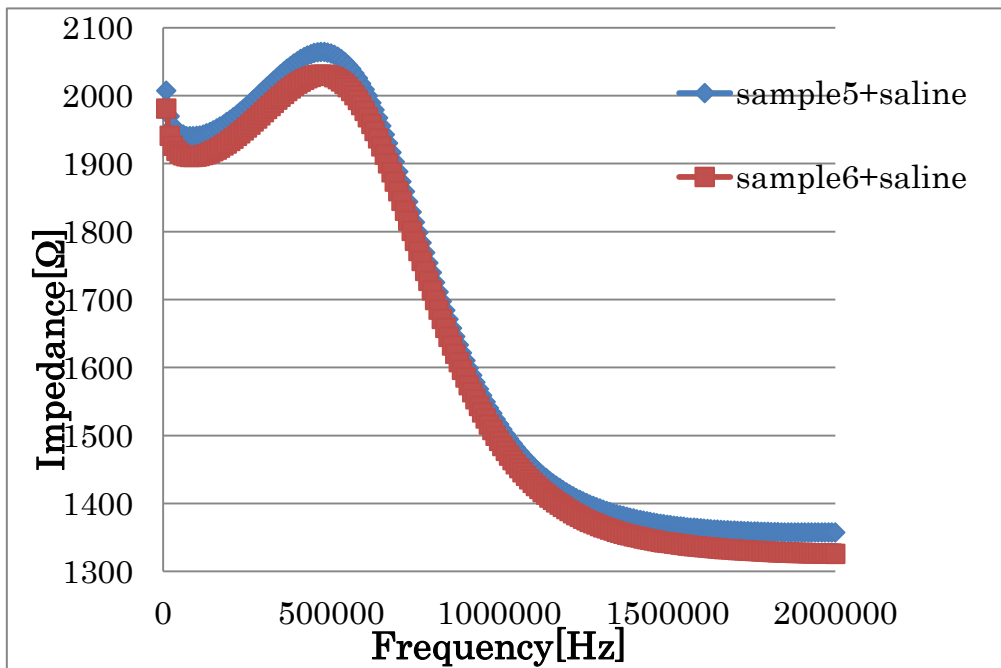


図 3.18 血液に生理食塩水を添加した場合のインピーダンス

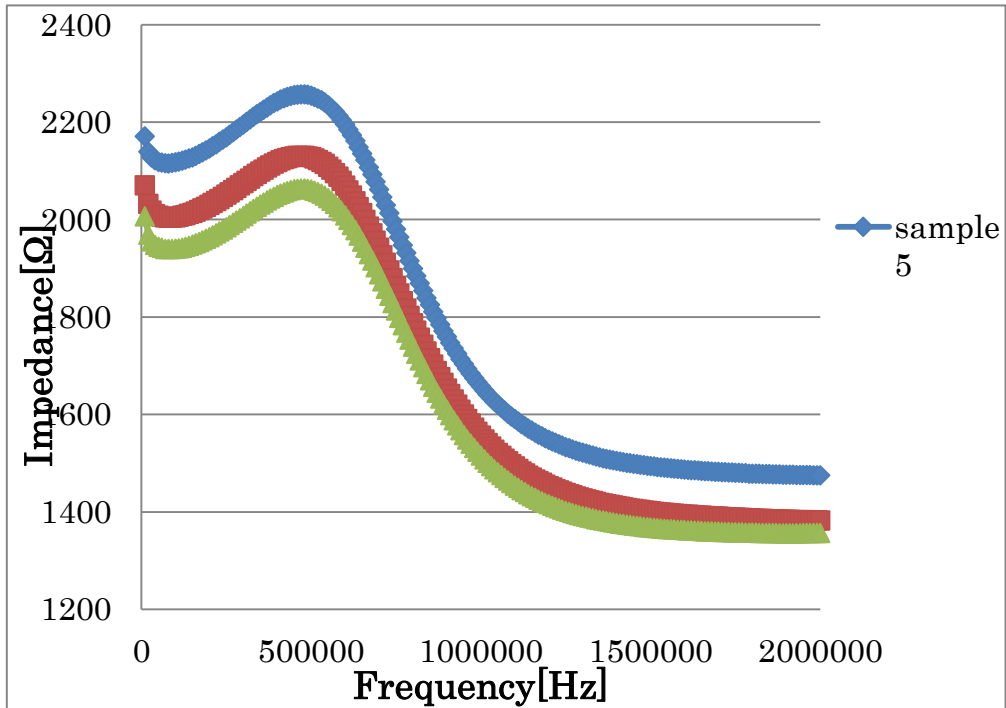


図 3.19 SAMPLE5 の血液と血栓と血液+生理食塩水のインピーダンス

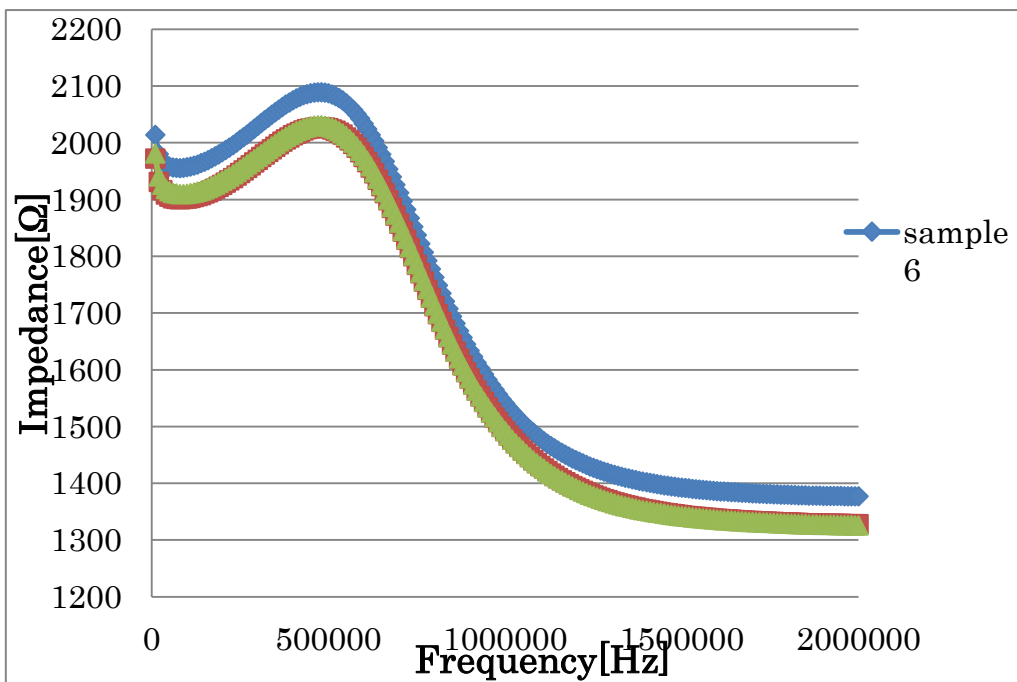


図 3.20 SAMPLE6 の血液と血栓と血液+生理食塩水のインピーダンス

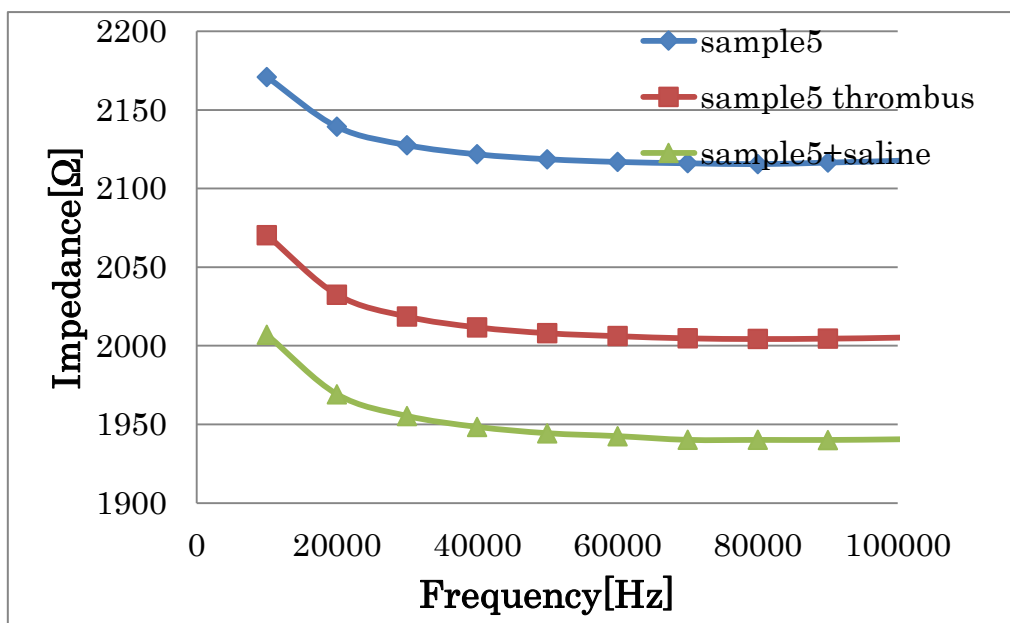


図 3.21 SAMPLE5 の 10KHZ から 100KHZ までにおける血液と血栓と血液+生理食塩水のインピーダンス

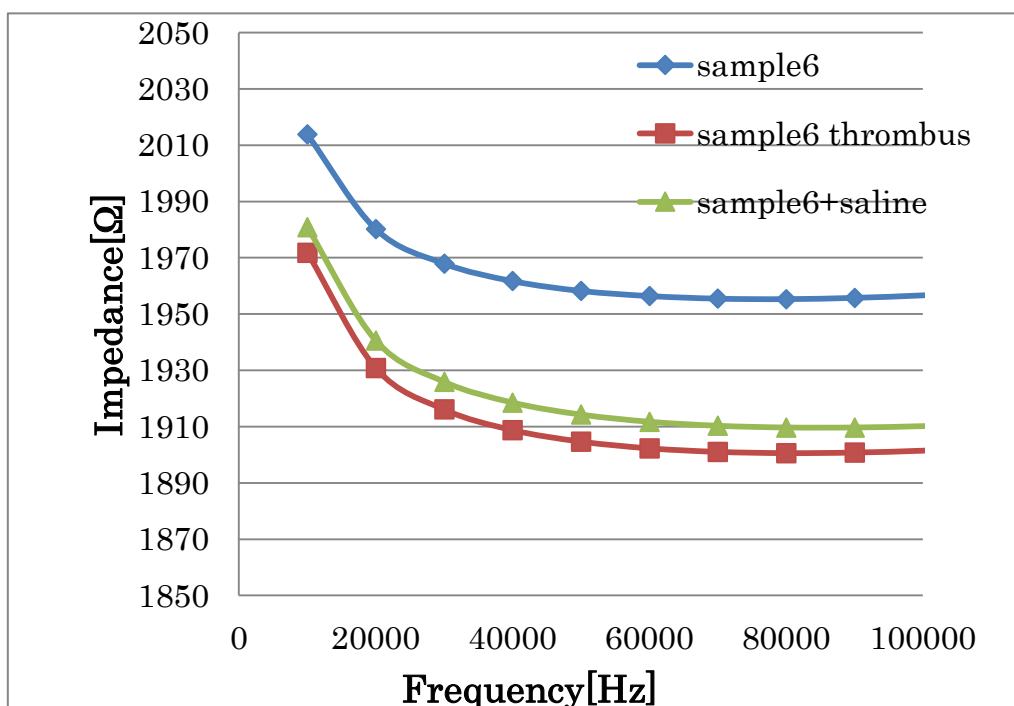


図 3.22 SAMPLE6 の 10KHZ から 100KHZ までにおける血液と血栓と血液+生理食塩水のインピーダンス

以上の結果から、血栓が形成されると血液そのもののインピーダンスに比べて、インピーダンスが約 100 Ω 低下することがわかる。これは、血液を計測した時は電極に 2ML 充填し、血栓のときは血液 1.8ML にトロンビン 0.2ML 添加している。すなわち、このトロンビン 0.2ML 分のヘマトクリットの低下がインピーダンスを低下させていると考えられる。し

かし、血栓(血液+トロンビン)と血液+生理食塩水を比較すなわち、ヘマトクリット値を一定として比較すると、血栓の方がインピーダンスが高いことが分かる。

しかし、この結果は血液 2.0ML と血液 1.8ML+THROMBIN0.2ML では血液の濃度が異なる。同様に血液+生理食塩水でも濃度や 0.2ML 分のトロンビンと生理食塩水のインピーダンスの差を考慮しなくてはならない。すなわち、血液濃度を一定にする、すなわち血液+生理食塩水のインピーダンスと血液+トロンビンで比較する。ここで、トロンビンと生理食塩水のインピーダンスの基準を固定して比較しなければいけないと考えられる。

まず、生理食塩水のインピーダンスから生理食塩水+トロンビンのインピーダンスの差分をとることによって、トロンビンと生理食塩水のインピーダンスの差が分かる。これから、血液+トロンビンのインピーダンスから(トロンビン-生理食塩水)のインピーダンスを引くことによって、トロンビンのインピーダンスを生理食塩水のインピーダンスにすることができる。したがって、血液+生理食塩水と血液+トロンビンにおける純粋な血液と血液凝固のインピーダンスを比較することができる。

次に、SAMPLE5 と SAMPLE6 における純粋な血液と血栓に関するインピーダンスの結果をそれぞれ図 3.23、3.24 に示す。ただし、周波数は 10KHZ から 100KHZ までの結果とする。

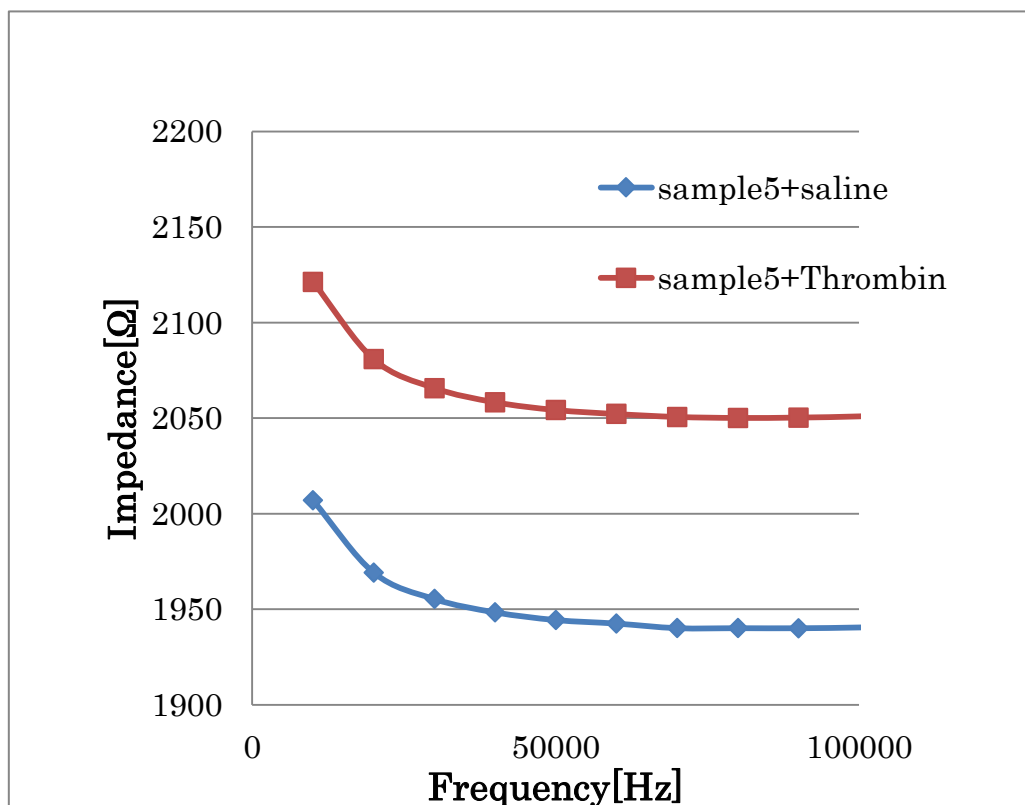


図 3.23 SAMPLE5 における血液と血栓のインピーダンス比較

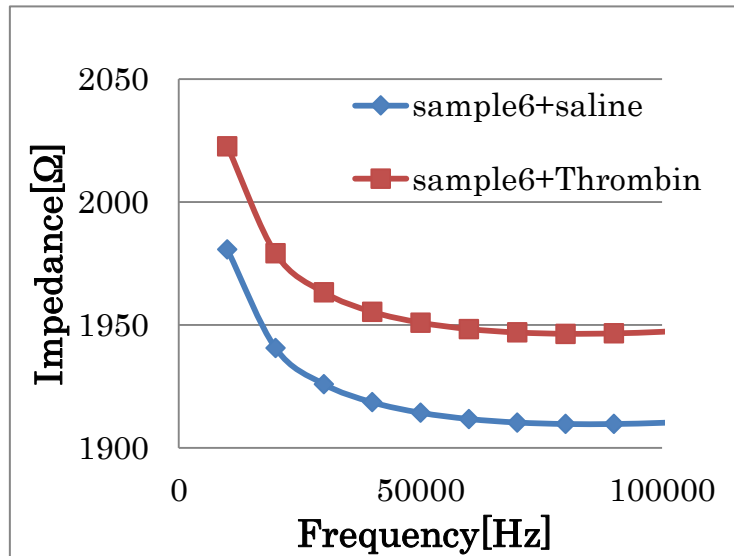


図 3.24 SAMPLE6 における血液と血栓のインピーダンス比較

図 3.23 と図 3.24 の結果から、トロンビンと生理食塩水の基準を一定にして、且つ赤血球濃度も固定にした場合の血液と血栓のインピーダンスの比較から、SAMPLE5 で血栓の方が血液よりもインピーダンスが約 100 Ω 高く、SAMPLE6 で血栓の方が血液よりもインピーダンスが約 40 Ω 高いことが分かる。図 3.21 と図 3.22 では血液の方が血栓よりもインピーダンスが高いことから、この結果による比較の方が正確であると考えられる。

血漿の抵抗測定結果

図 3.25 に血漿のみを取り出した場合の 10KHZ から 2MHZ までのインピーダンス結果を示し、図 3.26 にレジスタンス結果を示す。また、血漿の 10KHZ から 100KHZ までのインピーダンス結果を図 3.27 に示す。また、血液+生理食塩水の 2MHZ までのインピーダンス結果を図 3.28 に示し、100KHZ までの結果も図 3.29 に示す。

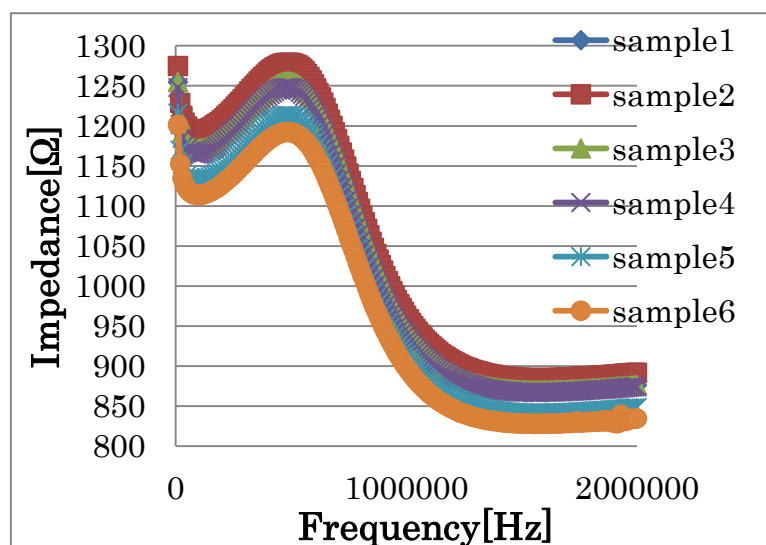


図 3.25 血液 6 検体の血漿のインピーダンス

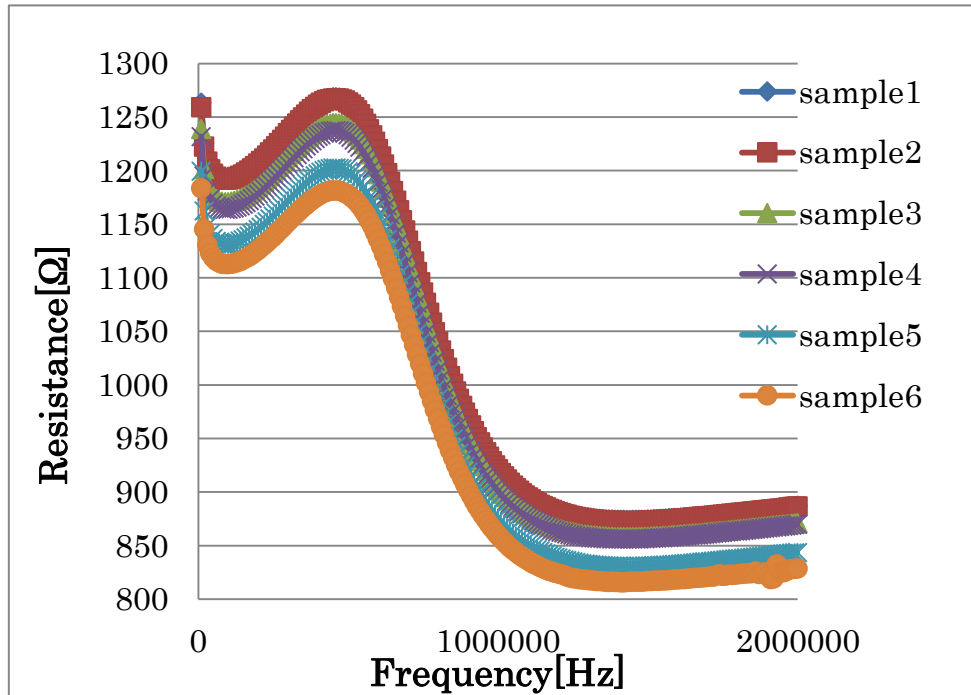


図 3.26 血液 6 検体の血漿のレジスタンス

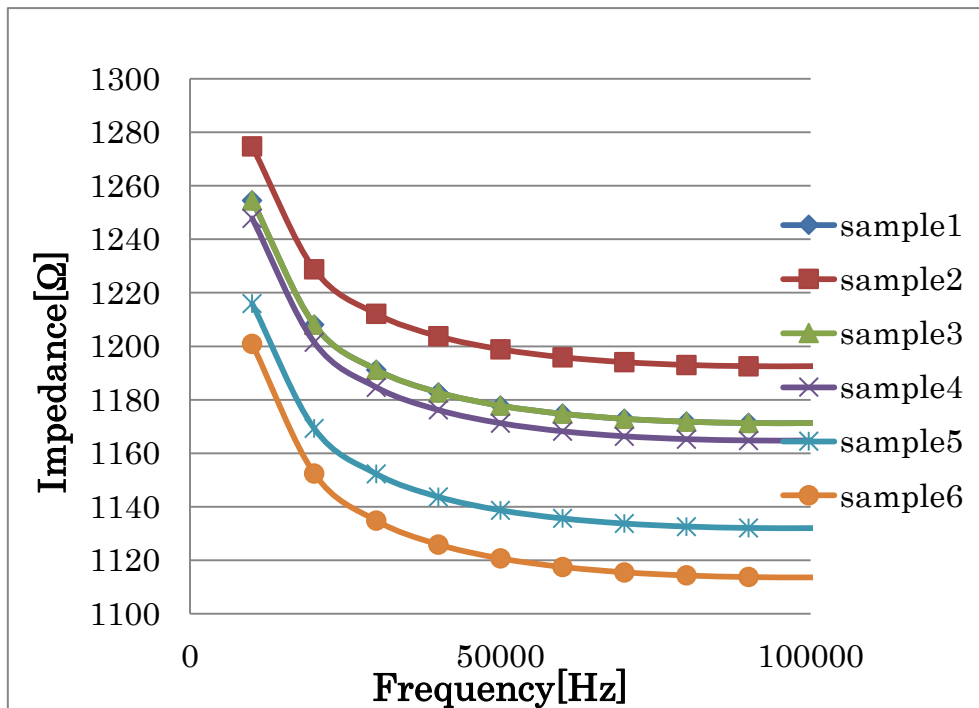


図 3.27 10KHZ から 100KHZ までの血液 6 検体の血漿のインピーダンス

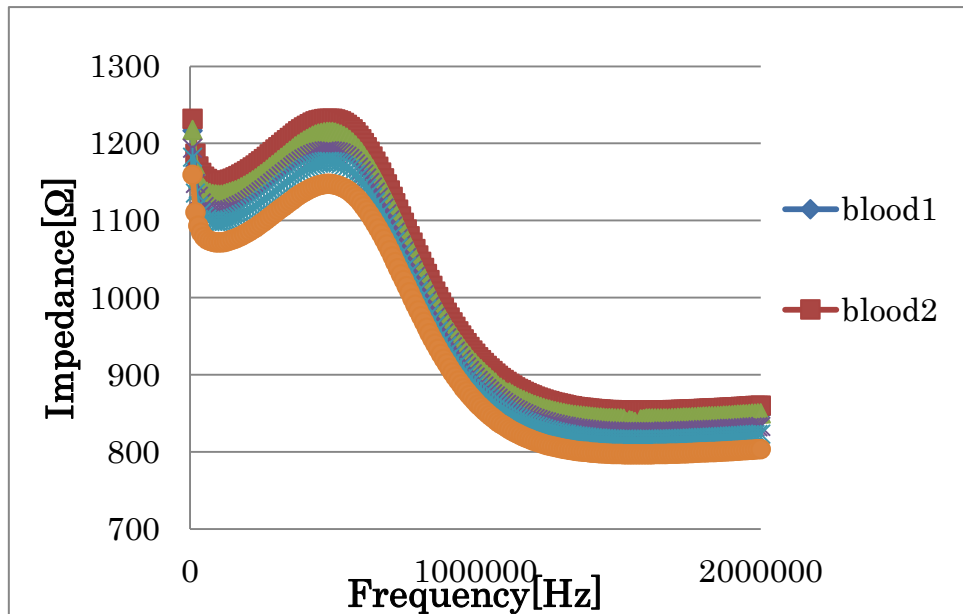


図 3.28 血漿+生理食塩水のインピーダンス

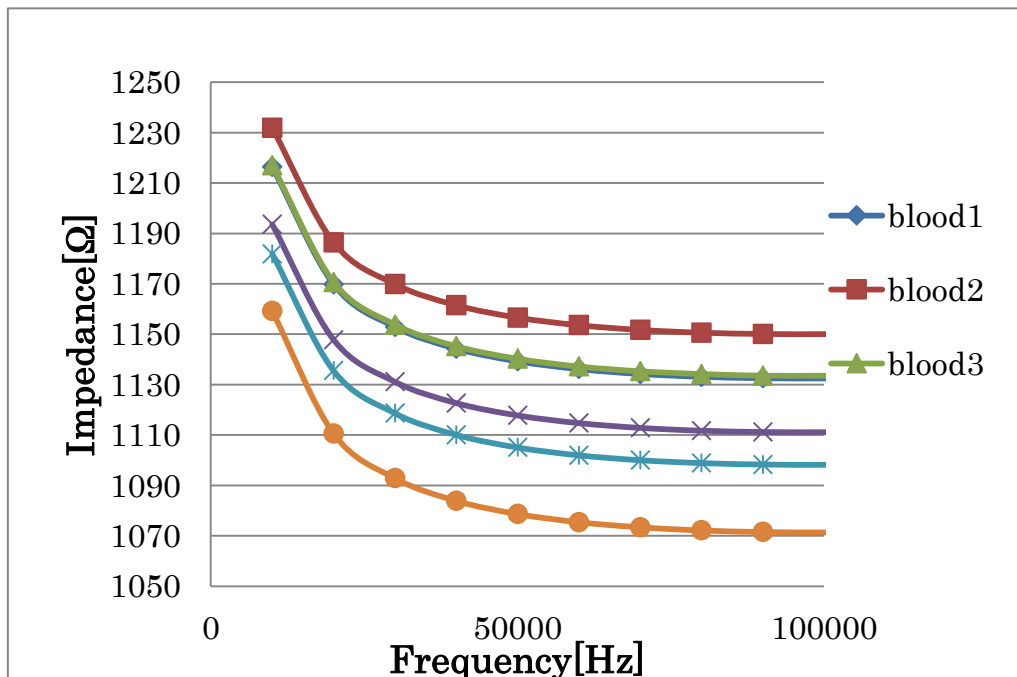


図 3.29 10KHZ から 100KHZ における血漿+生理食塩水のインピーダンス

以上の結果から、血漿のインピーダンスは血液と比較して約 800Ω 、血栓と比較して 700Ω 小さいことが分かる。すなわち、このことから、ヘマトクリット 35%前後における赤血球などの血球が占めるインピーダンスは約 -2600Ω であると考えられる。これは、赤血球のインピーダンスのほとんどが膜のキャパシタンスであるためであると考えられる。キャパシタンスは負のベクトルで表されるので、赤血球のインピーダンスを計算するとマイナスの値になる。

血漿凝固の抵抗測定結果

図 3.30 に血漿が凝固した場合のインピーダンスを示し、図 3.31 にレジスタンスの結果を示す。また、図 3.32 に 10kHz から 100kHz までのインピーダンスを示す。また、sample5 と sample6 について、血漿と血漿+生理食塩水、血漿+トロンビン(血漿凝固)のときのインピーダンス比較をそれぞれ図 3.33 と図 3.34 に示す。ただし、図 3.33 と図 3.34 については 10kHz から 100kHz までの周波数における結果とする。

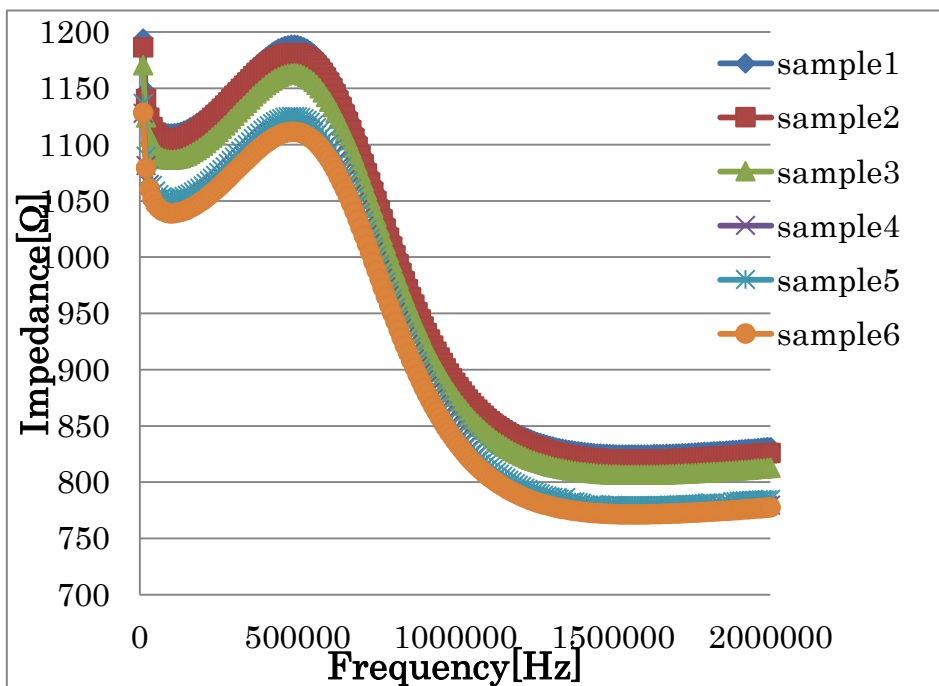


図 3.30 血漿凝固のインピーダンス

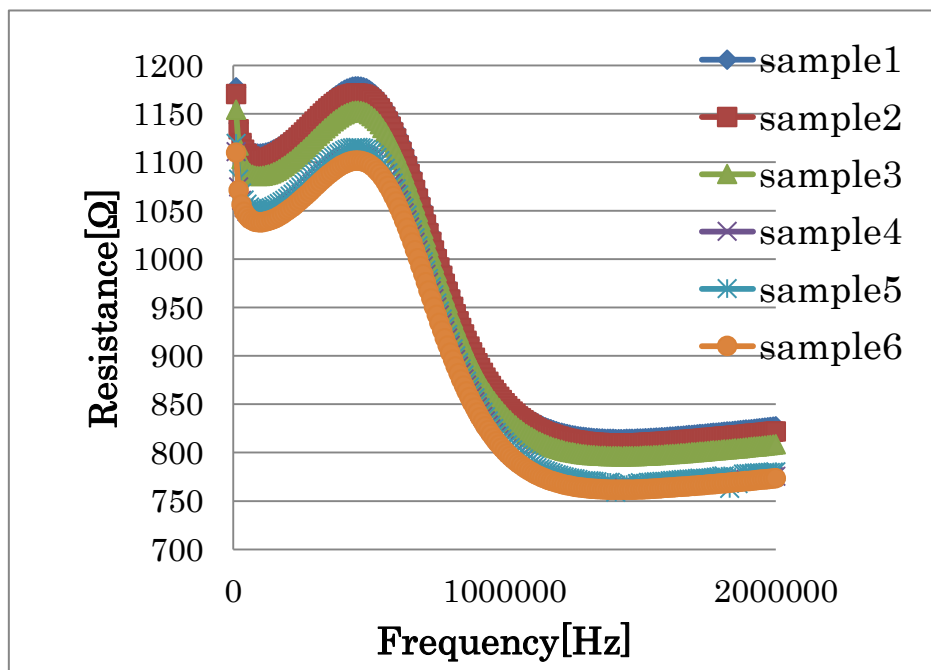


図 3.31 血漿凝固のレジスタンス

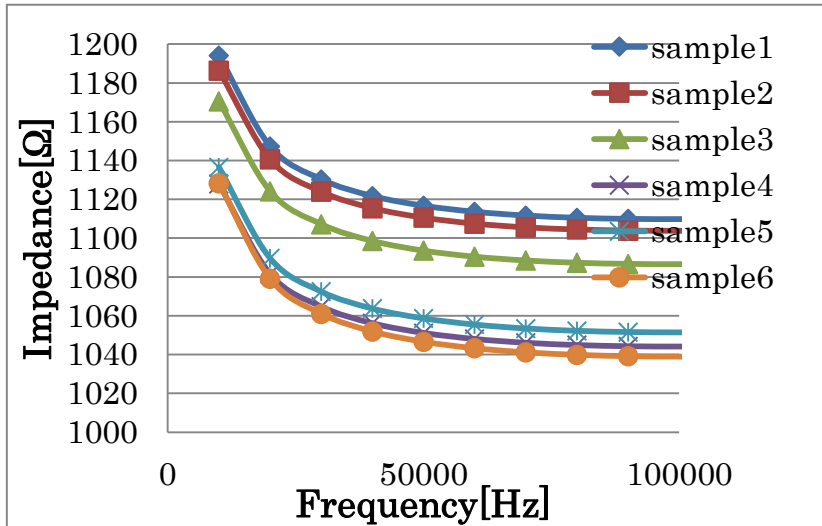


図 3.32 10kHz から 100kHz までの血漿凝固のインピーダンス

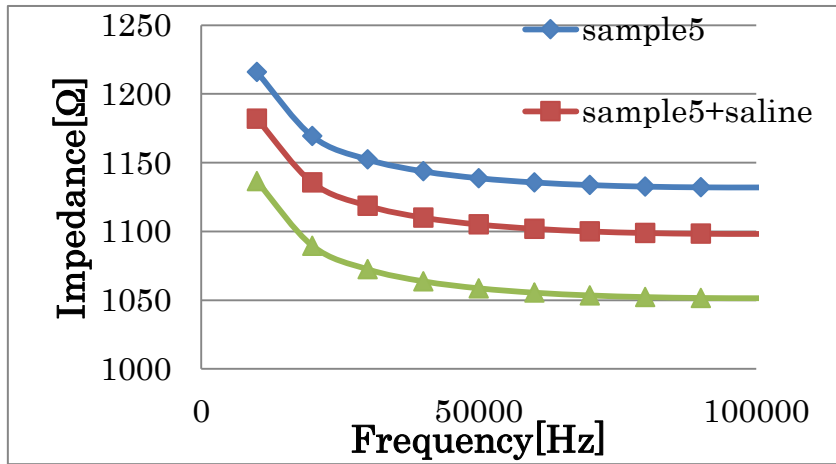


図 3.33 10kHz から 100kHz までの sample5 における血漿と血漿+生理食塩水と血漿凝固のインピーダンス比較

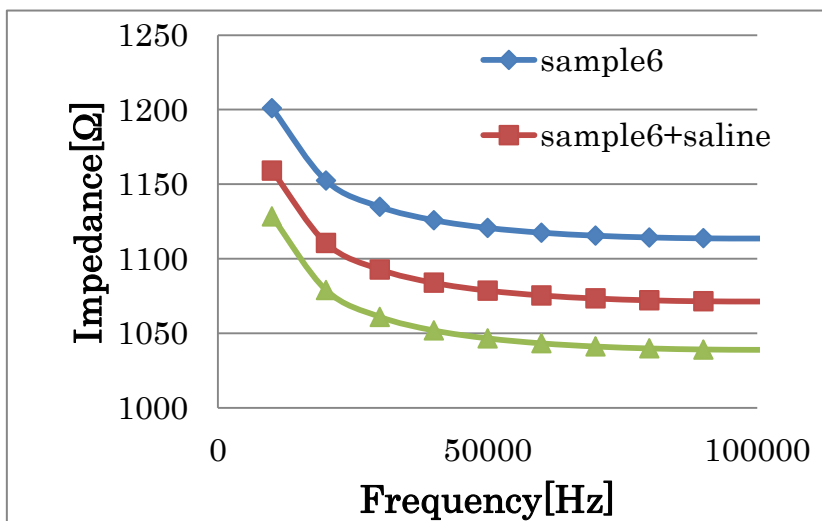


図 3.34 10kHz から 100kHz までの sample6 における血漿と血漿+生理食塩水と血漿凝固のインピーダンス比較

以上の結果から、血漿のインピーダンスと比較して血漿凝固のインピーダンスは約 $80\ \Omega$ 減少することが確認できた。また、sample5 と sample6 において、血漿と血漿+生理食塩水、血漿凝固におけるインピーダンスを比較すると、血漿のみ、血漿+生理食塩水、血漿凝固の順でインピーダンスが高いことが分かる。しかし、血漿 2.0mL と血漿 1.8mL+Thrombin0.2mL では血漿の濃度が異なる。同様に血漿+生理食塩水でも濃度や 0.2mL 分のトロンビンと生理食塩水のインピーダンスの差を考慮しなくてはならない。すなわち、血漿濃度を一定にする、すなわち血漿+生理食塩水のインピーダンスと血漿+トロンビンで比較する。ここで、トロンビンと生理食塩水のインピーダンスの基準を固定して比較しなければいけないと考えられる。

まず、生理食塩水のインピーダンスから生理食塩水+トロンビンのインピーダンスの差分をとることによって、トロンビンと生理食塩水のインピーダンスの差が分かる。これから、血漿+トロンビンのインピーダンスから(トロンビン-生理食塩水)のインピーダンスを引くことによって、トロンビンのインピーダンスを生理食塩水のインピーダンスにすることが出来る。したがって、血漿+生理食塩水と血漿+トロンビンにおける純粋な血漿と血漿凝固のインピーダンスを比較することができる。

次に、sample2、sample3、sample5 における純粋な血漿と血漿凝固に関するインピーダンスの結果をそれぞれ図 3.35、3.36、3.37 に示す。ただし、周波数は 10kHz から 100 kHz までの結果とする。

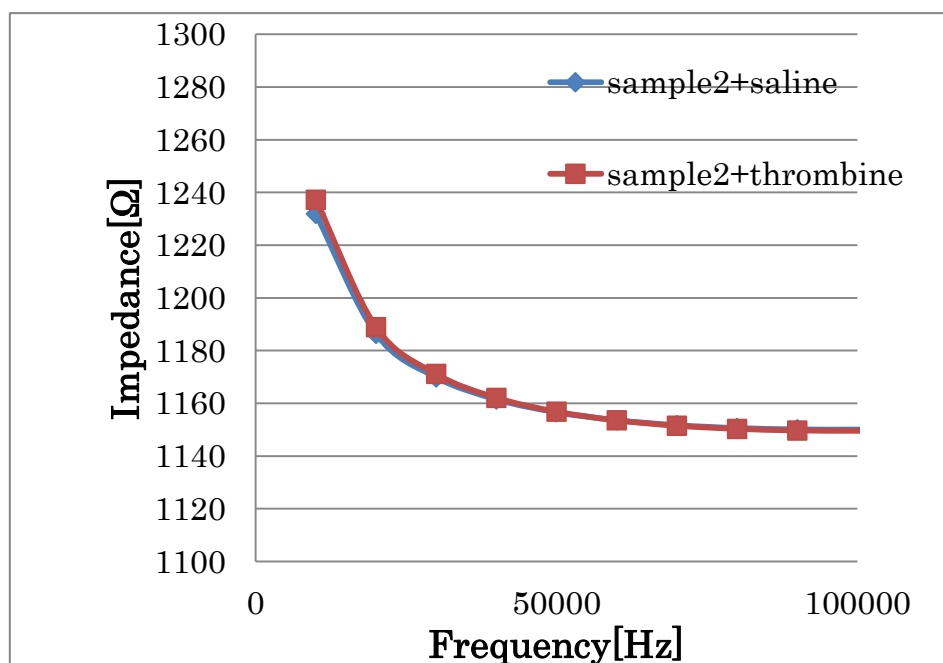


図 3.35 sample2 における血漿と血漿凝固のインピーダンス比較

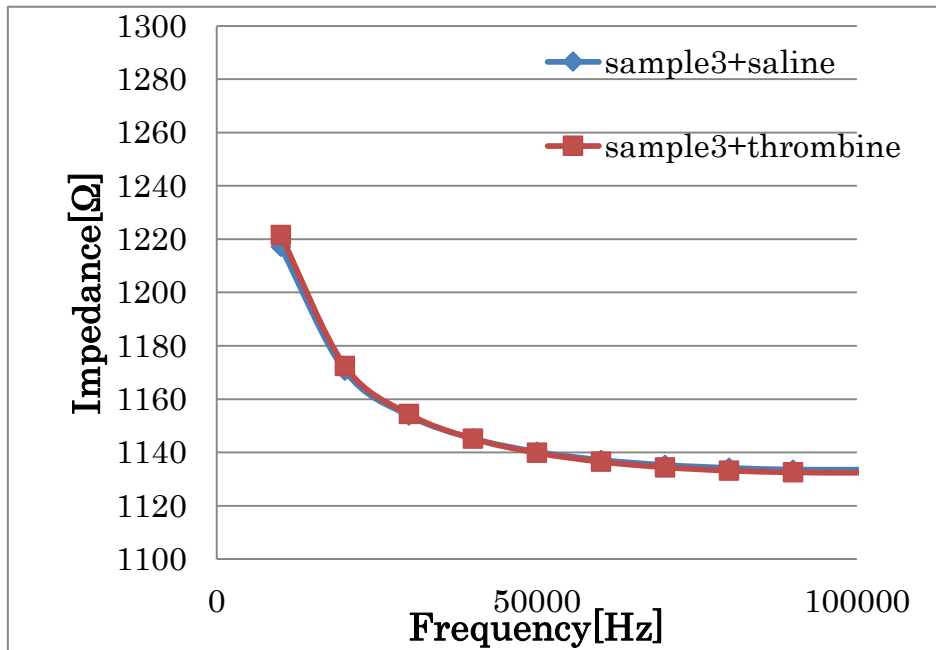


図 3.36 sample3 における血漿と血漿凝固のインピーダンス比較

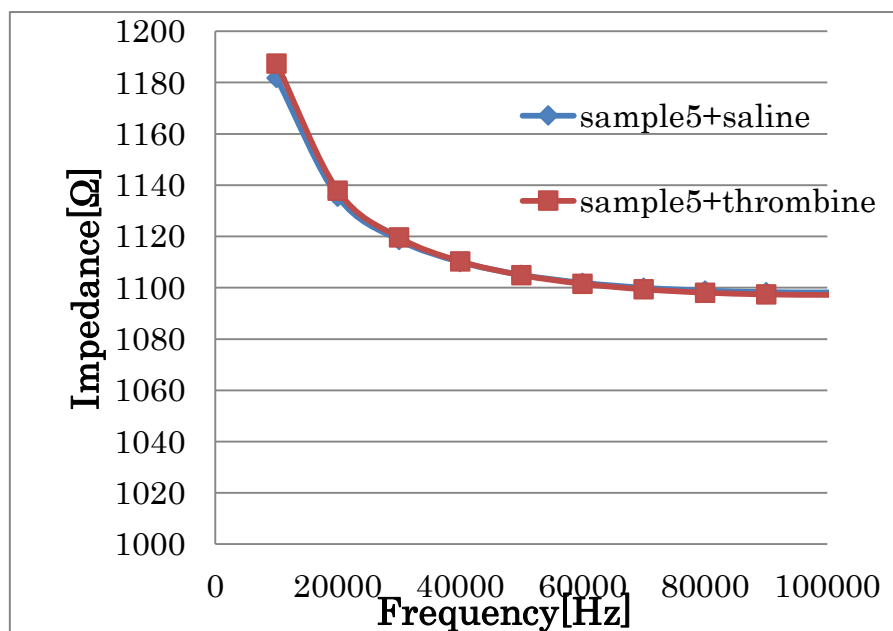


図 3.37 sample5 における血漿と血漿凝固のインピーダンス比較

以上から、生理食塩水とトロンビンのインピーダンスの基準を一定にして比較すると、血漿は凝固しても液体の状態の血漿とインピーダンスが変わらないという結果になる。すなわち、血液の凝固によるインピーダンスの変化は、血球すなわち赤血球の影響がすべてであるということを示している。

血液凝固の時間変化に伴う抵抗測定結果

図 3.38 に時間変化に伴う血液凝固のインピーダンス変化の実験結果を示す。

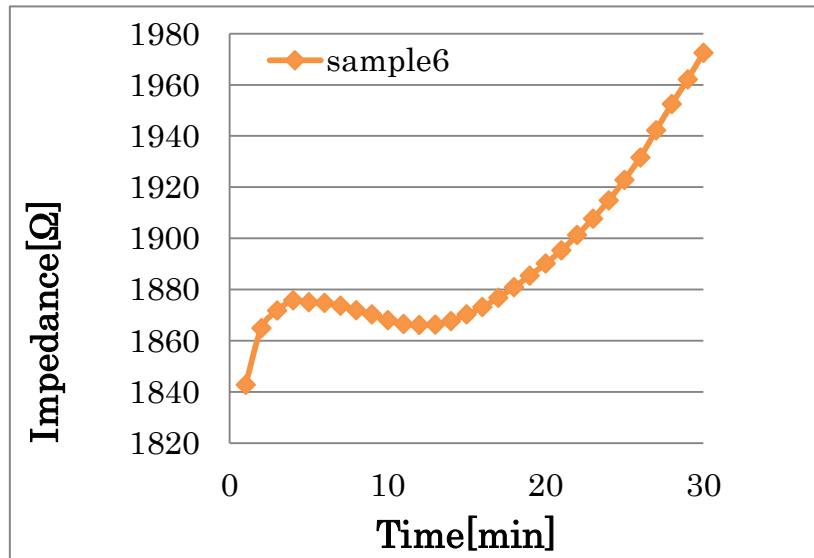


図 3.38 時間変化に伴う血液凝固のインピーダンス変化

この結果から、目視による血栓形成時の時間は約 18 分で確認している。すなわち、この結果から、血栓形成後はインピーダンスが急激に上昇しているが、血栓形成直前はインピーダンスが減少することが分かる。

ステージ【1-3】

**【1-3】 画像再構成アルゴリズム精度
の向上**

1. EIT シミュレーション

1.1. シミュレーション方法

今回、EIT(Electrical Impedance Tomography)によるシミュレーションを行う。今回用いたシミュレーションとしては、EIDORS と呼ばれるサイトのプログラムを使用し MATLAB で実行した。このプログラムは、有限要素法を使用し、赤血球の配置を自分で指定し、赤血球の導電率と血漿の導電率をプログラムに入れることによって血液の断面濃度分布のシミュレーションを行う。

1.2. プログラムと計算条件

今回用いた、EIT シミュレーションのプログラムを以下に示す。

```
% Create fwd models
% $Id: tutorial010a.m 2157 2010-04-04 11:22:54Z aadler $
subplot(121);
% 2D Model
imdl_2d= mk_common_model('b2c',8);
show_fem(imdl_2d.fwd_model);
axis square
subplot(122);
axis square;
view(-35,14);
print_convert('tutorial010a.png','-density 100')
% Simulate EIT data
% $Id: tutorial010b.m 2747 2011-07-14 12:54:18Z aadler $
sim_img= eidors_obj('image', 'stimulation image');
sim_img.fwd_model= imdl_2d.fwd_model;
% set voltage and current stimulation patterns
stim = mk_stim_patterns(8,1,[0,1],[0,1],{ },1);
sim_img.fwd_model.stimulation = stim;
% set homogeneous conductivity and simulate
sim_img.elem_data= ones( size(sim_img.fwd_model.elems,1) ,1.428);
homg_data=fwd_solve( sim_img );
% set inhomogeneous conductivity and simulate
sim_img.elem_data([1:4])=0;
sim_img.elem_data([9:16])=0;
```



```

sim_img.elem_data([26,29,32,35])=0;
sim_img.elem_data([37,39,40,42,43,45,46,48])=0;
sim_img.elem_data([82,84,87,89,92,94,97,99])=0;
sim_img.elem_data([101,103,105,106,108,110,111,113,115,116,118,120])=0;
sim_img.elem_data([170,174,177,181,184,188,191,195])=0;
sim_img.elem_data([200,207,214,221])=0;
inh_data=fwd_solve( sim_img );
clf;subplot(211);
xax= 1:length(homg_data.meas);
hh= plotyy(xax,[homg_data.meas, inh_data.meas], ...
           xax, homg_data.meas- inh_data.meas );
set(hh,'Xlim',[1,max(xax)]);
print_convert('tutorial010b.png','-density 75');
% Reconstruct images
% $Id: tutorial010c.m 2157 2010-04-04 11:22:54Z aadler $
subplot(121)
show_fem(sim_img);
%reconstruct
rec_img= inv_solve(imdl_2d, homg_data, inh_data);
% Show reconstruction as a 3D mesh
subplot(122)
show_fem(rec_img)

```

ここで、プログラムの 20 行目の 1.428 は血漿の導電率を表し、この導電率の単位は[S/m]である。また 23 行目から 30 行目までは[]の中身が赤血球の要素の位置を示している。これらの行の最後の=0 は赤血球の導電率を表している。図 4.1 にシミュレーションを行う断面を示す。断面の管壁にある丸印が電極を示し、8 個の電極を使用している。また、管内の断面は全部で 256 の要素から成り立っている。

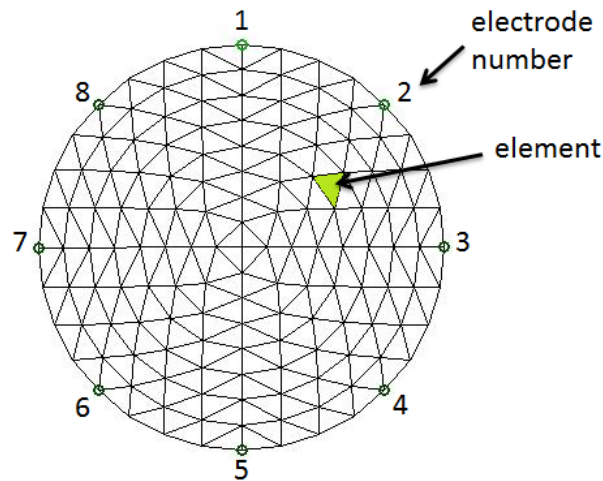


図 1.1 断面の電極位置と要素数

本シミュレーションでは、全要素のうちの 56 個を赤血球と仮定し、そのほかの要素 200 個を血漿と仮定して行う。血栓前の赤血球の導電率は $0[\text{S/m}]$ とし、血漿の導電率を $1.428[\text{S/m}]$ とした。また、十分に時間が経過したときの赤血球の流動特性は管中心部に赤血球濃度が高く、管壁近くで赤血球濃度が低いことが明らかになっている。そのため、今回のシミュレーションでは、管中心部における赤血球濃度を高くし、管壁にいくにつれて赤血球濃度を低くするよう赤血球の配置とする。

血栓形成におけるシミュレーションとしては、血液 6 検体の血漿凝固の結果から、血栓時の血漿の導電率を一般的な導電率の比から算出し、 $1.319[\text{S/m}]$ とした。また、血栓はランダムな場所において、周囲の赤血球を結合させることによって再現した。血栓に関しては、血栓となる赤血球の結合した要素の数 Th を 4、6、8 と変化させた場合と血栓の個数 N を変化させた場合のシミュレーションを行った。

1.3. シミュレーション結果

流動状態における赤血球濃度分布のシミュレーション結果を図 1.2 に示す。血栓形成におけるシミュレーションについては Th が 4、6、8 と変化させた場合をそれぞれ図 1.3、図 1.4、図 1.5 に示し、 $Th = 6$ 、 $N = 2$ のときの結果を図 1.6 に示す。ここで、(a) はシミュレーションにおける赤血球の配置を示し、(b) はそれに対応するシミュレーション結果である。

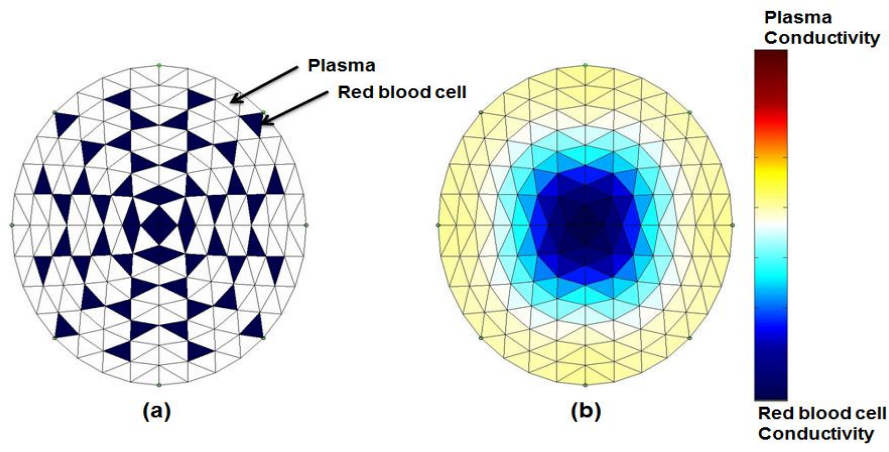


図 1.2 流動状態における赤血球配置のシミュレーション結果

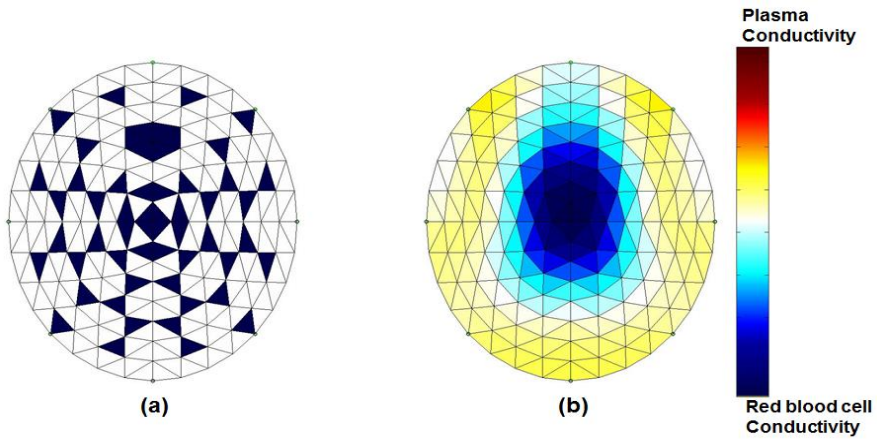


図 1.3 赤血球結合数 $Th = 4$ のときのシミュレーション結果

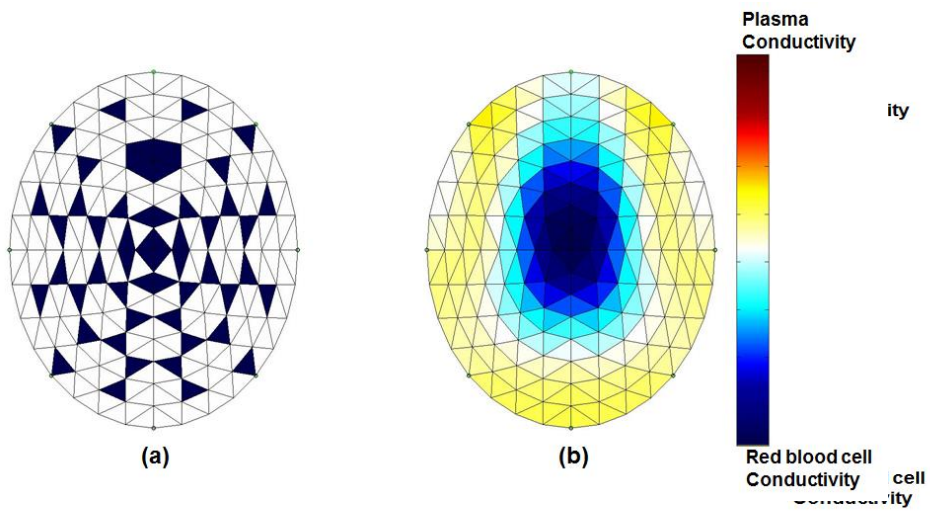


図 1.4 赤血球結合数 $Th = 6$ のときのシミュレーション結果

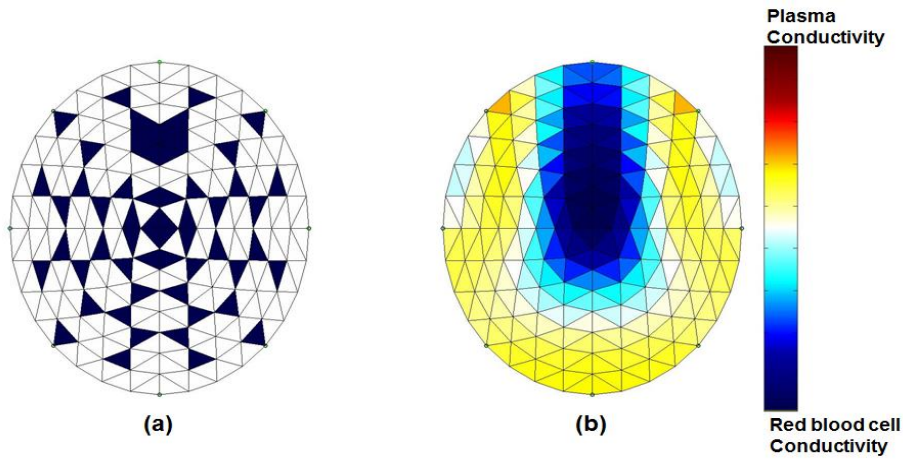


図 1.5 赤血球結合数 $Th = 8$ のときのシミュレーション結果

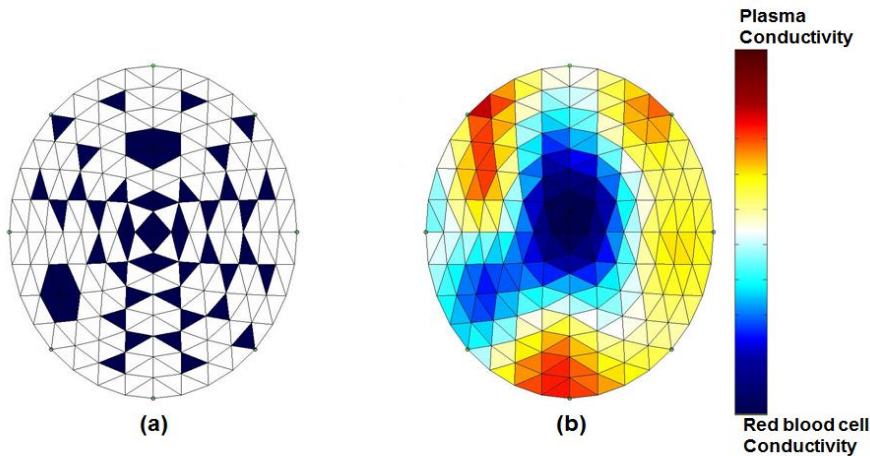


図 1.6 赤血球結合数 $Th = 6$ 、 $N = 2$ のときのシミュレーション結果

ここで、青色の部分は赤血球の導電率が高いことを示し、赤色の部分は血漿の導電率が高いことを示す。

以上のシミュレーション結果から、 $Th = 4$ と $Th = 6$ の場合は図 1.2 の赤血球の初期配置におけるシミュレーション結果とほとんど違いが見られなかった。図 1.5 のように $Th = 8$ の場合には管壁まで赤血球の導電率が高くなっていることが分かる。この場合には、初期配置における赤血球導電率分布より違いがはっきりと確認することができることから、血栓ができていると確認することができる。また、図 1.6 では、 $Th = 6$ 、 $N = 2$ のシミュレーション結果は血栓の周囲で血漿の導電率が高くなっているとともに、血栓部で赤血球の導電率分布が非常に高いことから、血栓が複数できていることが確認できる。

ステージ【1-4】

【1-4】 静的条件における実験

1. 赤血球の沈降実験

1.1. 実験装置

図 1.1 に赤血球の沈降実験に用いた実験装置を示す。また、実験に用いたアクリル容器の図を図 2.2、PTL 社の ITS Resistance Tomography の図を図 1.3 に示す。

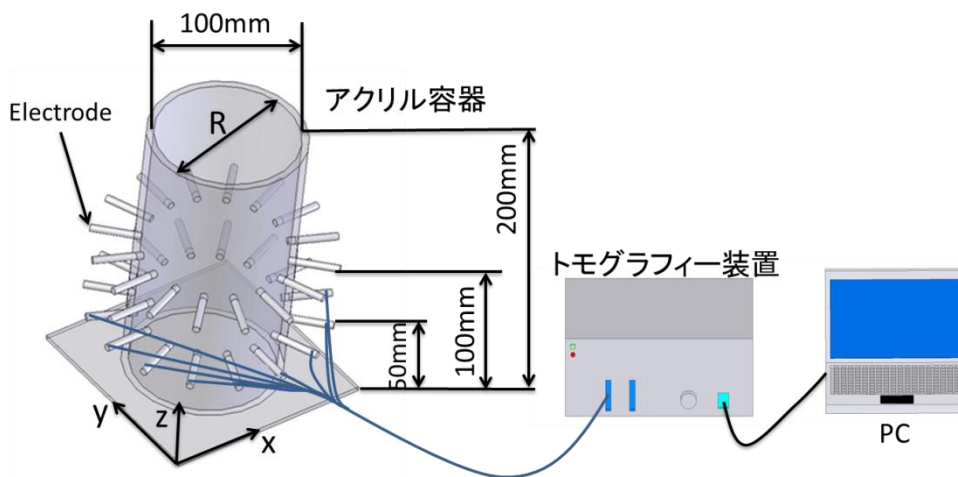


図 1.1 実験装置



図 1.2 使用したアクリル容器

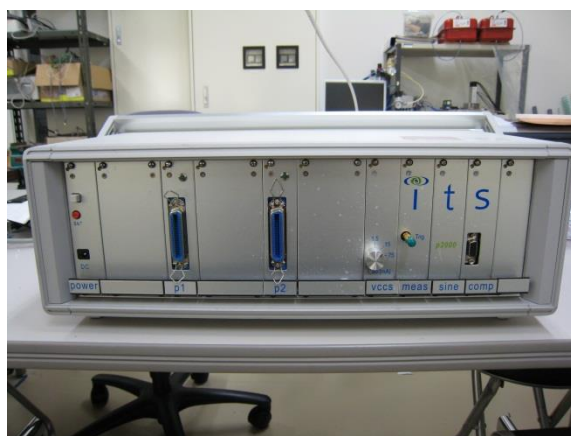


図 1.3 トモグラフィー装置

アクリル容器の概要としては、容器の底から 50mm と 100mm の高さにそれぞれ電極が 16 個ずつ取り付けられている。この電極は M5 のねじを使用し、材質はステンレスである。今回トモグラフィーを行った断面は容器の底から 50mm の高さの 1 断面のみの可視化を行う。

1.2. 実験条件

実験条件

実験条件を表 1.1 に示す。

表 1.1 実験条件

印可電流	75[mA]
印可周波数	9600[Hz]
血液量	1.00[L]
使用容器の材質	アクリル(PMMA)
使用電極の材質	ステンレス(SUS304)
管内径	100[mm]
容器高さ	200[mm]
電極の高さ	50[mm]
電極の直径	5[mm]
赤血球の導電率	0[mS/cm]
血漿の導電率	0.022[mS/cm]

ここで、使用した血液は前日に採取したウシの血液である。また、この血液は血液 1L に対して、10%クエン酸ナトリウム水溶液を添加している。このクエン酸ナトリウム水溶液は精製水 1L に対してクエン酸ナトリウム粉末を 3.24%濃度で作製されたものである。このことから、この血液を使用して血液の沈降実験を行ったとき、赤血球が自然に凝固することはない。

赤血球濃度と沈降速度の関係

赤血球濃度と沈降速度の関係について述べる。一般的な赤血球の沈降速度 v_r は一時間に約 10mm 沈降するので、

$$v_r = 10[\text{mm/h}] \approx 2.8 \times 10^{-3}[\text{mm/s}] \quad (5.1)$$

となる。よって、赤血球 1 個が 1 秒間に落ちる距離 Z_r は、

$$Z_r = v_r \times \Delta t \approx 2.8 \times 10^{-3}[\text{mm}] \quad (5.2)$$

ここで、電極幅 Z_0 は $Z_0 = 5.0[\text{mm}]$ なので、(5-2)から $Z_0 \gg Z_r$ より、赤血球の断面濃度は赤血球沈降速度に依存しない。

赤血球体積

赤血球がすべて沈降した場合、沈降したときの高さが電極の位置にくるかどうかを考える。

まず、仮定として平均赤血球数は 1mL 当たり 5×10^6 個とする。また、ヘマトクリット数は 35%とする。このときの血液 1L 中の赤血球の体積を考える。

赤血球 1 個当たりの容積 V_r は

$$V_r = \frac{\text{ヘマトクリット}}{\text{赤血球 } 1\text{mm}^3 \text{ 中の個数}} = \frac{0.35}{5 \times 10^6} = 7 \times 10^{-8}[\text{mm}^3] \quad (5.3)$$

となる。また、血液 1L 中の赤血球の個数は

$$\begin{aligned} N_R &= \text{血液の容積}[\text{mm}^3] \times \text{血液 } 1[\text{mm}^3] \text{ 中の赤血球の個数} \\ &= 1 \times 10^6 \times 5 \times 10^6 = 5 \times 10^{12}[\text{個}] \end{aligned} \quad (5.4)$$

よって、血液 1L 中の赤血球の容積は

$$\begin{aligned} V_R &= \text{血液 1L 中の赤血球の個数}[\text{mm}^3] \times \text{赤血球 1 個当たりの容積}[\text{mm}^3] \\ &= 5 \times 10^{12} \times 7 \times 10^{-8} = 3.5 \times 10^5[\text{mm}^3] \end{aligned} \quad (5.5)$$

ここで、高さ 50[mm]の電極までの血液の容積は

$$V_b = \pi \times 50^2 \times 50 = 3.93 \times 10^5[\text{mm}^3] \quad (5.6)$$

従って、 $V_b > V_R$ より、赤血球がすべて沈降しても電極高さまで赤血球は体積しないとする。

1.3. 実験方法

以下に実験方法について述べる。

1. アクリル容器の中を生理食塩水で十分に洗浄を行う。
2. 血液を充填する。
3. レジスタンス CT 装置の印可電流と周波数、電極数を決定する。
4. 電流とゲインに対するキャリブレーションを行う。
5. 赤血球の沈降に関する導電率、電極間の電圧等を計測する。

また、赤血球の沈降実験の様子を図 1.4 に示す。

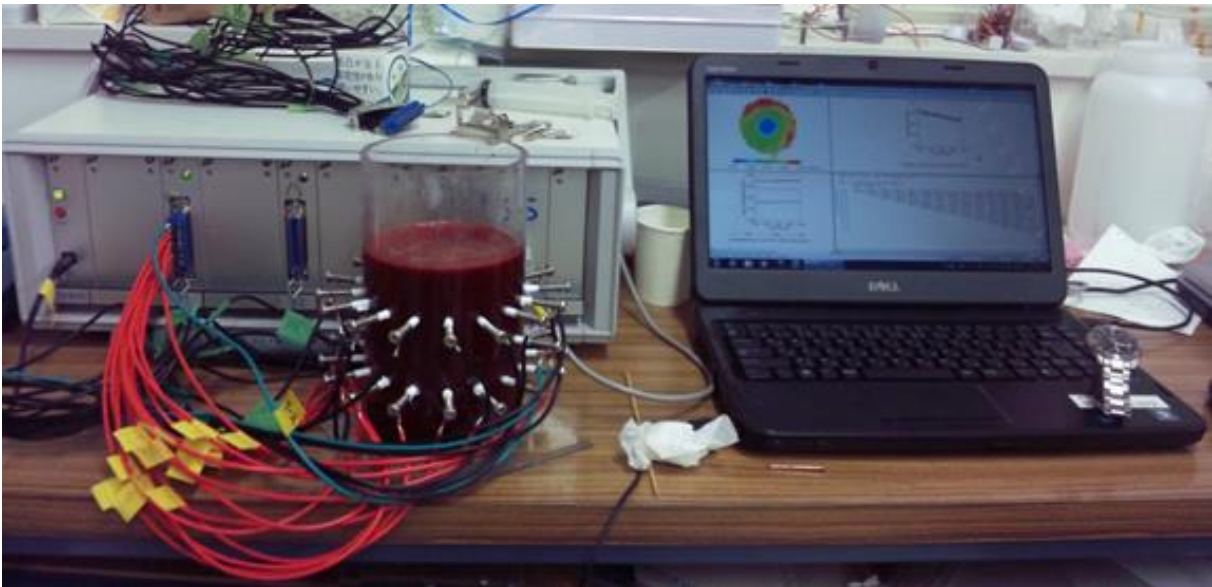


図 1.4 赤血球沈降実験の様子

1.4. 実験結果

図 1.5 に赤血球沈降における時間変化に対する導電率の分布を示す。また、図 1.6 に三次元(断面+時間)の導電率分布を示す。

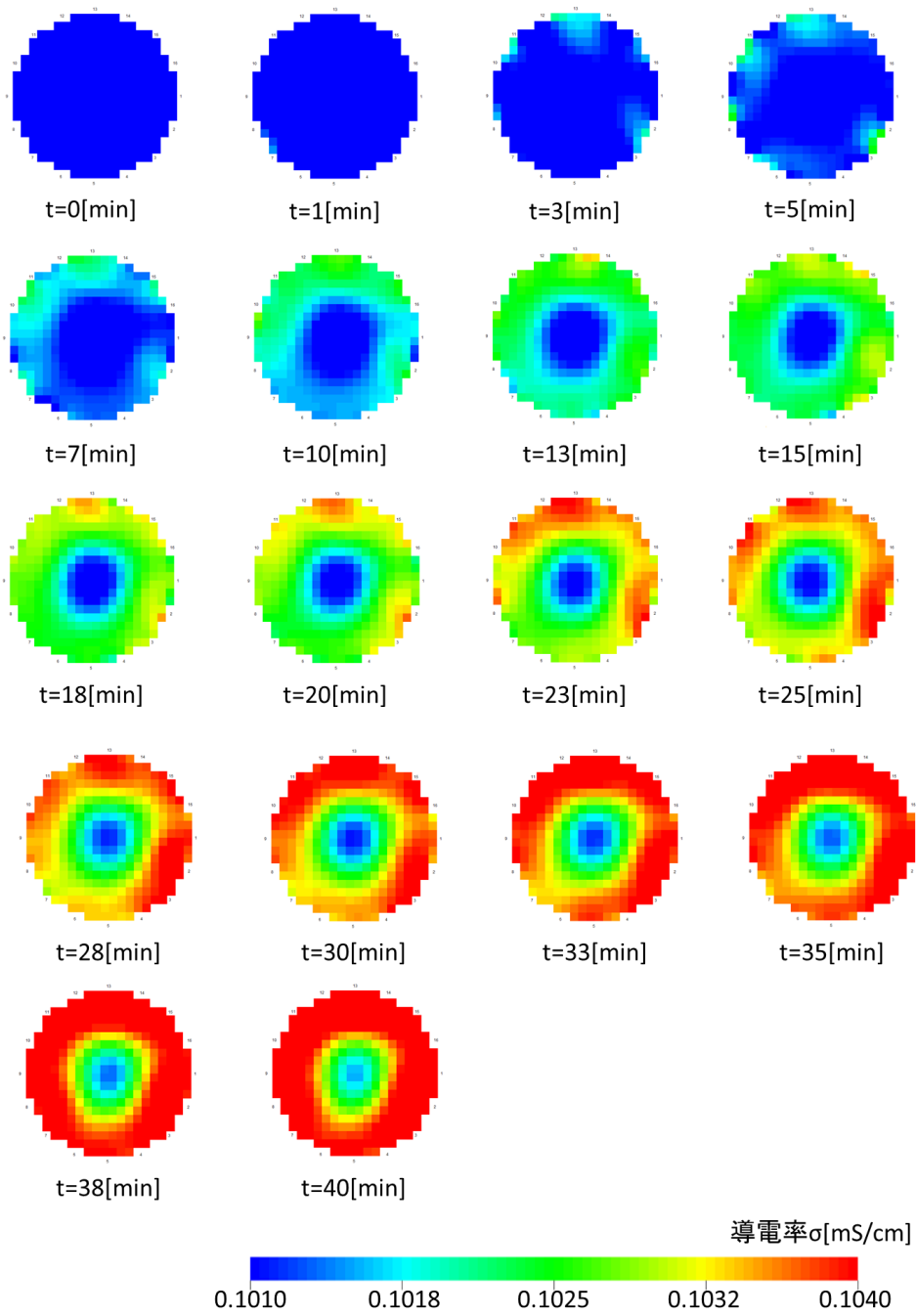


図 1.5 導電率分布

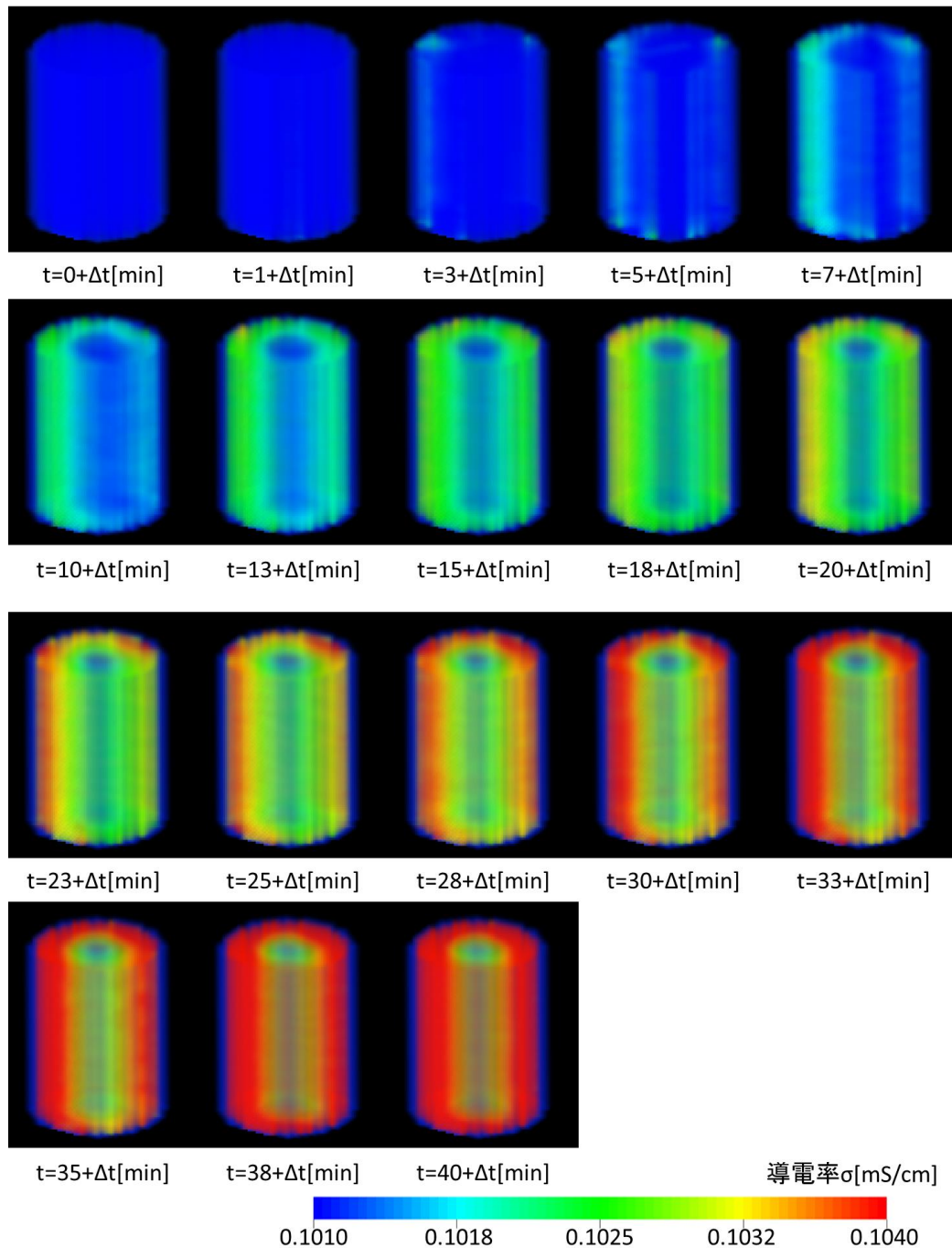


図 1.6 三次元導電率分布

ここで、導電率が低い部分すなわち青い表示の部分は赤血球濃度が高いことを示し、逆に導電率が高い部分すなわち赤い表示の部分は血漿濃度が高いことを示す。

次に、図 1.7 に赤血球沈降の時間変化に関する導電率の変化を示し、図 1.8 に時間変化に関する半径方向の導電率の変化を示す。

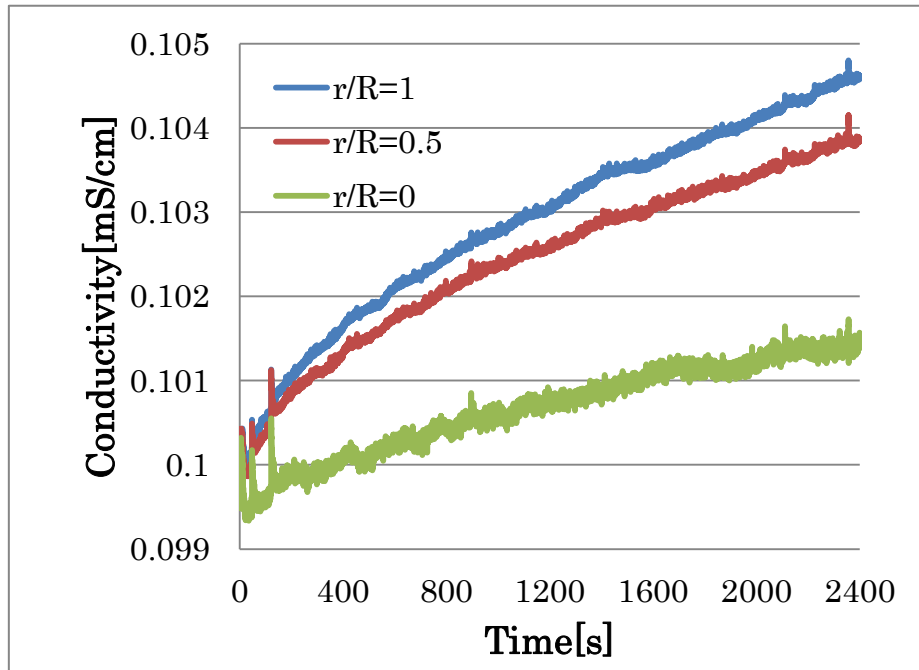


図 1.7 半径方向に関する時間経過による導電率の変化

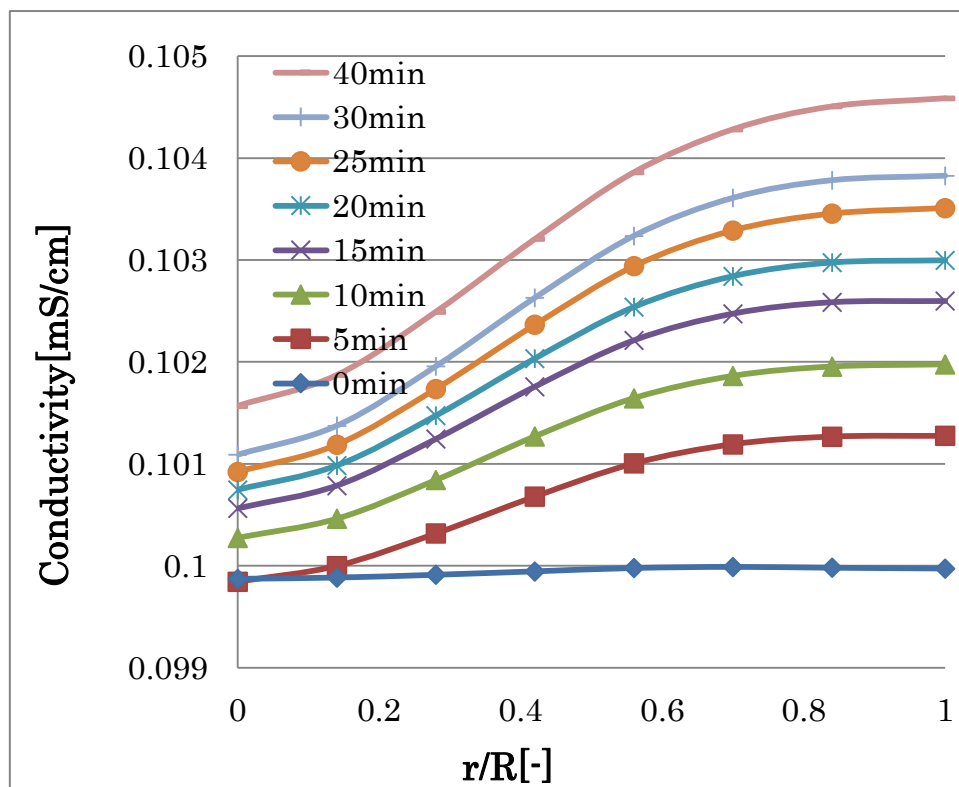


図 1.8 時間変化に関する半径方向の導電率の変化

次に、図 1.7 と図 1.8 において式(2-4)を用いて導電率をヘマトクリットに変換した場合の変化すなわち、時間経過によるヘマトクリットの変化と半径方向によるヘマトクリットの変化をそれぞれ図 1.9 と図 1.10 に示す。

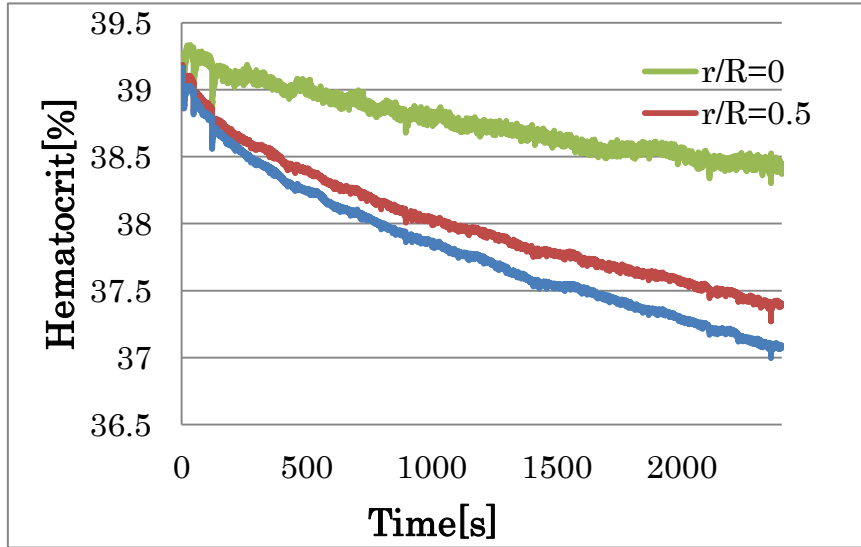


図 1.9 半径方向に関する時間経過によるヘマトクリットの変化

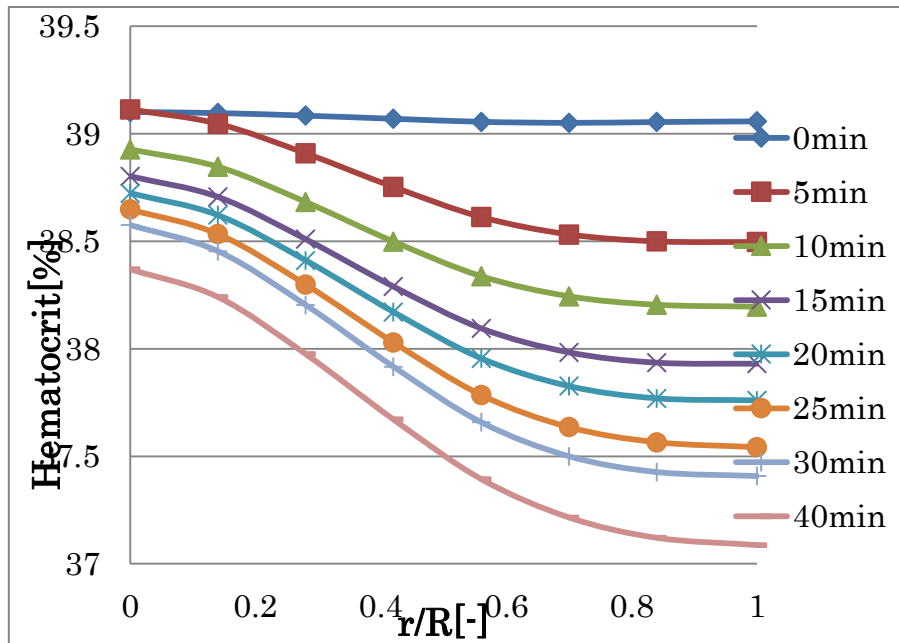


図 1.10 時間変化に関する半径方向のヘマトクリットの変化

以上の赤血球の沈降に関する結果から、導電率分布と時間変化に関する半径方向とヘマトクリットの関係を見ると赤血球濃度分布において、計測開始直後は半径方向すなわち断面に対して、約 39.2% でヘマトクリットの値がほぼ一定である。しかし、時間が経過するにつれて、管中心で導電率が低いすなわち管中心で赤血球濃度が高くなり、逆に管壁で導電率が高くなっているため血漿濃度が高いことが分かる。また、これを半径方向とヘマトクリットの図(図 1.10)で確認すると、管中心でヘマトクリットが管壁に比べて 40 分後には約 1.3% 管中心のほうが高いことが分かる。また、図 1.9 から沈降現象中は管中心でも管壁でも断面全体においてヘマトクリットが減少し、40 分経過後ではヘマトクリットが計測開

始直後と比較して約2%減少していることも確認することができる。

このことから、赤血球の沈降において、次のような現象が起きていると考えられる。

まず、電極の幅と赤血球沈降速度の関係から赤血球の沈降に関する濃度は沈降速度に依存しない。ヘマトクリットが約39%ということを見ると、赤血球が沈降中に管壁側の赤血球が管中心側に移動するということはないと考えられる。すなわち、赤血球が沈降中に管中心でヘマトクリットが高く管壁でヘマトクリットが低い理由として、赤血球の配向が考えられる。図1.11に示すように計測開始直後は半径方向に対してヘマトクリットが一定であることから赤血球はランダム配向していると考えられる。しかし、時間が経過すると管中心では赤血球は短軸配向し、管壁では長軸配向すると考えられる。

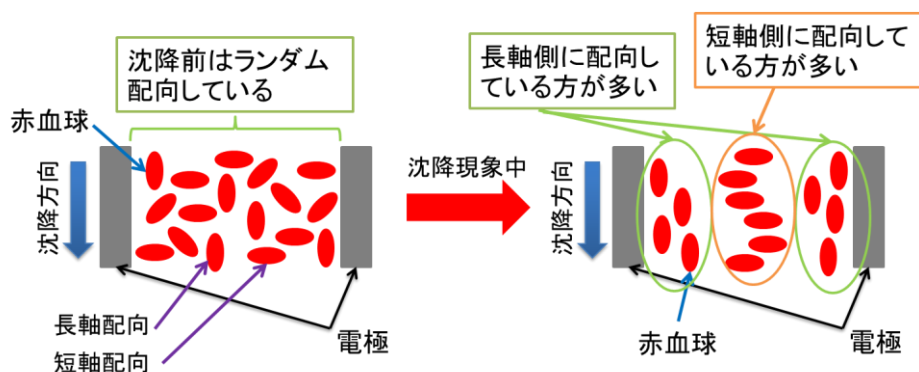


図 1.11 赤血球沈降における赤血球の配向

ここで、図1.12に示すように和田ら(2004)によって流動している場合の赤血球の挙動に関する地球シミュレータの結果によると赤血球は、管中心で短軸配向し赤血球濃度が管壁よりも高いことが分かっている⁷⁾。

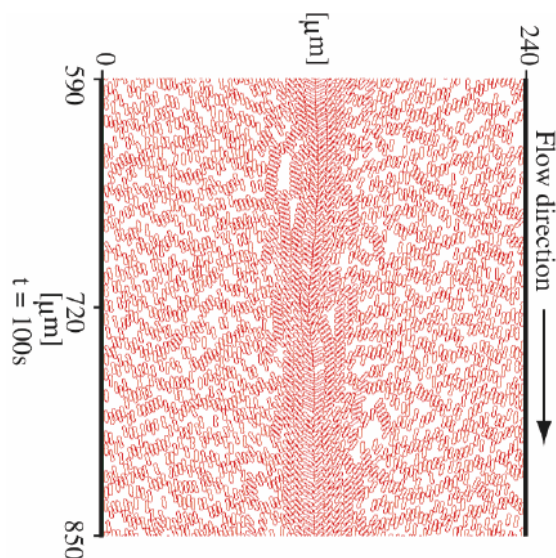


図 1.12 赤血球挙動のシミュレーション結果

従って、赤血球の沈降の場合も血液が流動している場合と同じように、ランダム配向か

ら時間が経過するにつれて、管中心と管壁である一定の配向が生じていることが分かる。

2. 結言

今回の研究から、静的な状態における血液の電気特性を計測することができた。この実験結果から、血漿において液体の状態においても血漿が凝固した状態においてもインピーダンスが変化しないことが分かった。また、血液と血栓の場合のインピーダンスに関しては血栓形成した場合の方がインピーダンスは高いことが分かる。このことから、血栓に関するインピーダンスを上昇させる因子として、血球すなわち赤血球が大きな原因となっている可能性があることが分かった。

血栓の時間経過に関する抵抗に関しては、血栓形成前にインピーダンスが減少することが分かった。また、血栓形成後はインピーダンスが急激に上昇することが分かる。

血液の沈降に関する実験についてはプロセス・トモグラフィ法を用いて赤血球濃度分布の断面可視化実験を行うことができた。この実験から、血液の沈降の実験開始直後はヘマトクリットが一定であり、時間経過すると管中心でヘマトクリットが高く、管壁でヘマトクリットが低いことが分かった。

今後は血液を流動させた場合の電気特性とプロセス・トモグラフィ法を用いた可視化実験を行うことにより、流動状態における赤血球の挙動と血栓の挙動について調査する必要がある。

ステージ【1-5】

【1-5】 考察と総合討論

1. 目的

そこで、本研究の最終目的である血液凝固反応をモニタリングできるシステムの実現として、本研究は、下記の実験を行い、赤血球凝集と緩和周波数 f_c の関係及び血液凝固反応における緩和周波数 f_c を用いた赤血球凝集速度の変化を明らかにすることを目的とする。

- (1) ブタ血液及びウシ血液を用いた赤血球凝集と緩和周波数 f_c の関係を明らかにする実験。
- (2) ブタ血液を用いた血液凝固反応過程における緩和周波数 f_c を用いた赤血球凝集速度の計測実験。

2. 理論

2.1. 血液凝固反応メカニズム

一般的に、血管内が損傷した場合における血液凝固は「一次止血」と「二次止血」に区別できる。一次止血は血小板が主役の止血で、二次止血では、血液凝固因子が主役である。一次止血では、血管内の損傷によるコラーゲン基質の露出によってフォンウィルブランド因子(vWF 因子)がコラーゲンに結合する。その後、血液内の血小板が、vWF 因子を介するか直接コラーゲンと結合し、血管内皮細胞下組織に付着凝集することによって血小板の血栓が形成されることが知られている[17]。

図 2.1 は、二次止血 [18,19,20,21]を示したものである。この図に示した通り、外因系反応と内因系反応の 2 つの異なるカスケード反応に分けられる。内因系の凝固反応では、血液中の第 XII 因子が血管の内皮細胞下にある陰性荷電の異物面と接触することで、第 XII 因子が活性化され、XIIa となる。次に、XIIa は第 XI 因子を加水分解し活性化(XIa)する。この XIa はカルシウムイオン(Ca^{++})と共に IX 因子を加水分解し第 IX 因子が活性化され、IXa となる。IXa はトロンビンより活性化した VIIIa 因子、リン脂質(PL:Phospholipid)、 Ca^{++} と共に第 X 因子を加水分解して活性化(Xa)する。Xa は第 V 因子、リン脂質、 Ca^{++} と共に第 II 因子(プロトロンビン)に働いて活性化しトロンビン(IIa)となる。図 2.2 で示しているように、トロンビンは血漿タンパクの 1 つであるフィブリノゲンをフィブリンモノマーに変化させる。フィブリノゲンは二つの D ドメインを有し、その二つ D ドメインが中央の E ドメインと多重コイル・セグメントで繋がっている[22]。フィブリンモノマーは Ca^{++} の影響で重合し、フィブリンポリマーとなる。そこに、トロンビンによって活性化された XIIIa 因子により、3 次元網目構造をもつクロスリンクフィブリンとなる。赤血球やトロンビンによって活性化した血小板がクロスリンクフィブリンに付着することで血液は凝固する。

外因系反応に関しては、血管が損傷して出血が起こると、血管外の組織液中の葬式トロンボプラスチンが血液中に入り、第 VII 因子と結合することによって、第 VII 因子が活性化され、VIIa となる。VIIa は Ca^{++} の存在下で直接、第 X 因子を活性化する。その後は内因系

反応と同様にクロスリンクフィブリンとなる。

また、血液凝固には血流も強く影響し、動脈のようなせん断速度の大きい血流では、活性化された血小板とフィブリンを主体とする白い血栓が形成される。一方で、静脈のようなせん断速度の小さい血流では、血小板、フィブリン、および、赤血球を主体とした赤い血栓が形成される。

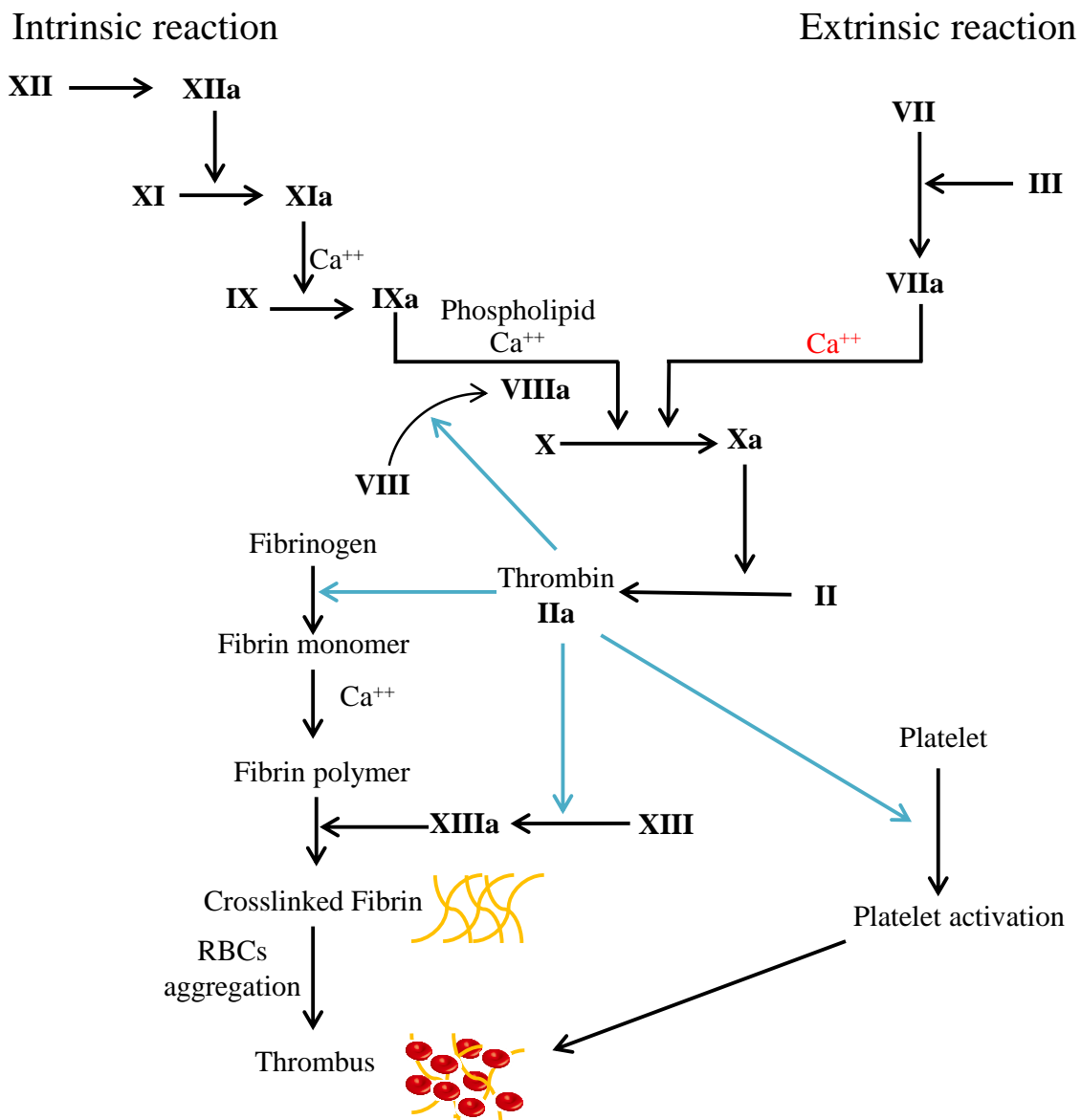


図 2.1 Blood coagulation mechanism

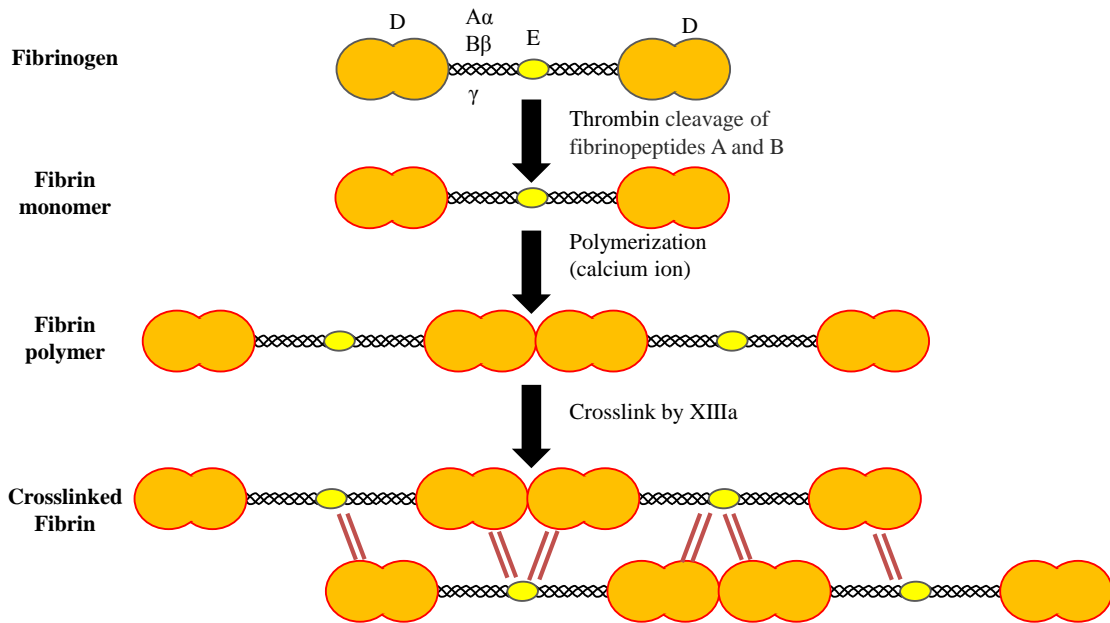


図 2.2 The conversion of Fibrinogen to Fibrin

2.2. 赤血球凝集

図 2.3 に示しているように、人血液またはブタ血液は静止場または低せん断場におかれた時に、赤血球が凝集する [23、24]。硬貨を連ねたようにつながっているため、赤血球連銭とも呼ばれている。しかし、高せん断場に戻されたら、凝集が解かされていくので、赤血球凝集は可逆な現象である。また、ウシ血液にはこの現象が確認されていない[25]。この現象の説明として、「架橋モデル」と「枯渇モデル」の二つモデルが提案されている。Merrill らが血漿タンパク質フィブリノゲンによって誘起される赤血球凝集の「架橋モデル Bridging Model」を提案した[26]。また、Chien らは中性デキストランによって誘起される赤血球凝集を「架橋モデル」で説明できた[27]。このように、赤血球凝集は血漿に浮遊している赤血球だけではなく、一度洗った赤血球をデキストランのような中性高分子に再浮遊させても、確認できる。このモデルでは、図 2.4 に示されているように、マイナス電荷されている赤血球間をプラス電荷されているフィブリノゲンが架橋する。また、Neu らが赤血球間よりフィブリノゲン分子が排除されることによる「枯渇モデル」を赤血球凝集に応用して、説明した[28]。

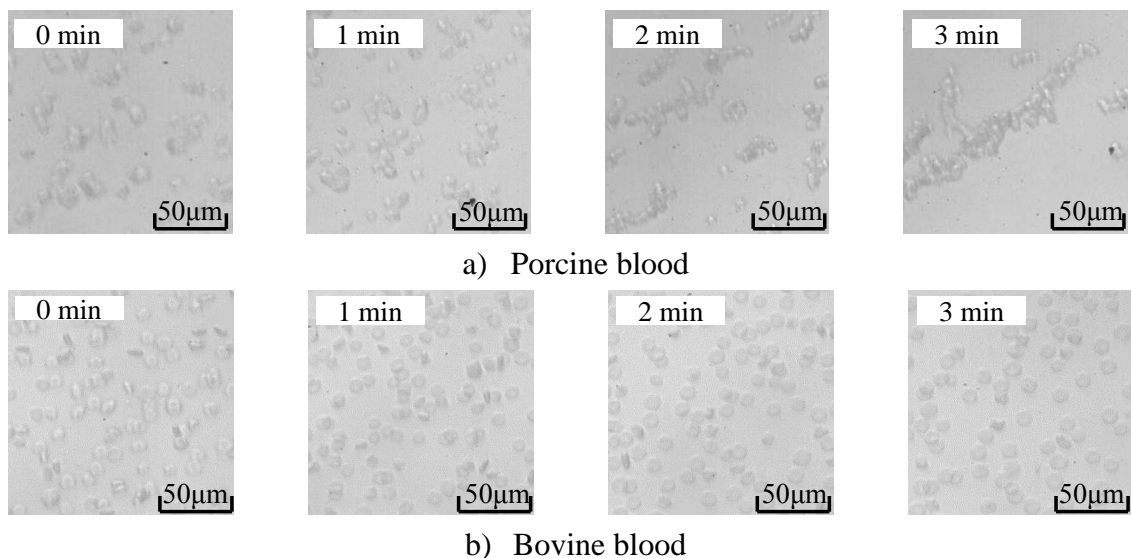


図 2.3 Red blood cell aggregation behavior of porcine and bovine blood

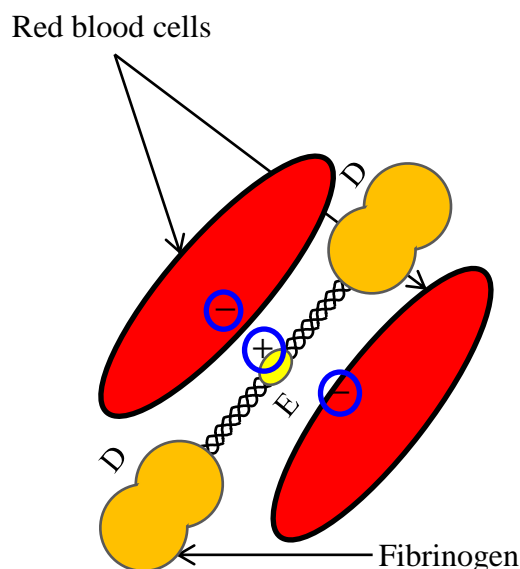


図 2.4 RBCs Aggregation Bridging model

2.3. Cole-Cole 解析

Cole-Cole 式と Cole-Cole プロット

式 1.1 が Cole-Cole 式を示す[29]。この式は測定された複素インピーダンスデータをフィッティングすることができる。

$$Z^* = R + jX = R_\infty + \frac{R_0 - R_\infty}{1 + (j\omega\tau)^\alpha} \quad (2.1)$$

ここで、 Z^* は複素インピーダンス[Ω]で周波数 f [Hz]の関数である。 Z^* の実数部は抵抗値 R [Ω]で、 Z^* の虚数部はリアクタンス X [Ω]である。そして、 R_∞ は測定周波数 $f=\infty$ の際の抵抗値[Ω]、 R_0 は周波数 $f=0$ の際の抵抗値[Ω]、 α は Shape factor である。 τ は緩和時間で緩和

周波数 f_c とは $\tau = \frac{1}{2\pi f_c}$ の関係で示される。また、 $w = 2\pi f$ は角周波数 (rad/s) である。 α は緩和周波数 f_c の分布を表すパラメータで、 $0 \leq \alpha \leq 1$ の特徴を持っている。 $\alpha=1$ のとき、式 2.1 が式 2.2 で示される Debye の式になる。

$$Z^* = R + jX = R_\infty + \frac{R_0 - R_\infty}{1 + jw\tau} \quad (2.2)$$

式 1.1 を複素数平面に表現するために、横軸に $R[\Omega]$ 、縦軸に $X[\Omega]$ を取ると、図 2.5 で示されているような Cole-Cole プロットが得られる。この Cole-Cole プロットは Debye の式が表す円心が横軸にある半円ではなく、Cole-Cole プロットは一つの円弧を表しており、その中心点は横軸の下に下がり、 α の値に依存する。

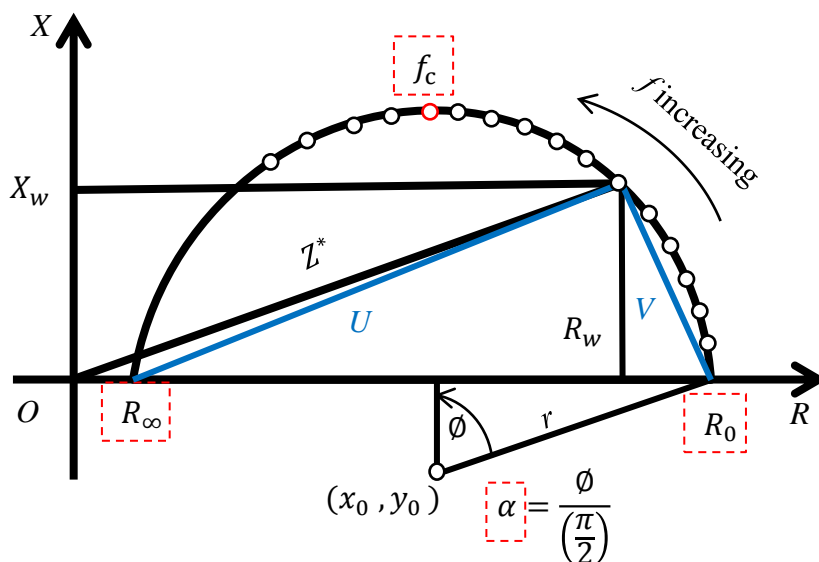


図 2.5 Cole-Cole Plot

Cole-Cole パラメータの求め方

2.3.1 で示されるように、Cole-Cole 式を使用して、Cole-Cole プロットを描くとインピーダンスデータを表すことができる。それだけではなく、Cole-Cole 式の 4 つパラメータ ($R_0, R_\infty, \alpha, f_c$) を利用して解析を行うことを Cole-Cole 解析と言う。そこでこの四つ $R_0, R_\infty, \alpha, f_c$ のパラメータの求め方を示す。

パラメータ R_0, R_∞, α の求め方

図 2.5 で描かれた円弧の中心点 $O(x_0, y_0)$ と半径 r から R_0, R_∞, α が次のように求められる。

$$R_0 = x_0 + \sqrt{r^2 - y_0^2} \quad (2.3)$$

$$R_\infty = x_0 - \sqrt{r^2 - y_0^2} \quad (2.4)$$

$$\alpha = \frac{\phi}{\left(\frac{\pi}{2}\right)} = \frac{2}{\pi} \arcsin\left(\frac{|y_0|}{r}\right) \quad (2.5)$$

緩和周波数 f_c の求め方

図 2.5 で示すように、 U と V を設定する。

ベクトルの関係から、

$$U = Z^* - R_\infty = \frac{R_0 - R_\infty}{1 + (j\omega\tau)^\alpha} \quad (2.6)$$

$$V = Z^* - R_0 = \frac{(-R_0 + R_\infty)(j\omega\tau)^\alpha}{1 + (j\omega\tau)^\alpha} \quad (2.7)$$

次に、 U を V で割ると、

$$\frac{U}{V} = \frac{\frac{R_0 - R_\infty}{1 + (j\omega\tau)^\alpha}}{\frac{(-R_0 + R_\infty)(j\omega\tau)^\alpha}{1 + (j\omega\tau)^\alpha}} = \frac{1}{-(j\omega\tau)^\alpha}$$

より、
$$\frac{U}{V} = -(j\omega\tau)^{1-\alpha} \quad (2.8)$$

この式の絶対値を取ると、

$$\left|\frac{U}{V}\right| = |j^{1-\alpha}|(\omega\tau)^{1-\alpha} = (\omega\tau)^{1-\alpha}$$

自然対数を
とると、

$$\ln\left(\left|\frac{U}{V}\right|\right) = (1-\alpha)\{\ln(f) - \ln(f_c)\} \quad (2.9)$$

このように、(2.9)の式は $\ln\left(\left|\frac{U}{V}\right|\right)$ と f の一次方程式であるため、図 2.6 で示すように、横軸

に f を振り、縦軸に $\ln\left(\left|\frac{U}{V}\right|\right)$ を取ると、 $\ln\left(\left|\frac{U}{V}\right|\right)$ が f 軸と交差するところの周波数 f は f_c である。

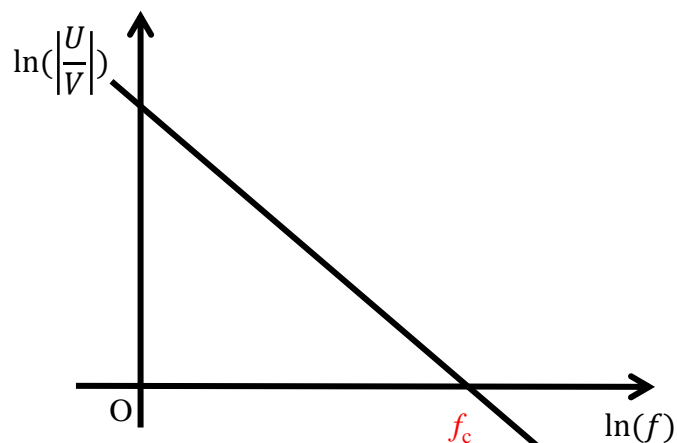


図 2.6 Linear relationship between f and $\ln\left(\frac{|U|}{|V|}\right)$

2.3.3 データフィッティングの仕方

計測より得られた全周波数 R と X のデータを使って、Cole-Cole プロットが円弧になるように、フィッティングする。本研究では、Gabriel Taubin により提供されている曲線同定のアルゴリズムを利用する[30]。

Taubin による曲線当てはめのアルゴリズムは、曲線とデータ点の距離を一次近似し、その近似距離を最少とすることで当てはめを行うものである。この方法は反復法で解くことになる。Taubin は一般固有問題を解くことで反復法の初期値を決め、この初期値を使って、反復法で最適解を得る。反復法としては Newton 法を用いる。

最初に初期値を次のように決める。

$X_1(x), \dots, X_h(x)$ を互いに線形独立な滑らかな関数、ここでは多項式とし、

$$X = (X_1, \dots, X_h)^t : R^n \rightarrow R^h,$$

写像を $k \times h$ の実数行列 F に対する X の要素の線形結合として

$$f = FX : R^n \rightarrow R^h,$$

と書く。 F は定数行列であるから、

$$Df = D[FX] = F[DX]$$

である。 DX は X のヤコビ行列である。たとえば 2 次元で次数が 2 の多項式の場合は

$$F = \alpha = (\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5, \alpha_6),$$

$$X = (1, x_1, x_2, x_1^2, x_1x_2, \alpha_5, x_2^2)^t,$$

$$DX = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 & 2x_1 & x_2 & 0 \\ 0 & 0 & 2 & 0 & x_1 & 2x_2 \end{pmatrix}^t$$

となる。

以下では 2 次元の曲線を仮定する。したがって写像 f を f と記す。 $Z(f)$ が直線や、円

の場合、 $\|\nabla f(x)\|^2$ は、集合 $Z(f)$ 上で一定にある。 f が

$$\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \|\nabla f(p_i)\|^2 = 1 \quad (2.10)$$

を満たすと仮定すると、データ点が f のゼロ点の集合に近づければ、 Df の x に関する連続性により、

$$\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \|\nabla f(p_i)\|^2 \approx \|\nabla f(p_j)\|^2,$$

$$(j = 1, \dots, q)$$

となる。よって、平方近似距離平均 $\Delta_b^2(f)$ は

$$\begin{aligned} \Delta_b^2(f) &= \frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \delta(f, p_i)^2 \\ &= \frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \frac{f(p_i)^2}{\|\nabla f(p_i)\|^2} \\ &\approx \frac{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q f(p_i)^2}{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \|\nabla f(p_i)\|^2} \end{aligned} \quad (2.11)$$

のように近似される。この場合、 $\|\nabla f(p_i)\|^2$ が $Z(f)$ 上で一定となる。

このとき、(2.9)より、平方近似距離の平均は、

$$\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \frac{f(p_i)^2}{\|\nabla f(p_i)\|^2} \approx \frac{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q f(p_i)^2}{\frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \|\nabla f(p_i)\|^2} = \frac{FMF^t}{FNF^t} \quad (2.12)$$

となる。ここで F は h 次元の横ベクトルであり、 M 、 N は $h \times k$ の正方行列で

$$M = \frac{1}{q} \sum_{i=1}^q [X(p_i)X(p_i)^t],$$

$$N = \frac{1}{q} \sum_{i=1}^q [DX(p_i)DX(p_i)^t],$$

である。(2.12) 式の最小化のために、

$$FNF^t = 1$$

の条件の下で

$$FMF^t$$

の最小化を考える。解が存在するには

$$h = \text{rank}(N) \geq 1$$

でなければならない。ラグランジュ乗数法により

$$\phi(F, \lambda) = FMF^t - \lambda(FNF^t - 1)$$

とおき、 $\partial\phi/\partial F=0$ より

$$0 = 2\hat{F}M - 2\lambda\hat{F}N$$

が得られる。従って、

$$F(M - \lambda N) = 0 \quad (2.13)$$

を解くことになり、これは一般固有値問題となる。この一般固有値問題を解くことで反復法に適用する初期値を求める。

得られた初期値で、Newton法を利用し、反復法で次の式

$$\Delta_D^2(\alpha) = \frac{1}{q} \sum_{i=1}^q \delta(\alpha, p_i)^2 \quad (2.14)$$

を、未知パラメータ $\alpha_1, \dots, \alpha_r$ に関して最小化する。

2.4 直径が一定の円管内を流れる血流の流体力学

管径 D が一定の円管を流れる血流が定常相流であるなら、その流れをハーゲン・ポアズイユ流と従うと考えることができる[31,32]。支配式が以下ようになる。円管の断面積 A は

$$A = \frac{\pi D^2}{4} \quad (2.15)$$

で示され、流量は Q [L/min]と置けば、平均流速 V は

$$V = \frac{Q}{A} \quad (2.16)$$

である。また、最大流速 v_{\max} は

$$v_{\max} = 2V = \frac{2Q}{A} \quad (2.17)$$

で示すことができる。また、円管の断面内の流速分布 $v(r)$ は

$$v(r) = \frac{2Q}{A} \frac{D^2 - 4r^2}{D^2} \quad (0 \leq r \leq D/2) \quad (2.18)$$

であり、せん断応力の分布 $\tau(r)$ は

$$\tau(r) = \frac{16Q\mu}{AD^2} r \quad (2.19)$$

で示される。 μ は血液の粘性係数である。せん断速度 γ は

$$\gamma = \frac{16Q}{AD^2} r \quad (2.20)$$

である。また、 $r=D/2$ の時に、せん断速度は最大になるので、最大せん断応速度 γ_{max} は

$$\gamma_{max} = \frac{32Q}{\pi D^3} \quad (2.21)$$

断面内の流速分布 $v(r)$ とせん断力分布 $\tau(r)$ は r に依存しており、図 2.7 に表されているように、 $v(r)$ は管中心で最大値をとる放物分布となる。また、 $\tau(r)$ は管壁で一番大きくなる。

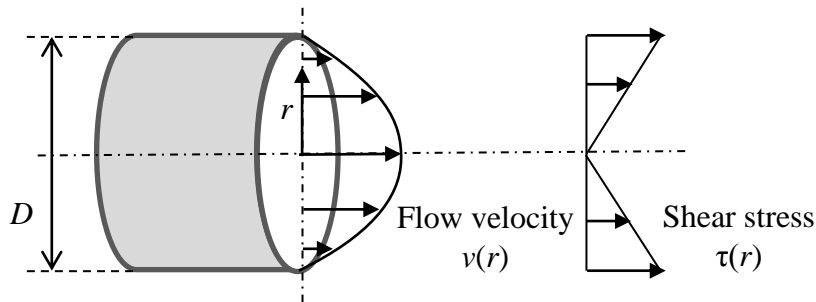


図 2.7 Blood flow in a cylindrical tube

3. 緩和周波数 f_c を用いた血液凝固反応過程における赤血球凝集速度

3.1 赤血球凝集と緩和周波数 f_c の関係

実験装置

図 3.1 に示されているように、実験装置は体外循環を模倣した密閉装置である。ローラーポンプ(RP-PLB; Furue Science K.K., Japan)、リザーバ(Senko Medical Instrument Mfg.Co.,Ltd, Tokyo, Japan)とチューブ ($3/8 \times 3/32$ inch, Senko Medical Instrument Mfg.Co.,Ltd)、流量計 (VNS10-F/E, Aichitokei Denki Co., Ltd, Aichi, Japan) で構成されている。流量計以外のものは、ヘパリンコーティングされている。そして、チューブの途中で図 3.2 で示されているようなリング電極ペアを設置した。このリング電極ペアを4端子対プローブ(Four-terminal probe L2000; HIOKI EE. K.K, Japan)でインピーダンスアナライザ (IM 7581: Hioki E.E. Corporation, Japan) に繋がっており、電極間の血液インピーダンスを計測する。リング電極ペアはステンレスでできており、それぞれの内径 d_1 は 9mm、外径 d_2 は 9.5mm、電極間は 60mm で、チューブで繋がっている。計測中、血液は常に電極に接続している状況にある。

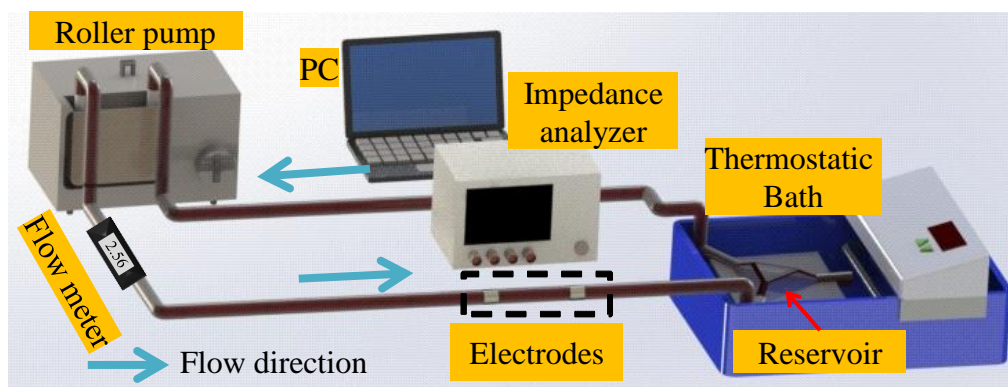


図 3.1 Experimental setup

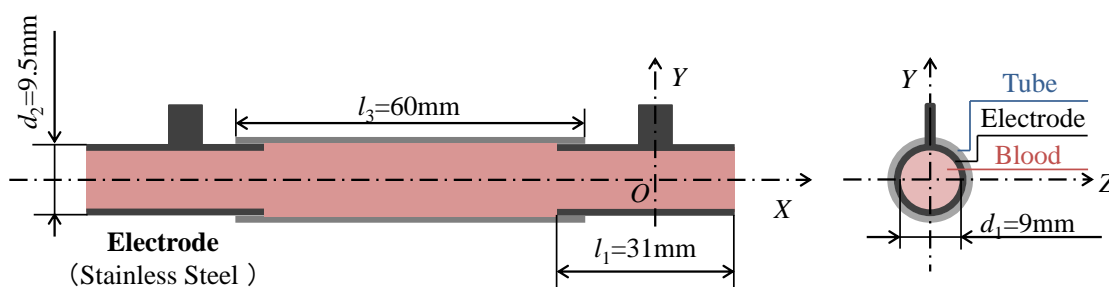


図 3.2 Electrodes

血液サンプル

第 2 章の 2.2 で説明したように、ブタ血液は赤血球凝集するが、ウシの血液には赤血球凝集現象が確認されていないため、本実験ではブタ血液及び比較用のウシ血液を用いた。血液検体(Shibaura Zouki K.K., Japan)には採血後、1:9 の割合で 3.24%クエン酸ナトリウム水溶液(Tri-Sodium Citrate Solution; Shibaura Zouki K.K., Japan)が添加されており、血液が自然に凝固しないようになっている。実験に使用する前の血液ヘマトクリット H (血液中の赤血球体積割合) を測定された。ピペット(Micropipet 3120, Eppendorf Corporation, Hamburg, Germany)を用いて、ヘマトクリット毛細管 3 本に血液を入れ、遠心分離機(Micro Hematocrit Centrifuge Model 3220, KUBOTA Corporation, Japan)を用いて回転速度 12000rpm で 5 分間遠心分離した後、ヘマトクリットを測定した。3 本の平均をとったのが血液検体のヘマトクリット H_{ave} になる。本実験に使用されたブタ及びウシ血液のヘマトクリットは表 3.1 に示されている。

表 3.1 Hematocrit H of blood sample

	H1	H2	H3	H_{ave}
Porcine[%]	40.9	40.9	40.7	40.8~41
Bovine[%]	43.0	43.3	42.6	43.0

実験条件

測定前にケーブル長 2m において、OPEN 補正、SHORT 補正を行った。印加する電流 i は 0.1mA であり、測定周波数 f は 100kHz から 3MHz まで 201 ポイント(Log scale)で掃引し、

一回の全周波数の掃引に約 1 秒がかかる。インピーダンスアナライザより得られた各周波数の Z 及び位相差 θ を用いて、以下の、

$$R_f = Z_f \cos \theta_f \quad (3.1)$$

$$X_f = Z_f \sin \theta_f \quad (3.2)$$

を用いて、各周波数の抵抗値 R 及びリアクタンス X を求める。ここで、 R_f , X_f , Z_f , θ_f はそれぞれ各周波数の抵抗値、リアクタンス、インピーダンス、位相差であり、 f は測定周波数である。各周波数の抵抗値 R 及びリアクタンス X を用いて、第 2 章の 2.2 で示したデータフィッティングの方法より Cole-Cole プロットを得る。Cole-Cole プロットより第 2 章の 2.1.2.2 で示した緩和周波数 f_c を求める。

また、リザーバは恒温槽に入っているため、循環血液は常に 37°C に保たれた。

実験方法

先ず、ブタ血液 700mL を実験装置に投入した。赤血球凝集は静止場及び低せん断場において起こる現象なので、本実験ではローラーポンプの回転速度を制御し、1 周期 $T=40$ 秒間の血流量を変化させた。最初の 24 秒では、ローラーポンプをフローコントロール目盛 60 で回し、残りの 16 秒は目盛 0 で回した。これを 3 回繰り返した。電気計測はローラーポンプが回し始めた時にスタートし、3 周期が終わる時に計測終了した。

ウシ血液にも、チューブとリザーバを変え、同じように 700mL を投入した後、上と同じ順番で実験を行った。

実験結果及び考察

図 3.3 にブタ血液及びウシ血液を使った流量 1 周期 T の間の赤血球凝集の緩和周波数 f_c 計測実験結果を示している。横軸は流量 1 周期分 $T=40$ 秒間であり、左側の縦軸は緩和周波数 f_c で、右側の縦軸は流量 $Q[\text{L}/\text{min}]$ である。黒い破線で示されているのは電磁流量計で計測した流量 $Q[\text{L}/\text{min}]$ の結果である。スタート時点でローラーポンプをフロー目盛 60 で回したら、流量 Q は徐々に増加し、およそ 2 秒のところから $2.65[\text{L}/\text{min}]$ になり、その後安定していた。また、24 秒で目盛を 0 に変えた結果、流量が徐々に 0 に減少して、およそ 26 秒のところから完全に 0 になった。

また、この流量 1 周期 T の間のブタ血液とウシ血液の緩和周波数 f_c の変化をウシが赤い実線で、ブタ血液は緑の線で示している。ウシの血液は流れ始めると、緩和周波数が徐々に 2.5MHz から減少し、流量 Q が完全に $2.65\text{L}/\text{min}$ になったときに、およそ 2MHz で安定した。また、24 秒で流れがストップすると、ウシ血液の緩和周波数 f_c が増加して、40 秒のときには、最初の静止状態と同じように 2.5MHz まで回復していった。

しかし、ブタ血液の結果には違いが確認された。最初、ポンプが回しはじめ、血液が流れると、緩和周波数 f_c が 1.75MHz から増加し始め、流量 Q が完全に 2.65L/min になったときに、2.05MHz で安定した。そして、24 秒で流れがストップすると最初の 2 秒ぐらいで 2.2MHz まで増加した後に、減少しはじめ、40 秒の時には、最初の静止状態と同じように 1.75MHz まで減少した。

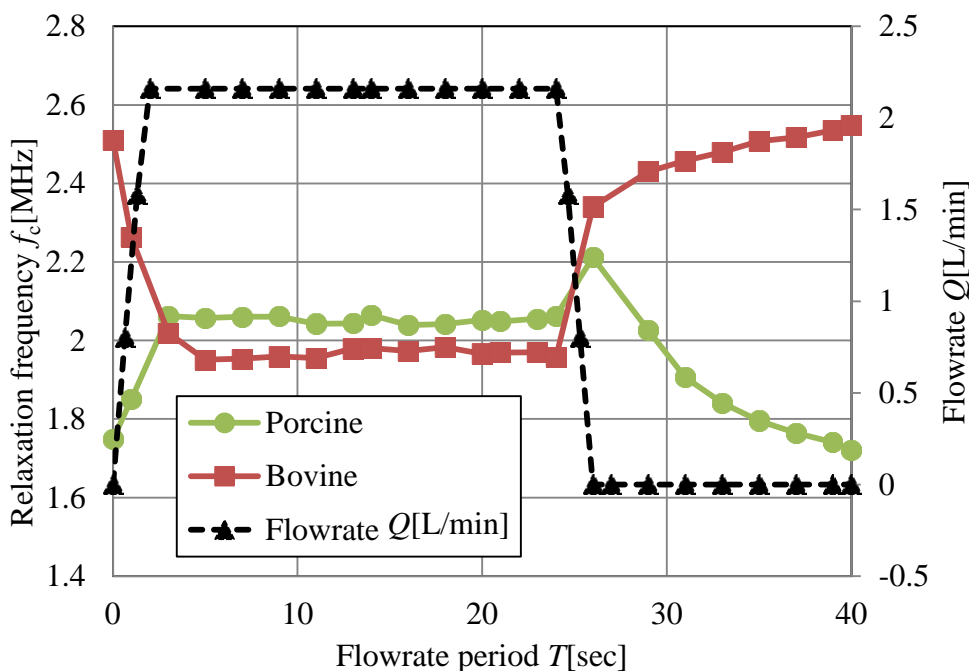


図 3.3 Change in relaxation frequency f_c with RBCs aggregation

流量 Q が 2.65L/min の時に、管壁付近に分布している赤血球に作用するせん断速度は式 2.21 により、

$$\gamma_{max} = \frac{32Q}{\pi D^3} = \frac{32 * 2.65 * 10^{-3}}{3.14 * (9.5 * 10^{-3})^3 * 60} = 525(s^{-1})$$

である。また、 $r=D/4$ におけるせん断速度は最大せん断速度の半分であり、およそ $262.5(s^{-1})$ である。Jules Dupire らの赤血球が流れにより配向する研究結果では、せん断速度が $12 s^{-1}$ 以上のところで、赤血球の長軸が流れ方法に配向することを示している[33]。いわゆる、図 3.4a に示されているように、本研究における流量 Q が 2.65L/min の時にチューブ内の殆どの赤血球が流れ方法に沿って配向していることが分かる。しかし、流量 Q が 0L/min になったときに、赤血球に働く流れの力がなくなり、赤血球同志の分子間反発力しかなくなったので、赤血球がランダムな配向になる。この配向の変化により、ウシ血液の緩和周波数 f_c が流れの状態から静止の状態に変わった時に、増加したと考えられる。

図 3.4b に示されているように、流れの状態から静止状態になったブタの赤血球は最初に流れの力がなくなったことにより、赤血球分子間反発力の働きにより、赤血球がランダムな配向になる。しかし、時間が経つにつれてウシ血液と違って、ブタ血液には凝集する現

象がみられる。その結果、図 3.3 に示されているように、ブタ血液の緩和周波数 f_c の計測結果として、流れがストップした後の f_c の増加し、その理由は上の理由と同じく赤血球の配向が変わったからである。しかし、その後の緩和周波数の減少はウシ血液にないブタの血液の変化であるため、赤血球凝集によるものである。

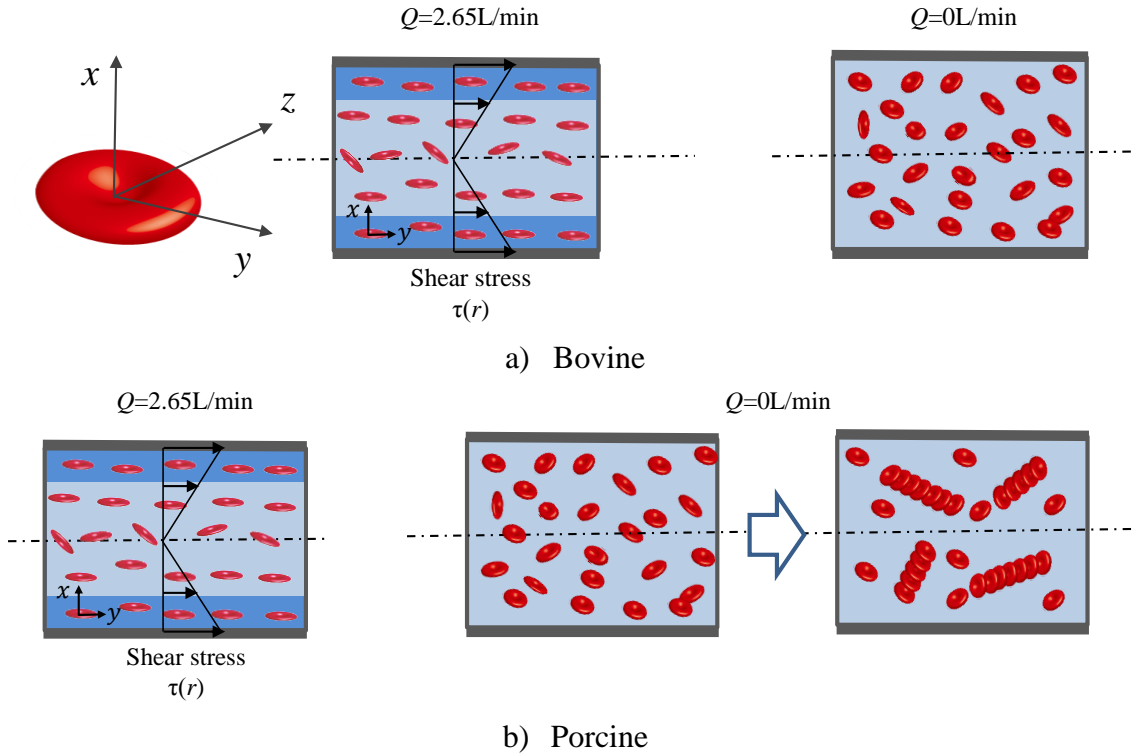


図 3.4 Change in relaxation frequency f_c with RBCs aggregation

従って、ブタ血液の場合、緩和周波数 f_c の減少を見ることで、赤血球凝集が評価可能であるとえられる。そこで、赤血球凝集速度 δ を次のように定義した。

$$\delta = \frac{f_c^{26} - f_c^{30}}{f_c^{26}} \quad (3.3)$$

f_c^{26} は最大緩和周波数であり、赤血球凝集が始まったタイミングの緩和周波数であり、また、 f_c^{30} は緩和周波数 f_c が 15% 減少したときの緩和周波数 f_c である。

一般的に赤血球凝集速度は動物の種類、そしてフィブリノゲンの量に依存しているので、検体により違う[25]。本実験で行った検体に対して、赤血球凝集速度 δ は 0.138 であった。

3.2 緩和周波数 f_c を用いた血液凝固反応過程における赤血球凝集速度

実験装置

図 3.5 に示されているように、実験装置は体外循環を模倣した密閉装置である。遠心ポンプ(Gyro Pump, Kyocera Medical Corporation, Osaka, Japan)、ヘパリンコーティングされているリザーバ(Senko Medical Instrument Mfg.Co.,Ltd, Tokyo, Japan)とチューブ (3/8×3/32 inch, Senko Medical Instrument Mfg.Co.,Ltd)、サンプリングポート (3/8×3/8, Senko Medical

Instrument Mfg.Co.,Ltd) 、流量計(T106, Transonic systems Inc., NY, USA)、血圧測定用アンブ(AP-641G, Nihonkoden Corporation, Tokyo, Japan)、とシリンジポンプ(FP-1000, Melquest Co., Ltd, Toyama, Japan)で構成されている。リザーバは恒温槽に入っているため、循環血液は常に 37°Cに保たれた。また、チューブの途中で図 3.2 で示されているような二つリング電極を設置した。この二つリング電極を 4 端子対プローブ(Four-terminal probe L2000; HIOKI EE. K.K, Japan)でインピーダンスアナライザ (IM 7581: Hioki E.E. Corporation, Japan) に繋がっており、電極間の血液インピーダンスを計測する。

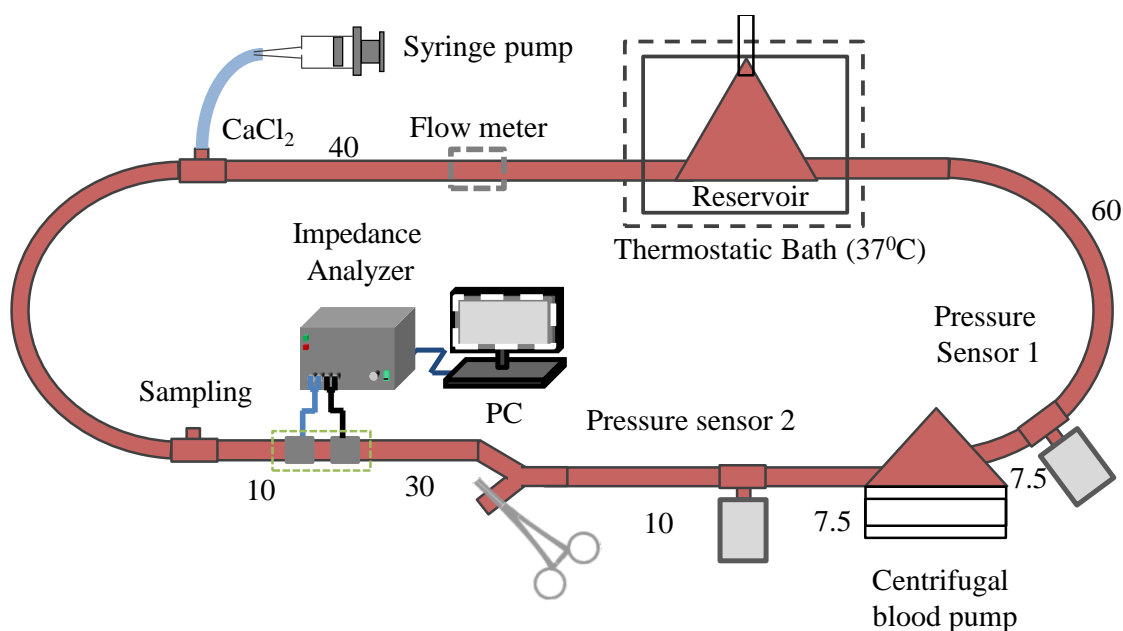


図 3.5 Experimental setup

実験条件・方法

コントロール実験

本実験ではブタ血液を用いた。血液検体は採血後、1:9 の割合で 3.24%クエン酸ナトリウム水溶液が添加されており、血液が自然に凝固しないようになっている。実験に使用する前の血液ヘマトクリット H を全自動血球数器(MEK-6550 Celltac α , Nihonkoden, Japan)で測定し、35.8%であった。

実験方法として、最初の実験装置に $V_{\text{blood}}=700\text{mL}$ のブタ血液を添加し、循環するブタ血液の温度が均等に 37°Cになるように、流量 $Q=4.3[\text{L}/\text{min}]$ で 15 分間回していた。その後、生理食塩水 Phosphate buffered saline: PBS (0.01mol/L, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) を $V_0=10\text{mL}$ サンプルポートより添加した。この生理食塩水の 1L に入っている成分を表 3.2 に示しており、生体内で普遍的に見だされるイオンで構成されているために無毒である。また、等張になるように調整されているため、血液に添加しても無作用である。10mL の PBS を添加した後に、シリンジポンプを使用し、流量 $Q'=0.1\text{mL}/\text{min}$ で PBS を添加

していた。

実験中の赤血球凝集速度の変化を観察するために、最初の PBS $V_0=10\text{mL}$ の添加終了時から、遠心ポンプの回転数を変え、流量の制御を行っていた。流量の 1 周期 T は図 3.6 のように示されている。実験中この制御を繰り返し、 n 回行った。

実験は 120 分で行われたため、実験全体で入れていた PBS の量 V_1 は

$$V_1 = V_0 + Q' * 120 = 10 + 0.1 * 120 = 22[\text{mL}]$$

であり、また繰り返した流量 1 周期 T の回数 n は

$$n = \frac{120 * 60}{40} = 180 \text{ 回}$$

電気計測の条件は 3.1.3 で示した計測と同じである。最初の PBS $V_0=10\text{mL}$ の添加終了時から、計測開始し、実験終了時まで連続計測していた。Cole-Cole 解析より得られた流量の 1 周期 T の緩和周波数 f_c を用いて、各周期の始まりの緩和周波数 f_c^{nT} に対して、残りの緩和周波数データを相対化した。

$$f'_c = \frac{f_c^{nT+t}}{f_c^{nT}} \quad (0 \leq t \leq 40, 0 \leq n \leq 180) \quad (3.4)$$

また、各流量周期 T における、赤血球凝集速度 δ_n を

$$\delta_n = \frac{f_c^{nT+26} - f_c^{nT+30}}{f_c^{nT+26}} \quad (3.5)$$

のように定義した。

そして、実験開始後から 10 分毎に $30 \mu\text{L}$ の血液をサンプリングポートより取り、全自動血球数器(MEK-6550 Celltac α , Nihonkoden, Japan)で赤血球数(Red blood cell count)、ヘマトクリット H 、白血球数(White blood cell count)、血小板数(Platelet count)を計測した。血球数を調べるために、合計で 13 回血液を取り出した。また、実験中の血液凝固能及びフィブリノゲン量の変化を調べるために、30 分毎に 6.5mL の血液をサブリングポートより取り出して、 4.5mL の血液は 0.5mL クエン酸ナトリウムが既に入っている遠沈管に入れ、よく混ぜた後に、遠心分離機にかけ血漿を取り出す。この血漿を用いて、CA50(Sysmex coporation, Kobe, Japan)でフィブリノゲンを計測する。採血した 6.5mL の血液の残り部分である 2mL の血液を活性化全血凝固時間装置(Hemochron[®] Response, Accriva Diagnostics, San Diego, USA)で活性化全血凝固時間 ACT を計測する。ACT 及びフィブリノゲン濃度を調べるために、合計で 5 回採血した。ACT の計測原理として、採血した血液をカオリンという活性化剤が入っているテストチューブに入れ、フィブリンが形成されるまでの実感を計測する。ACT が短ければ短いほど血液凝固反応が速く起こり、血液凝固能が高いということである。

本実験において、血球数、ACT およびフィブリノゲン計測に使用した血液体積 $V_{\text{blood used}}$ は

$$V_{\text{blood used}} = 13 * 30 * 10^{-3} + 5 * 6.5 = 32.89[\text{mL}]$$

表 3.2 Composition of 1L Phosphate buffered saline

Components	Amount
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.45g
Na ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	3.225g
NaCl	8g

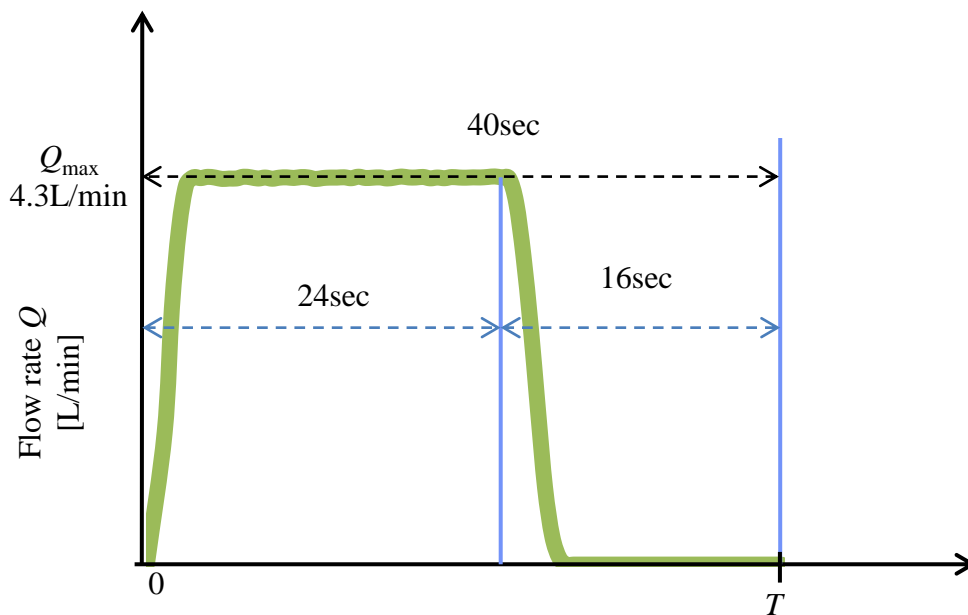


図 3.6 Flowrate Q

血液凝固実験

本実験ではブタ血液を用いた。血液検体は採血後、1:9 の割合で 3.24%クエン酸ナトリウム水溶液が添加されており、血液が自然に凝固しないようになっている。実験に使用する前の血液ヘマトクリット H を全自動血球数器(MEK-6550 Celltac α , Nihonkoden, Japan)で測定し、35%であった。

実験方法として、最初に実験装置に $V_{\text{blood}}=700\text{mL}$ のブタ血液を添加し、循環するブタ血液の温度が均等に 37°C になるように、流量 $Q=4.3[\text{L}/\text{min}]$ で 15 分間回していた。その後、血液凝固反応を促すために、塩化カルシウム溶液(Otsuka Calcium Chloride Injection 2%, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd, Japan)を $V_0=10\text{mL}$ サンプルポートより添加した。この最初の塩化カルシウム添加が終わった時を実験開始時 $t=0$ とする。その後、シリンジポンプを使用し、流量 $Q'=0.1\text{mL}/\text{min}$ で引き続き塩化カルシウム溶液を実験時間 $t=0$ から 37 分及び $t=66$ 分から 132 分の間、添加していた。

実験中の赤血球凝集速度の変化を観察するために、3.2.2.1 で示したように、実験開始後から、遠心ポンプの回転数を変え、流量の制御を行っていた。流量の 1 周期は図 3.6 のように示されている。実験中この制御を繰り返し、 n 回行った。

実験は 180 分で行われたため、実験全体で入れていた塩化カルシウム溶液の量 V_1 は

$$V_1 = V_0 + Q' * (37 + 66) = 10 + 0.1 * 103 = 20.3[\text{mL}]$$

であり、また繰り返した流量 1 周期 T の回数 n は

$$n = \frac{180 * 60}{40} = 270 \text{ 回}$$

電気計測の条件は 3.2.2.1 で示した計測と同じである。実験開始時後から計測開始し、実験終了時まで連続計測していた。

そして、実験開始後から 10 分毎に $30 \mu\text{L}$ の血液をサンプリングポートより取り、全自動血球数器(MEK-6550 Celltac α , Nihonkoden, Japan)で赤血球数(Red blood cell count)、ヘマトクリット H 、白血球数(White blood cell count)、血小板数(Platelet count)を計測した。血球数を調べるために、合計で 20 回血液を取り出した。また、実験中の血液凝固能及びフィブリノゲン量の変化を調べるために、30 分毎に 6.5mL の血液をサンプリングポートより取り出して、4.5mL の血液は 0.5mL クエン酸ナトリウムが既に入っている遠沈管に入れ、よく混ぜた後に、遠心分離機にかけ血漿を取り出す。この血漿を用いて、CA50(Sysmex coporation, Kobe, Japan)でフィブリノゲンを計測する。採血した 6.5mL の血液の残り部分である 2mL の血液を活性化全血凝固時間装置(Hemochron[®] Response, Accriva Diagnostics, San Diego, USA)で活性化全血凝固時間 ACT を計測する。ACT 及びフィブリノゲン濃度を調べるために、合計で 7 回採血した。

本実験において、血球数、ACT およびフィブリノゲン計測に使用した血液体積 $V_{\text{blood used}}$ は

$$V_{\text{blood used}} = 20 * 30 * 10^{-3} + 7 * 6.5 = 46.1[\text{mL}]$$

である。

実験終了時に 77mL のクエン酸ナトリウムを添加し、血液凝固反応を止め、循環流路内の血液を取り出して、実験中に形成した血栓を確認した。

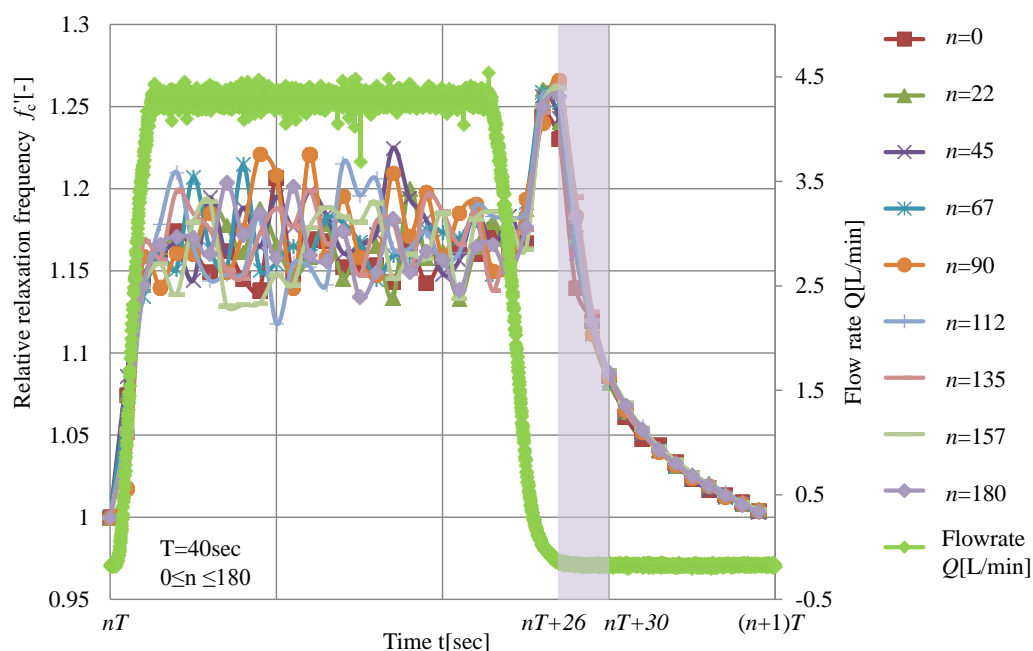
実験結果及び考察

コントロール実験

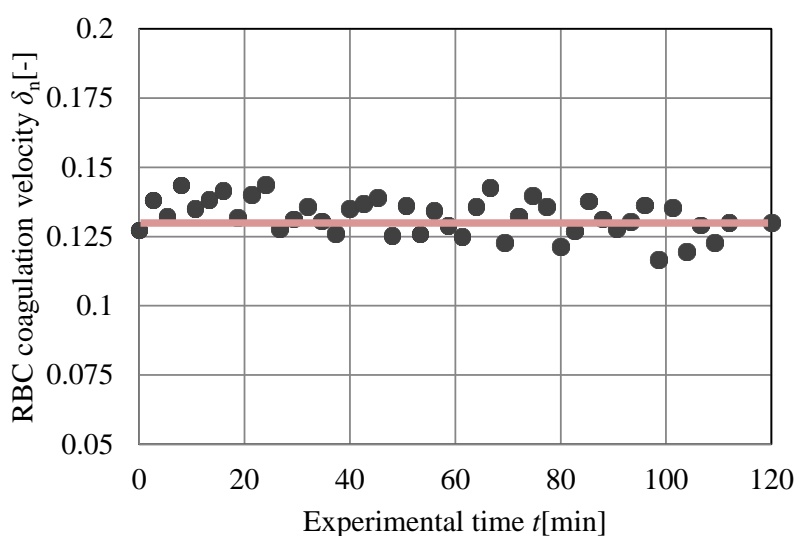
コントロール実験中の結果を図 3.7 に示している。コントロール実験中の全流量周期 T の緩和周波数 f_c 変化結果を重ねて、図 3.7a に示している。この実験では、実験中血液凝固能が維持されていたので、緩和周波数に変化が無かった。各流量流量周期 T において、流れが始めると f_c がおよそ 20% 増加し、その後一定の流量 Q で流れていると、 f_c が安定していた。流れが停止すると、最初に f_c が 25% ぐらいまで増加し、その後減少していった。

実験中の赤血球凝集速度の変化を見るために、式 3.5 を用いて赤血球凝集速度 δ_n を計算した。図 3.7b にその結果が示されており、実験中赤血球凝集速度が変化していなかった。

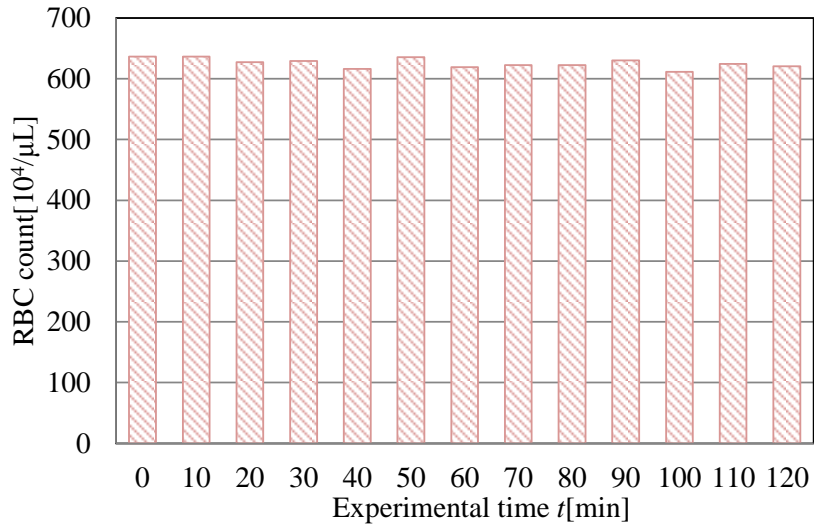
また、実験中の赤血球数、ヘマトクリット H 、白血球数、ACT、血小板数及びフィブリノゲン濃度の計測結果を図 3.7 c, d, e, f, g, h に示している。これらの血球数及び ACT とフィブリノゲン濃度は実験中維持されていた。ACT の計測限度を 1500 秒と設定していた。1500 秒以上は ACT の基準範囲より高く、血液は凝固しないことを意味している。実際の計測結果では、ACT は常に 1500 秒以上になっていたもので、1500 秒で計測を止めた。このように、血液凝固反応のない場合、つまり PBS を添加する実験においては血液の状態が維持され、血液凝固能も変わらず、赤血球凝集速度にも変化が無かった。



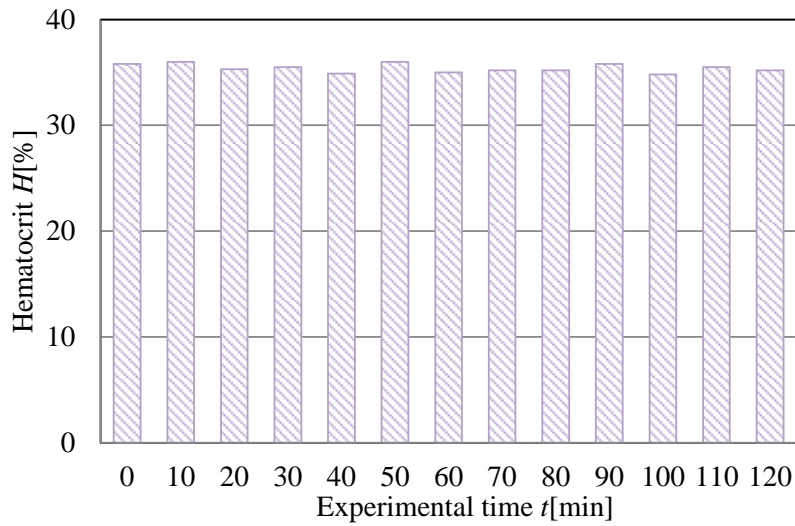
a) Relaxation frequency f_c



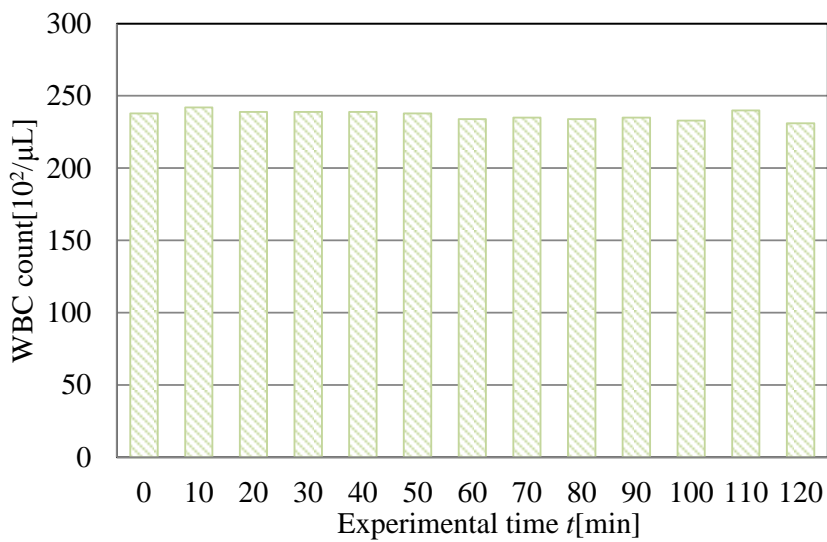
b) RBC aggregation index δ_n



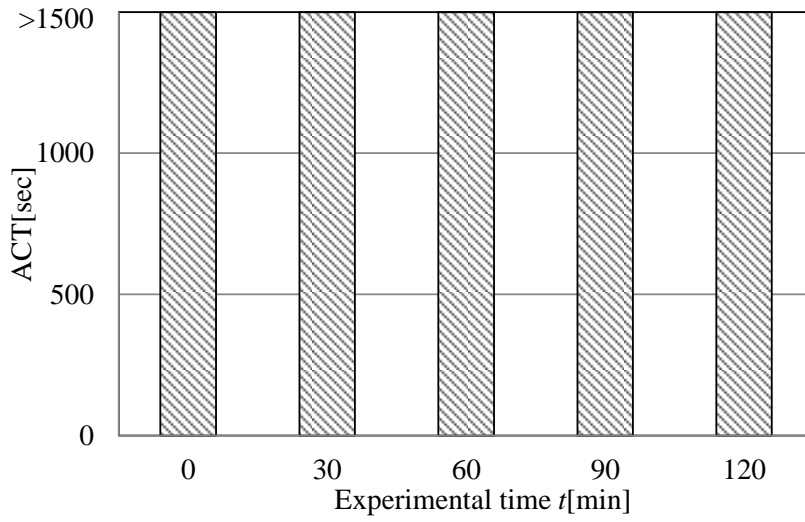
c) Red blood cell (RBC) count



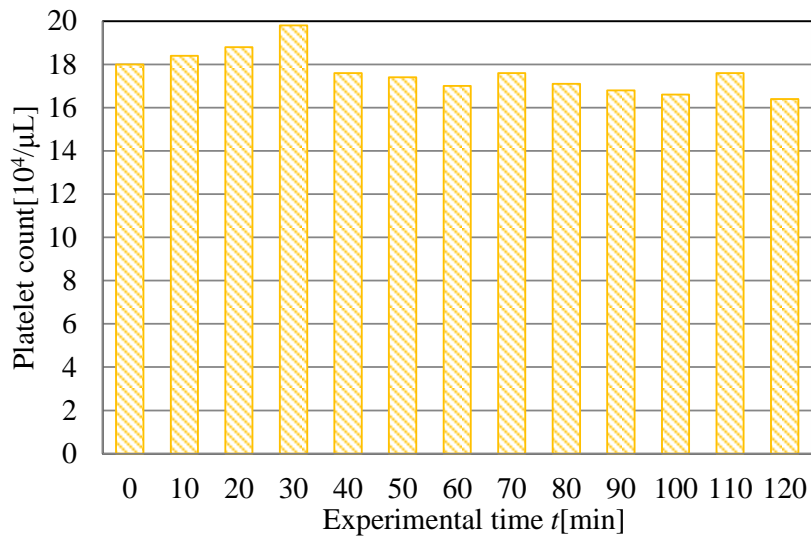
d) Hematocrit H



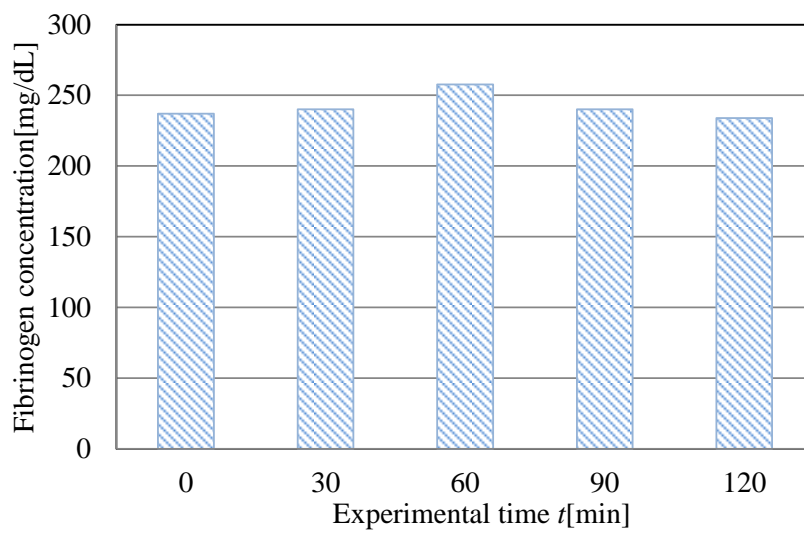
e) White blood cell(WBC) count



f) ACT



g) Platelet count



h) Fibrinogen concentration

☒ 3.7 Results of control experiment

血液凝固実験

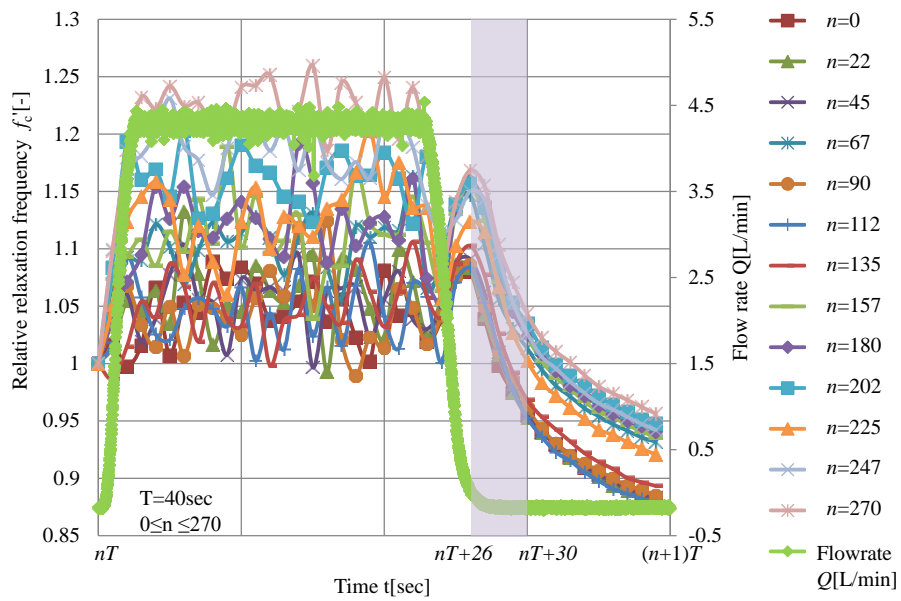
血液凝固実験中の結果を図 3.8 に示している。全流量周期 T の緩和周波数 f_c 変化を重ねて、図 3.8a に示している。この実験では、実験中塩化カルシウムの添加により血液抗凝固能が解消され、血液凝固反応が起こり、血栓形成していた。緩和周波数 f_c で見ると、 f_c が実験開始後から徐々に増加していったことが確認できた。

また、図 3.8b に赤血球凝集速度 δ_n の変化を示している。実験開始後からおよそ 90 分のところまで δ_n が 0.12 で維持されていた。しかし、90 分を過ぎたところから、 δ_n が急に減少し、実験終了時では 0.105 までなり、およそ 12.5% 減少した。つまり、90 分後から赤血球凝集速度が減少していた。図 3.8h に血液凝固実験におけるフィブリノゲン濃度の変化が示されている。実験開始後からフィブリノゲン濃度がおよそ 120mg/dL で維持されていたものの、90 分から急に減少し 180 分のところではおよそ 60mg/dL まで減少し、およそ半分になった。第 2 章の 2.2 で説明したように、赤血球凝集の原因はフィブリノゲンが赤血球同志を繋げるからである。そのために、本実験において、実験中血液凝固反応の進行によるフィブリノゲンがフィブリンになることからフィブリノゲン濃度が減少し、赤血球凝集速度が減少した。これにより、血液行反応過程における赤血球凝集速度を測定することにより、フィブリノゲン濃度をモニタリングできる。

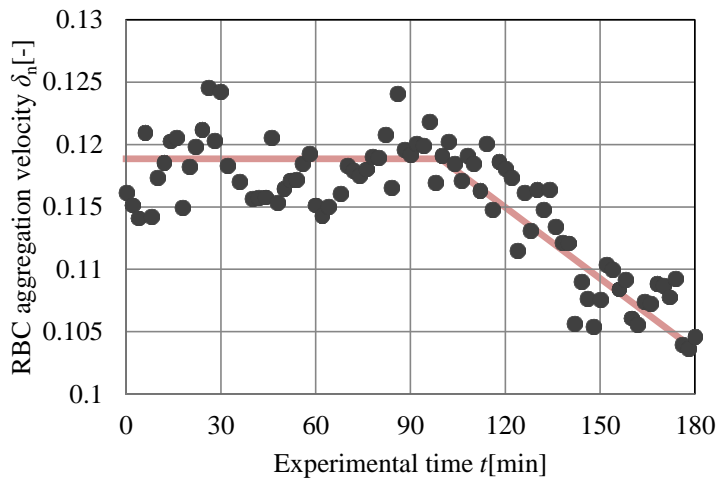
また、図 3.8c, d に赤血球数及びヘマトクリット H の変化が示されている。実験中赤血球数が変化しなかったことが示された。実験終了後に確認したポンプ内に形成した血栓は図 3.8i に示されている。このように本実験においておよそ 1cm の血栓しか形成されていなかったことにより、流動中の赤血球数が変化しなかったことから、赤血球数変化による赤血球凝集速度の変化が考慮しなくてよい。

図 3.8e に白血球数の計測結果が示されている。実験中白血球数が変化しなかった。白血球が血液凝固反応に関係しないことが分かる。また、図 3.8f, g に ACT および血小板数を示している。 $t=0$ の ACT は最初の塩化カルシウム V_0 を添加後の ACT である。この時の ACT は 150 秒になった。その後から ACT が徐々に減少し、実験終了時には 73 まで減少した。つまり、実験中塩化カルシウム溶液の添加により徐々に血液凝固能が高くなり、血液凝固反応が確実に起こっていたことが分かる。また、図 3.8h には血小板数を示している。血小板数も実験開始後から $20 \times 10^4/\mu\text{L}$ から徐々に減少し、実験終了時には $14.6 \times 10^4/\mu\text{L}$ まで減少していった。血液凝固反応に血小板が関与していることが分かる。

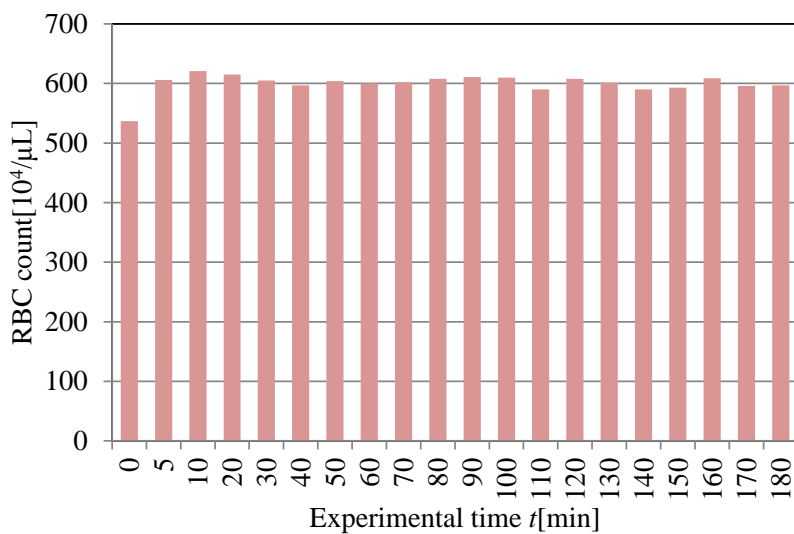
また、図 3.8j に赤血球凝集速度とフィブリノゲン濃度の相関係数が示されている。赤血球凝集とフィブリノゲン量が $y = 0.0002x + 0.0894$ で示され、相関係数 $R^2 = 0.7503$ である。



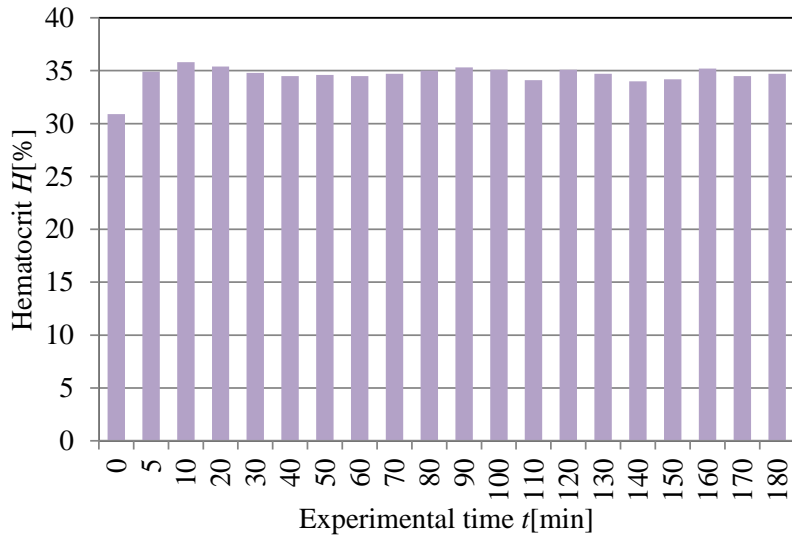
a) Relaxation frequency f_c



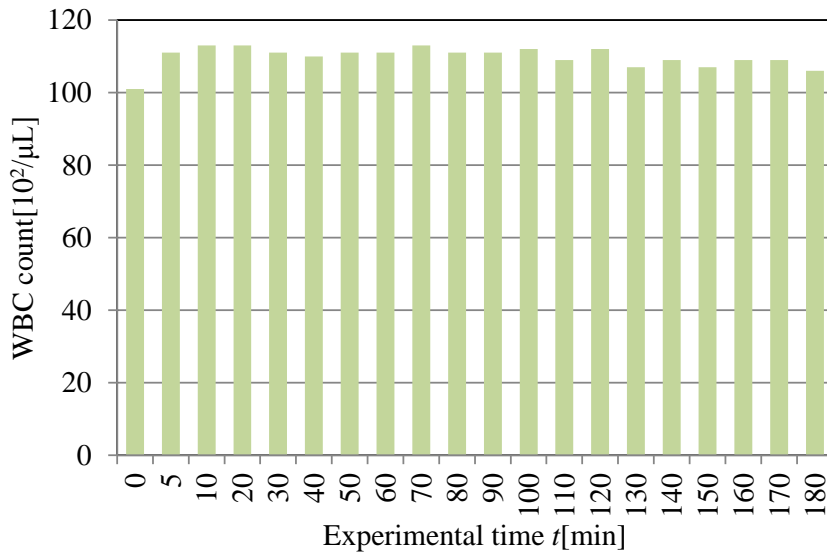
b) RBC aggregation velocity δ_n



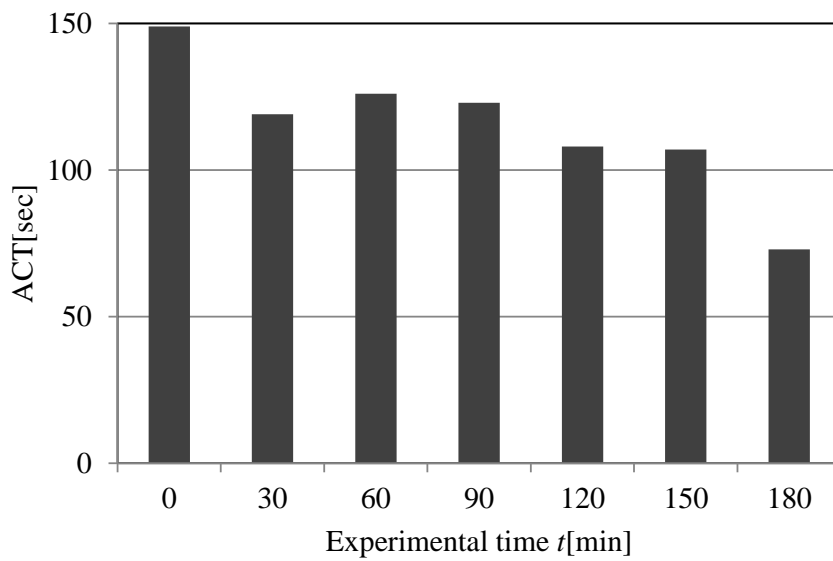
c) Red blood cell (RBC) count



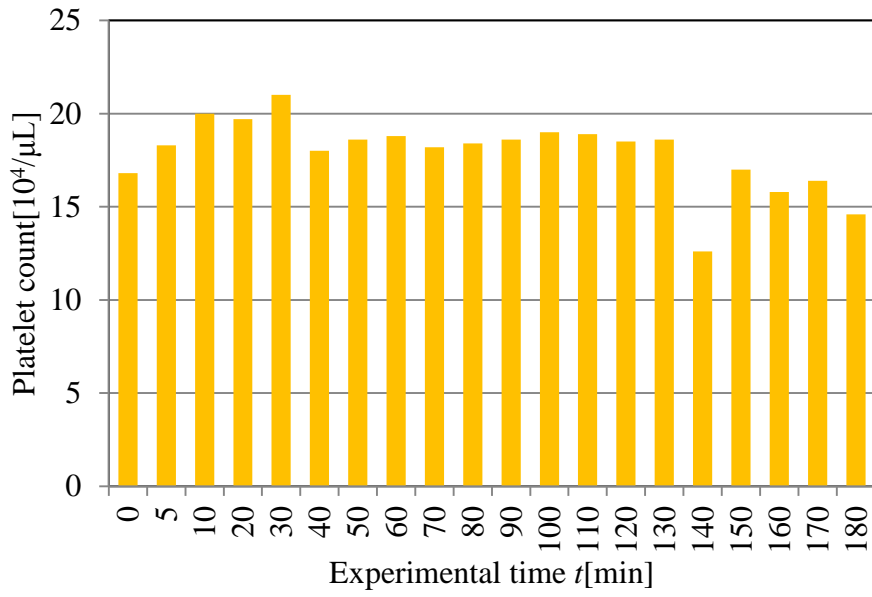
d) Hematocrit H



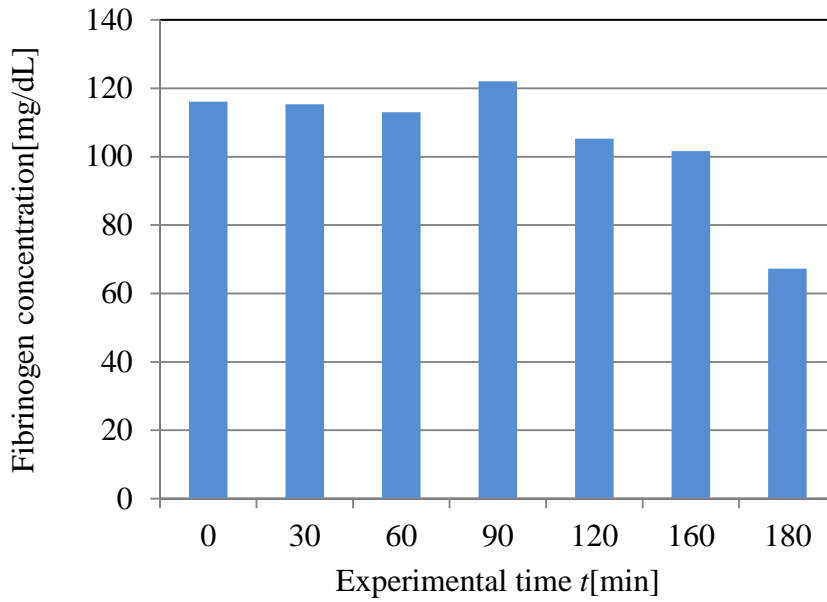
e) White blood cell(WBC) count



f) ACT



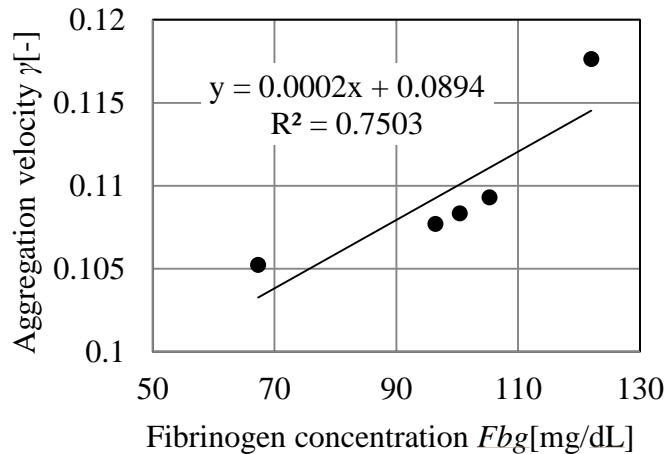
g) Platelet count



h) Fibrinogen concentration



i) Thrombus



j) Fibrinogen concentration and Aggregation velocity

図 3.8 Results of Blood coagulation experiment

4. 流動中における血液凝固反応過程の緩和周波数 f_c 計測

4.1 実験装置

実験装置は基本的に第 3 章 3.1.1 に示した装置と同じであり、しかし塩化カルシウム溶液添加のためのサンプリングポート (3/8×3/8, Senko Medical Instrument Mfg.Co.,Ltd) をチューブの途中につけていた。

4.2 血液サンプル

本実験では人血液の代わりに人血液に近いブタ血液を用いた。血液 3 検体 (Shibaura Zouki K.K., Japan) には採血後、1:9 の割合で 3.24% クエン酸ナトリウム水溶液 (Tri-Sodium Citrate Solution; Shibaura Zouki K.K., Japan) が添加されており、血液が自然に凝固しないようになっている。実験に使用する前の血液ヘマトクリット H (血液中の赤血球体積割合) を測定した。ピペット (Micopipet 3120, Eppendorf Corporation, Hamburg, Germany) を用いて、ヘマトクリット毛細管 3 本に血液を入れ、遠心分離機 (Micro Hematocrit Centrifuge Model 3220, KUBOTA Corporation, Japan) を用いて回転速度 12000rpm で 5 分間遠心分離した後、ヘマトクリットを測定した。3 本の平均をとったのが血液検体のヘマトクリット H_{ave} になる。本実験に使用されたブタ血液のヘマトクリットは表 3.1 に示されている。

表 4.1 Hematocrit H of blood sample

	H_{ave}
Sample 1 [%]	41
Sample 2 [%]	39.5
Sample 3 [%]	43.0

ヘマトクリット H つまり赤血球体積は血液の電気特性に大きく影響するので、検体 3 のヘマトクリットを変えた。そのために、607.5mL 検体 3 に対して 202.5mL 生理食塩水 Phosphate buffered saline: PBS (0.01mol/L, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan) を添加し、

ヘマトクリット $H=32\%$ の血液を作った。これにより、ヘマトクリット H がそれぞれ 41%, 39.5%, 32% の血液サンプルを用意できた。

4.3 実験条件

測定前にケーブル長 2m において、OPEN 補正、SHORT 補正を行った。印加する電流 i は 0.1mA であり、測定周波数 f は 100kHz から 3MHz まで 201 ポイント(Log scale)で掃引し、一回の全周波数の掃引に約 1 秒がかかる。インピーダンスアナライザより得られた各周波数の Z 及び位相差 θ を用いて、以下の、

$$R_f = Z_f \cos \theta_f \quad (4.1)$$

$$X_f = Z_f \sin \theta_f \quad (4.2)$$

を用いて、各周波数の抵抗値 R 及びリアクタンス X を求める。ここで、 R_f , X_f , Z_f , θ_f はそれぞれ各周波数の抵抗値、リアクタンス、インピーダンス、位相差であり、 f は測定周波数である。各周波数の抵抗値 R 及びリアクタンス X を用いて、第 2 章の 2.2 で示したデータフィッティングの方法より Cole-Cole プロットを得る。Cole-Cole プロットより第 2 章の 2.1.2.2 で示した緩和周波数 f_c を求める。

また、リザーバは恒温槽に入っているため、循環血液は常に 37°C に保たれた。

4.4 実験方法

先ず、ブタ血液を実験装置に投入した。その後に、血液の温度が均等に 37°C になるように、流量 $Q=2.16$ [L/min] で 15 分間血液を循環させていた。血液凝固反応を促すために塩化カルシウム溶液(0.02M CaCl_2 , Sysmex Corporation, USA)を添加した。各血液サンプルの添加量、塩化カルシウムの添加量および添加時間を表 4.2 に示している。最初の塩化カルシウムが終わった時に実験開始とし、 $t=0$ とする。電気計測は $t=0$ の時からスタートし、実験が終了するまでに連続で計測した。

実験の途中で、血液の状態を調べるために、6分から10分の間隔で 5mL 血液をサンプリングポートより採血した。0.36mL の血液は活性化全血凝固時間装置(Sonoclot Analyzer Model SC1, Sienco, Inc., USA)で活性化全血凝固時間 ACT を計測する。4.5mL の血液は 0.5mL クエン酸ナトリウムが既に入っている遠沈管に入れ、よく混ぜた後に、遠心分離機にかけ血漿を取り出す。この血漿を用いて、CA100(Sysmex corporation, Kobe, Japan)でプロトロンビン時間 PT とフィブリノゲン Fbg を計測し、遊離低濃度ヘモグロビン測定装置(Hemocue[®] Plasma/Low Hb System, HemoCue Corp. Sweden)で血漿内のヘモグロビン濃度を測定する。また、残りの 0.14mL の血液でヘマトクリット H 及び顕微鏡で血液観察に用いた。

表 4.2 Blood volume and CaCl₂ volume, addition time

	Exp.1		Exp.2		Exp.3	
$V_{\text{blood}}[\text{mL}]$	670		780		810	
V_{CaCl_2}	Time [min]	Volume [mL]	Time [min]	Volume [mL]	Time [min]	Volume [mL]
	0	130	0	120	0	90
	12	10				
	30	10				
	60	10				
	66	10				
	96	10				
Total volume CaCl ₂		180		120		90

4.5 実験結果及び考察

検体 1 を用いた実験 1 Exp.1 の実験結果を図 4.1 に示している。そして、検体 2、3 を用いた Exp.2, 3 を表 4.3 に示している。BE は実験開始前のデータである。Exp.2,3 も Exp.1 と同じ傾向の結果を示しており、再現性が取れている。

図 4.1a に流動中における血液凝固反応の緩和周波数 f_c の変化を示している。実験時間 $t=95$ 分から 115 分までを拡大して、図 4.1b に示した。このように、 f_c は実験開始後 2.48MHz から徐々に増加し、 $t_p=97$ 分のところでピーク ($f_c=2.6\text{MHz}$) を迎えた後、減少し $t_b=112$ 分まで減少した後にもう一回増加した。

本実験の f_c の増加した後に減少する結果は静止場で行われた血液凝固反応の f_c 計測と同じ傾向である[13]。

図 4.1c,d に ACT と PT の実験結果を示している。実験開始後から ACT と PT が徐々に減少し、ACT は 99 分でおおよそ 50 秒まで下がり、その後からは計測できなくなった。また、PT も同じく 105 分まで徐々に下がり、ここで 10 秒を下回った後に計測できなくなった。血液凝固能をオフラインで評価するパラメータである ACT と PT はフィブリンが形成されるまでの時間を示しているため、これらの値が計測できなくなったということはつまり、フィブリノゲンが無くなり、フィブリンが形成されたと考えられる。また、ACT はガラス粒子の添加により内因系が開始しフィブリンが形成されるまでの時間を計測し、血液の凝固能を評価する。一方で、PT 時間は外因系および共通系の凝固活性を総合的に評価する検査である。本実験では、塩化カルシウム溶液の添加により外因系の血液凝固メカニズムがスタートし、血栓が形成される。ACT および PT の減少した後に計測できなくなった結果からも外因系および共通系の活性化により血液凝固反応が起こっていた。

そして、実際のフィブリノゲンのデータは図 4.1e に示している。実験開始前のフィブリノゲンの濃度は 365.6mg/dL であった。しかし、実験開始後 3 分のフィブリノゲン濃度は 224.4mg/dL まで下がってから徐々に 75 分まで増加していった。フィブリノゲンの最初の減少は塩化カルシウム溶液の添加による体積の増加が原因であると考えられる。しかし、フ

フィブリノゲンは元々血漿内に含まれるたんぱく質なので、血液凝固反応過程において増加することがない。ここで見られた3分から75分までのフィブリノゲン Fbg の増加は見かけ上の値で、測定の誤差であると考えられる。CA101によるフィブリノゲンの測定原理として、血漿にトロピンを添加することにより血漿内のフィブリノゲンがすぐフィブリンになる。このフィブリンになるまでの時間を測定し、検量線と合わせ、フィブリノゲン濃度に換算する。ここでフィブリノゲンが増加した原因として循環中の血液内のトロピン量が血液凝固反応に伴い増加したことから、検査に使われるトロピン総量が増加したことが影響し、フィブリンの形成時間が早くなり、フィブリノゲンの量が増加したと考えられる。

しかし、75分後からフィブリノゲン量が下がり、105分では74.4mg/dLまでなり、117分では計測できなくなった。このフィブリノゲンの減少は血液凝固反応に伴うある量のトロピンが形成されてから、血液内のフィブリノゲンがフィブリンになったからである。John W. Weselらが計算によりフィブリン形成とトロピン濃度の関係を示した[34]。トロピン濃度が高くなれば高くなるほど、フィブリン形成時間が早くなり、またトロピン濃度が0.001unit/mLでは200秒までフィブリン形成開始しないことが分かっている。よりフィブリノゲン量の変化原因を明らかにするには本実験におけるトロピン濃度変化を明らかにする必要がある。

また、フィブリノゲンの変化で100分後からフィブリノゲンが計測できなくなったことから、上で説明したACTとPTがおおよそ100分のところから計測できなくなったことが解明できる。また、フィブリノゲンが減少する、つまりフィブリンが形成していることから、血液凝固反応が起こっていたことの裏付けになる。

フィブリノゲンの減少時間と緩和周波数 f_c の減少時間を合わせてみると、ほぼ一致していることが分かる。この緩和周波数 f_c の減少原因はフィブリン形成による赤血球がフィブリンに凝集したことが考えられる。NguyenらがHanaiの式を用いた赤血球凝集過程のシミュレーションを行い、赤血球凝集が進むにつれて、 f_c が減少したことが示されている[13]。

図4.1fに実験中のプロトロンビンの計測結果を示している。横軸は実験時間 t であり、左の縦軸はプロトロンビン量を%で、右縦軸はプロトロンビン量を秒で示している。このグラフで示しているように、実験開始後からプロトロンビンの量が増加していった。これも上でのフィブリノゲンの最初の増加と同じように元々プロトロンビンは血漿内に含まれるたんぱく質であり、増加することがない。しかし、実験中にトロピン量が増加することからプロトロンビンの計測結果に誤差が出ていた。

図4.1gに実験中のヘマトクリット H の結果を示している。実験開始後3分のヘマトクリットは実験前よりおおよそ3%減少した。これは実験開始時に塩化カルシウムの添加によると考えられる。3分から117分までヘマトクリットはほとんど変化しなかった。しかし、161分のところでは、 H は35.5まで減少した。ヘマトクリットの減少つまり循環血液内の赤血

球数が減少し、溶血が起こっていた。図 4.1h に血漿内のヘモグロビン濃度計測結果を示した。実験中ヘモグロビン量が徐々に増加していったことから溶血が起こっていた。

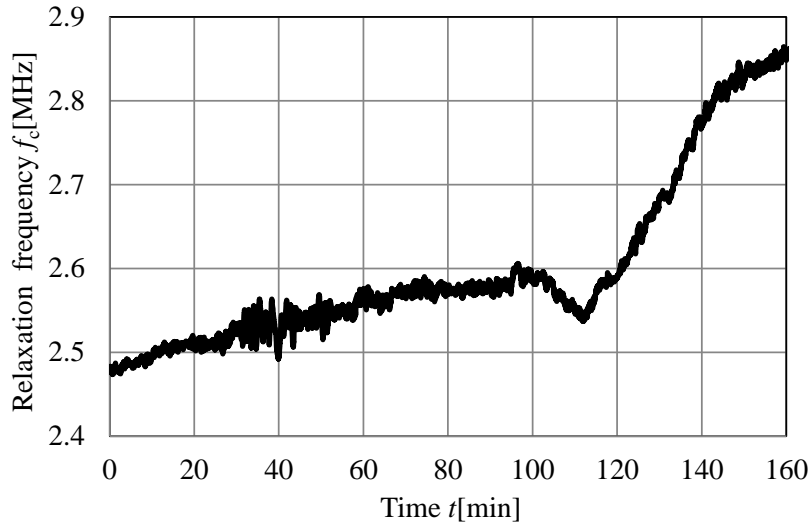
Ulgen らがヘマトクリットと緩和周波数 f_c の関係を示した[35]。ヘマトクリット H と緩和周波数 f_c が

$$f_c = -26.4371H + 2100.147[\text{kHz}] \quad (4.3)$$

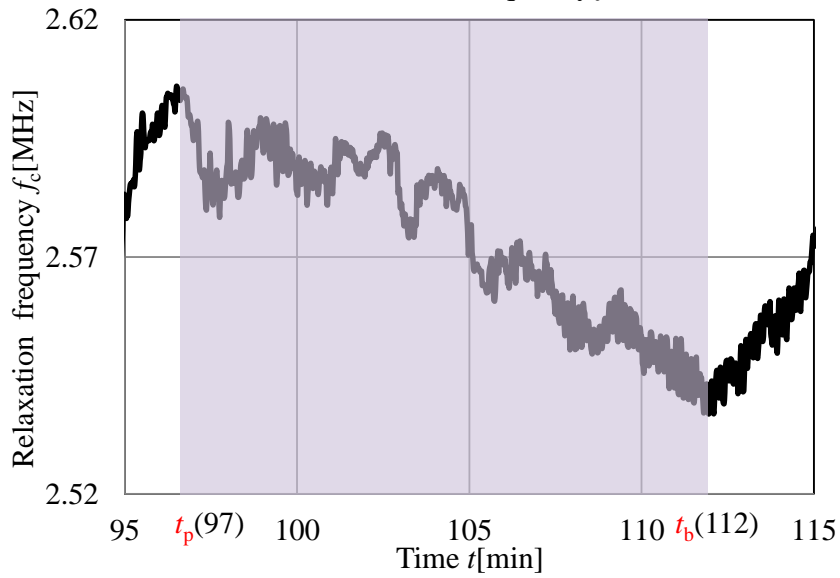
で表される。これによりヘマトクリットが減少すると、緩和周波数 f_c が増加することが分かる。これにより、 t_b 後の緩和周波数の増加は溶血減少によるヘマトクリットの減少が原因である。

表 4.3 Results of Exp.2 and Exp.3

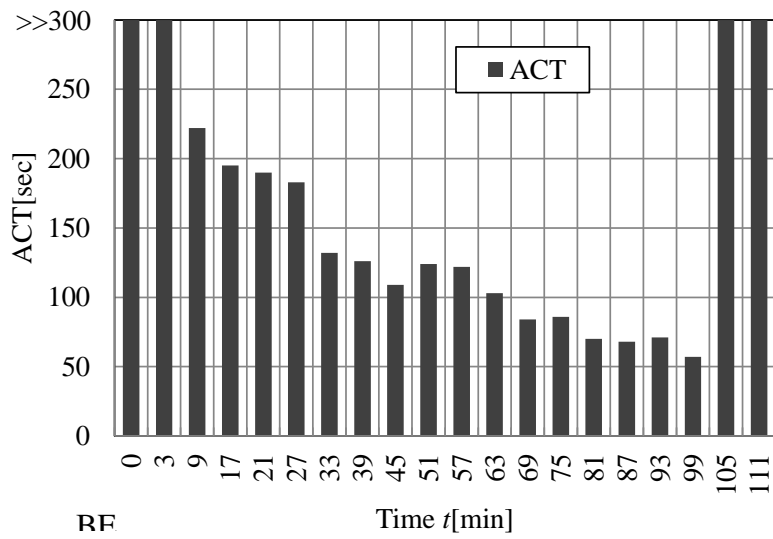
Time [min]	ACT (sec)	Fibrinogen [mg/dL]	Hematocrit H [%]	Hemoglobin in plasma [g/dL]
Exp.2				
0	Over 300	260	39.5	0.27
3(t_p)	79	260	38	0.16
9	Over 300	0		0.06
12(t_b)				
15	Over 300	0	38	0.06
27			37.8	0.06
39			36	0.07
75			33.2	
Exp.3				
0	Over 300	238.8	31.5	0
3	160	223.1	30	
9	135	238.4	30	
15	112	225.8	30.5	0.01
21	99	251.9		
27	56	286.3	31.5	0.02
33	56	223.7	31.5	
37(t_p)				
39	56	0		0.02
42(t_b)				
45	Over 300	0	31	
51	Over 300	0		0.02
57	Over 300		30	0.03
63				0.02



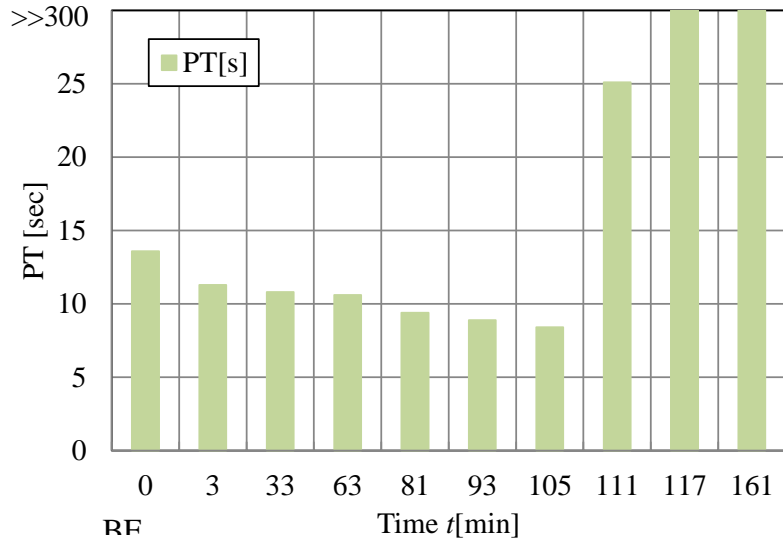
a) Relaxation frequency f_c



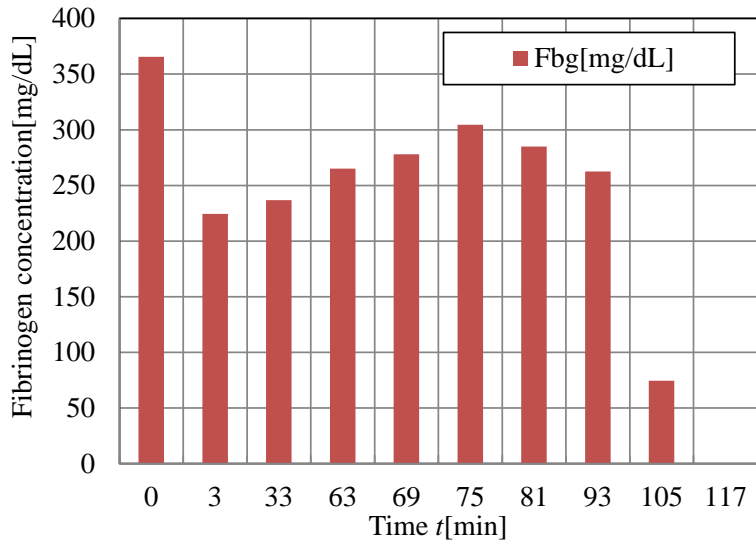
b) Relaxation frequency f_c from 95min to 115min



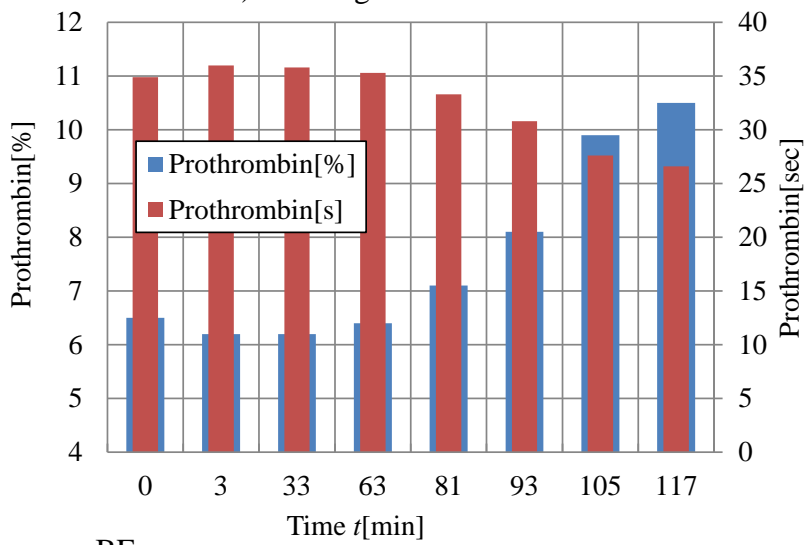
c) ACT



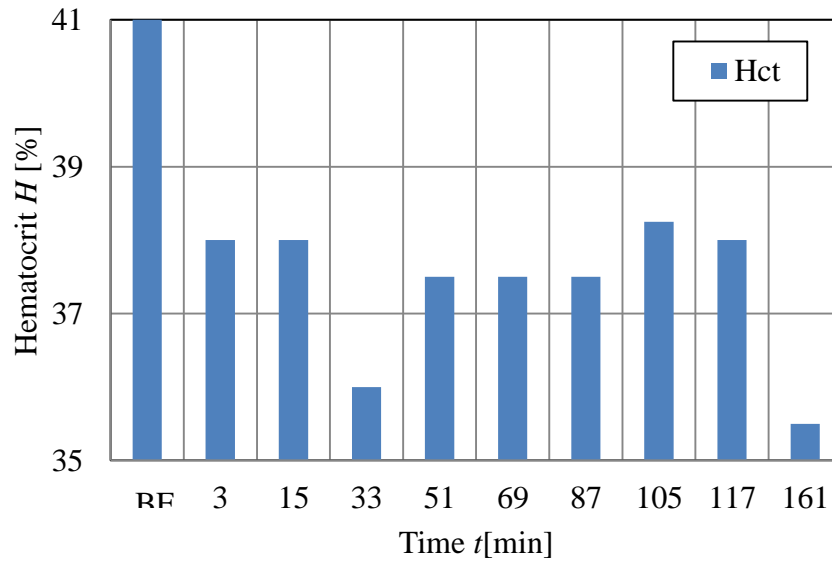
d) PT



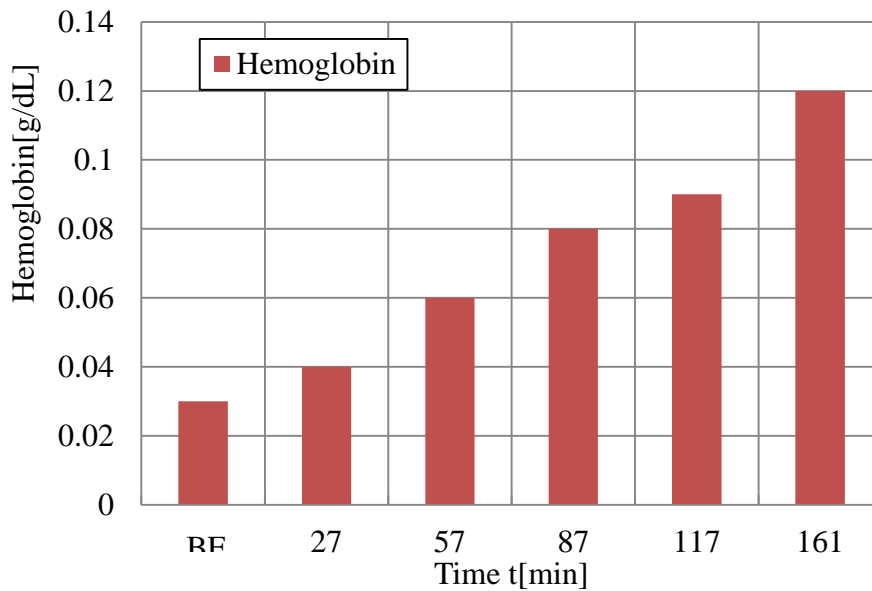
e) Fibrinogen concentration



f) Prothrombin amount



g) Hematocrit H



h) Hemoglobin inside plasma

図 4.1 Results of blood coagulation experiment on a flowing condition
BE: Before experiment

5. 結言

本研究では、フィブリノゲンの赤血球凝集及び血液凝固反応における役割に着目し、緩和周波数 f_c を用いた血液凝固反応過程における赤血球凝集速度の変化を明らかにした。そして、緩和周波数 f_c を用いた流動中の血液凝固反応過程を測定し、緩和周波数 f_c の時間変化を明らかにした。また、血液凝固検査 ACT、PT およびフィブリノゲンの時間変化と緩和周波数 f_c の時間変化を比較し、緩和周波数 f_c の時間変化原因について検討した結果、以下のことが明らかになった。

- (1) 赤血球凝集を緩和周波数 f_c で測定した結果、赤血球凝集に伴い緩和周波数 f_c が減少した。赤血球凝集速度 γ を緩和周波数 f_c の減少する傾きと定義すれば、0.138 になった。赤血球凝集と緩和周波数 f_c の関係が明らかになった。
- (2) 血液凝固反応過程における赤血球凝集速度 γ の時間変化が明らかになった。最初の 90 分間赤血球凝集速度 γ が 0.12 で維持されたものの、90 分後から徐々に減少していき、実験終了時の 180 分では 0.105 までなり、12.5%減少した。オフライン計測より得られたフィブリノゲン濃度の時間変化は 90 分まで一定に保たれたものの、90 分後から減少した。
- (3) 赤血球凝集速度とフィブリノゲン濃度の相関的な関係が示された。血液凝固反応過程における赤血球凝集速度 γ をモニタリングすることにより、フィブリノゲン濃度をモニタリングできることが示された。
- (4) コントロール実験における赤血球凝集速度 γ の時間変化がなかった。実験中赤血球凝集速度 γ がほぼ一定に保たれた。
- (5) 流動中の血液凝固反応過程における緩和周波数 f_c は最初に増加した後に減少し、また増加した。緩和周波数 f_c の最初の増加した後減少するという変化は静止場で行った結果と同じである。実験中のフィブリノゲン濃度の時間変化を見ると、緩和周波数 f_c が減少した時間帯においてフィブリノゲン濃度も減少し始め、完全になくなるまでになった。緩和周波数 f_c の減少した原因はフィブリノゲンがフィブリンになったことによって、赤血球がフィブリンに凝集したからである。
- (6) 流動中の血液凝固反応過程における緩和周波数 f_c が最後に増加する原因は溶血によるヘマトクリット H が減少したからである。

ステージ 2

「微小血栓 4 D 可視化計測実験・検証」

達成目標	ステージ 1 で実現したシステムを血液循環流路内で実験するために、微小血栓の大きさ・量を制御できる血栓生成ユニットを製作し <i>in vitro</i> 実験を行う。そして、微小血栓大きさ(下方限界 20 μ m)、量(下方限界個数 1 個)、時間解像度 10 μ 秒の微小血栓検出を達成することを目標とする。
実施項目	研究内容および方法
【2-1】 血栓生成ユニットの製作	微小血栓の大きさ・量をトロンビン量と誘電泳動力により制御可能な血栓生成ユニットを製作する。
【2-2】 高速アルゴリズムの開発	緩和周波数は、いくつか検体により、バンドをもつ可能性がある。そこで、緩和周波数の周辺のいくつかの印加周波数を用いて、高速で最適周波数を探索するアルゴリズムの開発を行う。
【2-3】 血液循環流路における実験	血液ポンプを有する血液循環流路を構築し、 ステージ 1 で開発した可視化計測システムと、 【2-1】 の血栓生成ユニットを実装する。流量や供給量を変化させて、その微小血栓の大きさや分布を 4D モニタリングし、微小血栓の通過時間(横軸)、大きさ(奥行き軸)、および、量(個数)(縦軸)をデータベース化する。
【2-4】 シミュレーションによる検討	【2-3】 の条件において実験を行い、データベース化する。 【2-3】 の PST 法で得られた結果とを比較検討し、PST 法の精度を検証する。
【2-5】 考察と総合討論	総合的な討論とまとめ

ステージ【2-1】

【2-1】 血栓生成ユニットの製作

緒言(ステージ 2)

日本国内における死因は、厚生労働省の 2015 年人口動態統計月報年計の概況より、心疾患、脳血管疾患に起因するものがそれぞれ 15.3%、8.7%となっており、併せて約 24%が循環器系疾患によるものである。世界的に見ても、これらの疾患は過去 15 年間で主たる死因の一つになっていると 2015 年 WHO は報告している。

循環器系疾患の治療法として臓器移植がある。しかし、慢性的なドナー不足のため、患者は数ヶ月、数年と待たなければならないこともある。人工臓器は移植までの待機期間の一時的な治療法として利用されており、また 2002 年には補助人工心臓の永久使用が FDA (U S Food and Drug Administration) によって条件付で承認されている。このように人工臓器は重篤な循環器系疾患を患う患者にとって大きな希望となっている一方で、大きな問題となっているのが、血液と人工物が接することによって血栓が形成されることである。血栓形成という問題に対して、体外血液補助循環装置を用いた治療では、定期的に抗凝固薬を投与することで血栓形成を防いでいる。抗凝固薬を投与するタイミングと量の最適化のためには、血液の凝固能などの状態を把握することが必要である。そのために ACT (Activated clotting time) を計測する方法が広く使われているが、これには採血が必要でありさらに計測はリアルタイムとは言えない。そこで、血栓形成をオンラインで予測・検出できるモニタリングシステムが必要となるが、このようなシステムは未だに構築されていない。この理由の 1 つとして、血栓形成メカニズムが完全に解明されていないことが挙げられる。

これまでに、血液基礎や血栓に関する数多くの研究が行われてきた。Oshima et al. や Sakota et al. は光学的手法を用いて、血栓検出を行った。Huang et al. や Sato et al. は超音波計測を用いて、血栓検出の可能性を示した。しかしながら、これらの計測方法では、人工臓器に生体適合性材料や、コーティングを用いた場合の計測が困難であることや、血栓と気泡の判別が困難であるといった問題点が存在する。

一方、これらとは異なる計測方法として、血液の電気特性を用いた手法が挙げられる。電気的手法の特徴は、生体を傷つけることなく計測が可能であること、周波数特性を容易に計測できること、装置を比較的安価で製作可能なことなどである。血液の抵抗率を用いた研究として、Hoetink et al. は血液の抵抗率を血漿の抵抗率、Hematocrit (赤血球の体積分率, Hct)、赤血球の配向係数を用いて示した。また、Zhao et al. や Pop et al. は血液凝固因子の 1 つであるフィブリノゲンと抵抗率の関係を示した。

本研究では、電気的手法の中でも赤血球の状態を強く反映し、非接触計測が比較的容易なキャパシタンス計測を用いた血栓検出、血液状態の判別を行う。これらの既往研究では、静止場における血栓形成過程のキャパシタンス計測について、Baskurt et al. はキャパシタンスの計測結果が赤血球凝集と高い相関関係を有することを示している。Hayashi et al. は pH を調整した溶液に赤血球を分散させたサスペンションを作り、赤血球の形状を変化させ、その形状の変化がパーミティビティに及ぼす影響を調べた。また、Hayashi et al. は電極の付いた小型セルを用いて凝固を促進させた血液のパーミティビティを計測することによって血液の凝固能を測れるシステムを考案した。血栓形成のパーミティビティ変化は 3 つのステップに分かれており、一つ目のステップでは赤血球の連銭、二つ目のステップでは凝固反応による赤血球の凝集によってパーミティビティが増加する。そして三つ目のステップでは凝固反応に伴う赤血球形状の変化によってパーミティビティが減少すると報告されている。また、血栓が形成された後に起こる線溶のパーミティビティ計測では、パーミティビティが減少することが報告されている。Asakura et al. らは、人工的に任意の大きさの血栓を作り、それをセル内の静止血液中に投下しキャパシタンスを計測した。血中の血栓の体

積が増加するとキャパシタンスも増加することを示した。このように、静止場での血栓形成や線溶をキャパシタンスもしくはパーミティビティによって計測できることがわかっている。しかし、流動場におけるキャパシタンス計測結果については報告されておらず、シミュレーションにおいても、血栓の形成過程は非常に複雑であり、かつ完全には解明されていないために電氣的なモデルをつくり評価することは困難である。

本研究室での既往研究として、二電極センサを用いた接触計測で、流動場における血栓形成過程が緩和周波数に及ぼす影響について調べられている。また、本研究室では、管路内における固液二相流の粒子濃度分布を非破壊非接触で電氣的に 3D 可視化計測する手法としてプロセストモグラフィ(PT)法を提案し、その手法を石油プラントやマイクロ流路に応用してきた。Asakura et al.は PT 法を血栓沈降の可視化計測に適用することで、血栓が測定管路断面通過時に相対空間導電率が減少することを明らかとしている。これらの可視化計測では、静止場において血液の Hct の増加や血栓形成過程においてキャパシタンスが増加することが明らかとなっているが、流動場における血液の可視化には至っていない。

1. 研究目的

本研究では細胞を一行に配列させる従来の発想を根底から転換し、Takei らが開発した積層電極内装型マイクロチャンネル[24-26]を用いて細胞の空間的濃度分布計測を行う。この計測は電気インピーダンス・トモグラフィー (Electric Impedance Tomography, EIT) 法を基本原理としたものである。流路外周に配置した各電極間のインピーダンス Z を測定し、画像再構成アルゴリズムにより垂直断面の濃度分布を計測する手法である。この方法は従来の光計測手法とは異なり、大量の細胞が存在する超高濃度場においても、非接触かつ 1ms の高速で濃度分布を取得できる。

本研究では細胞懸濁液の誘電特性と積層電極内装型マイクロチャンネルの特異形状を併用し、EIS 法、EIT 法を用いた細胞濃度分布計測法の開発を行う。第一に EIS 法を用いて細胞の誘電特性を計測する。異なる体積濃度 ϕ を持つ細胞懸濁液の誘電特性をインピーダンスアナライザにより計測する。その後 Hanai Cell Model に基づいて確立された Maxwell-Wagner 分散理論と細胞分極モデルを用いて、計測した誘電特性を分析する。第二に EIT 法を用いて積層電極内装型マイクロチャンネル内における細胞濃度分布の画像化を行う。FEM ソフトウェアを用いて積層電極内装型マイクロチャンネルの垂直断面における細胞分布のモデルを作成し、画像再構成アルゴリズムについて考察する。その後、積層電極内装型マイクロチャンネルの各計測断面に設置された電極を用いてインピーダンス Z の計測を行い、画像再構成アルゴリズムを用いて画像化する。最後に EIS 法と EIT 法における計測結果の比較を行うことで積層電極内装型マイクロチャンネル内における誘電特性を用いた細胞の空間的濃度分布計測について検討することを目的とする。

本論文は 5 章構成となっており、第 1 章では研究背景と研究目的、第 2 章では実験に用いた積層電極内装型マイクロチャンネル、EIS 法、および EIT 法、第 3 章では EIS 法を用いた細胞の誘電特性計測、第 4 章では EIT 法を用いた積層電極内装型マイクロチャンネル内における細胞濃度分布の画像化と EIS 法との比較、第 5 章では結言について記した。

2. 理論

2.1. 積層電極内装型マイクロチャンネル

図 2.1 に本研究で使用した積層電極内装型マイクロチャンネルの詳細構造を示す。図 2.1(a) に示すように、流路断面の対角線長さは $D = 800\mu\text{m}$ であり、流路長さは $Z = 20\text{mm}$ である。また、マイクロチャンネルは透過性、高耐熱性を併せ持つ石英ガラスから構成される。マイクロチャンネル内部は図 2.1(b) に示すようにダイヤモンド型流路を持ち、流路内の 5 断面 (断面間距離 $Z_0 = 4.5\text{mm}$) にそれぞれ 8 層 16 電極 (電極間距離 $d = 80\mu\text{m}$ 、電極厚さ $k = 10\mu\text{m}$ 、電極幅 $w = 200\mu\text{m}$) が MEMS 技術によって埋め込まれている。マイクロチャンネルの 5 断面構成により、3 次元空間での細胞計測を実現している(各断面での電極組み合わせ x, y 平面、流路流れ方向 z 軸)。

マイクロチャンネルは 3 つの流入口と 3 つの流出口を持ち、それぞれ図 2.1(c) 中に示したホルダーに繋がっており、マイクロチャンネルはホルダーにより PCB 基盤に保持されている。また、マイクロチャンネル内に埋め込まれた白金電極は銅線によりマイクロチャンネル外縁へと導かれ、そこから銀材を用いて PCB 基盤上の電極へと接続されている。PCB 基盤上の電極の末端は pin 電極となっており、それを用いて計測器へと接続した。図 2.1(d) はマイクロチャンネルの拡大写真である

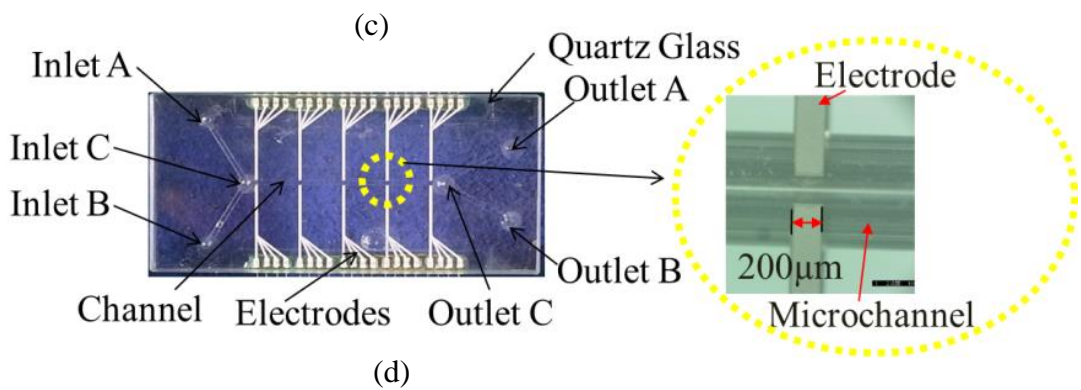
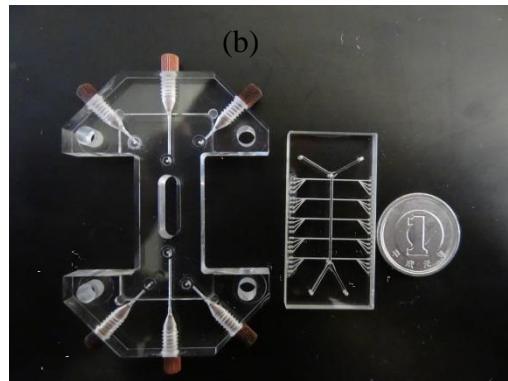
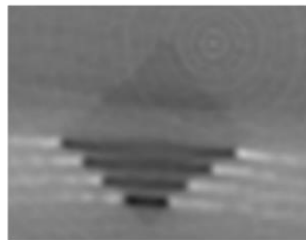
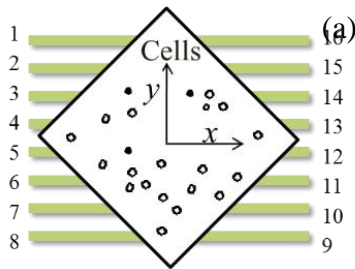
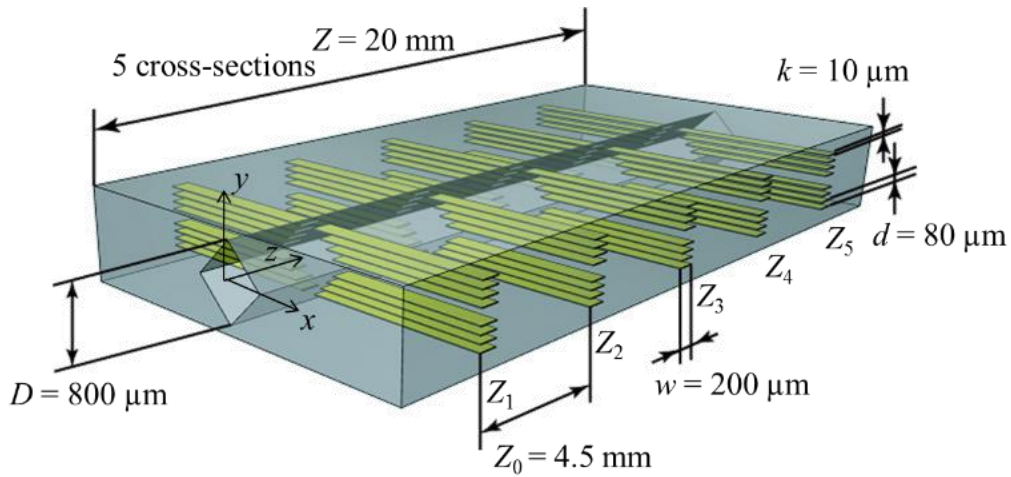


図 2.1 Schematic and micro-structure of the 3D multi-layered microchannel

2.2. 電気インピーダンス・スペクトロスコピー (EIS) 法

EIS 法では、測定対象物に交流周波数を掃引し、インピーダンス、電流と電圧の位相差を計測し、レジスタンスやリアクタンス、キャパシタンス、およびコンダクタンスを算出する。その周波数応答の違いから細胞内部や細胞膜、溶液の比誘電率 ϵ' 、誘電損失 ϵ'' などの電気特性量を求めることが出来る。本研究ではこの EIS 法を細胞の体積濃度計測や内部

構造の解析に応用する。

図 2.2 に細胞懸濁液の等価回路を示す。ここで R_s は溶液の抵抗、 R_{cyto} は細胞質の抵抗、 C_M は細胞膜のキャパシタンスである。低周波数帯では細胞膜のキャパシタンス C_M に起因するリアクタンス X_c が溶液の抵抗 R_s と比較して高いため、電流が溶液にのみ電流が流れる。しかし、高周波数帯においては、周波数が高くなるほど細胞膜のリアクタンス X_c が小さくなり、細胞内部にも電流が流れるようになる。

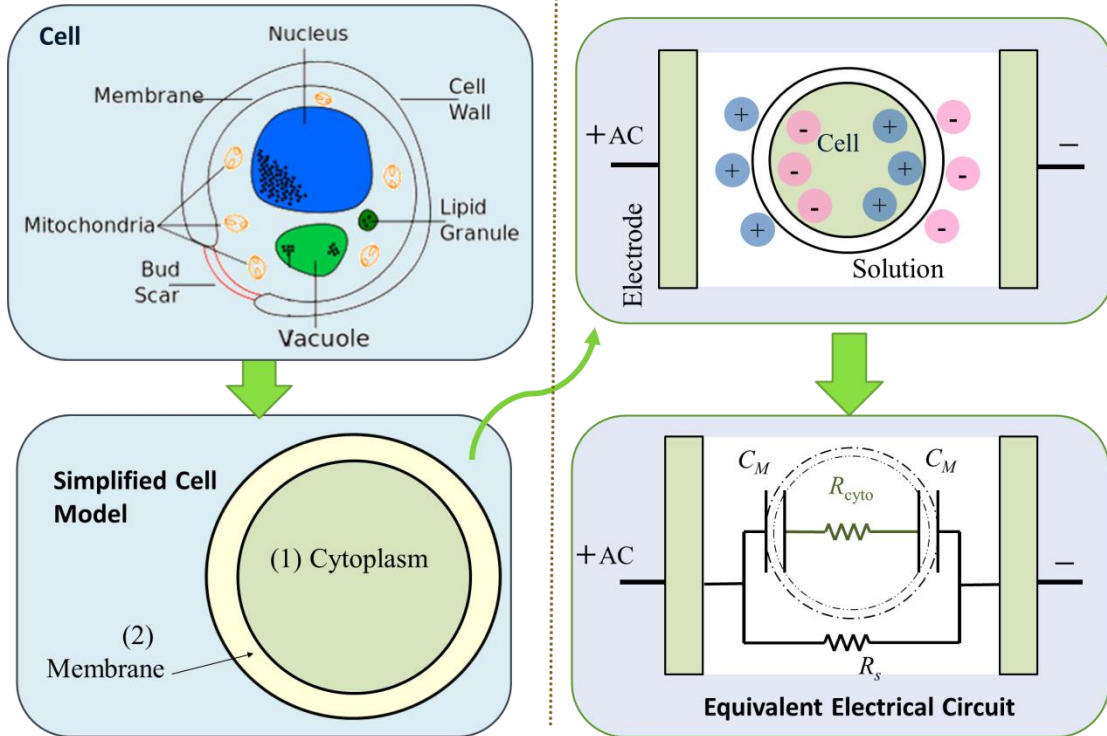


図 2.2 Electric equivalent circuit of cell suspension

3. EIS 法を用いた細胞の誘電特性計測

3.1. EIS 法を用いた静止場における細胞の誘電特性計測

実験装置、実験条件および実験方法

図 3.1 に本節で使用した実験装置概要を示す。シリンジポンプ、マイクロチャンネル、ファラデーケージ、インピーダンスアナライザ、および PC で構成されている。シリンジポンプはマイクロチャンネル内に細胞懸濁液を充填するために使用し、マイクロチャンネル流入口へと接続されている。ファラデーケージはマイクロチャンネルを囲うように設置され、外部から遮蔽することにより電磁的影響を低減している。図 3.2 に実験で使用したインピーダンスアナライザ (HIOKI IM3570) を示す。このインピーダンスアナライザは 4 端子法を用いて計測を行い、測定対象に 4Hz から 5MHz の交流周波数を印加し、インピーダンス特性を計測することができる。表 3.1 にインピーダンスアナライザの仕様を示した。PC はインピーダンスアナライザの制御、インピーダンス特性のデータ取得、インピーダンス・スペクトルの解析に用いた。

測定対象として、イースト菌細胞を用いた(図 3.3)。イースト菌細胞は遺伝子工学の初期段階として用いられる細胞の一つであり、他の細胞と同様に細胞膜、細胞質、細胞核を持っている。また、特徴として細胞壁を持つこと、取り扱いが非常に簡易であることが挙げられる。図 3.4 に細胞懸濁液の作成方法のフローチャートを示す。まず、イースト菌細胞粉末を純水に懸濁した後に体積濃度を計測し、それを元に純水を加えて、必要な体積濃度 Φ になるように調整を行う。懸濁液の入った容器を 37°C に保持された恒温槽に入れ、30 分

間発酵を行った。

はじめに、電極やケーブルにおけるセル定数 C_0 や寄生容量 C_r を求めるためにマイクロチャンネルが空の状態、つまり空気を充填した場合と純水を充填した場合のインピーダンス Z と位相差 θ を測定した。その後計測データから計測キャパシタンス C_m を算出し、計測キャパシタンス C_m とセル定数 C_0 、寄生容量 C_r の関係式[31]、

$$C_m = \varepsilon_r' C_0 + C_r \quad (3.1)$$

を空気を計測した場合、純水を計測した場合についてそれぞれ立て、連立方程式を解くことで C_0 と C_r を計算した。ここで、 ε_r' は各物質の比誘電率であり、空気は $\varepsilon_r' = 1$ 、純水は $\varepsilon_r' = 78.5$ とした。

次に、シリンジポンプを用いて細胞懸濁液をマイクロチャンネル内に充填し、計測を行った。細胞懸濁液は体積濃度 $\Phi = 10, 20, 30, 40\text{vol}\%$ のものを用い、計測はマイクロチャンネルにある 5 つの計測断面のうち中心にある第三断面 (Z_3) で行った。使用した電極組み合わせを図 3.5 に示す。マイクロチャンネル断面の各辺にある赤い電極をショートし、インピーダンスアナライザの測定プローブに接続した。下部 2 層の電極を使用したものを 2 電極での計測、3 層を使用したものを 3 電極での計測、4 層を使用したものを 4 電極での計測と呼ぶ。測定周波数 f は 10kHz から 5MHz で、印加電流は $I = 10 \text{ mA}$ で一定とした。測定データは各測定周波数 f につき 3 回計測したものの平均値をプロットし、更に周波数掃引を 3 回繰り返してその平均値を計測データとした。

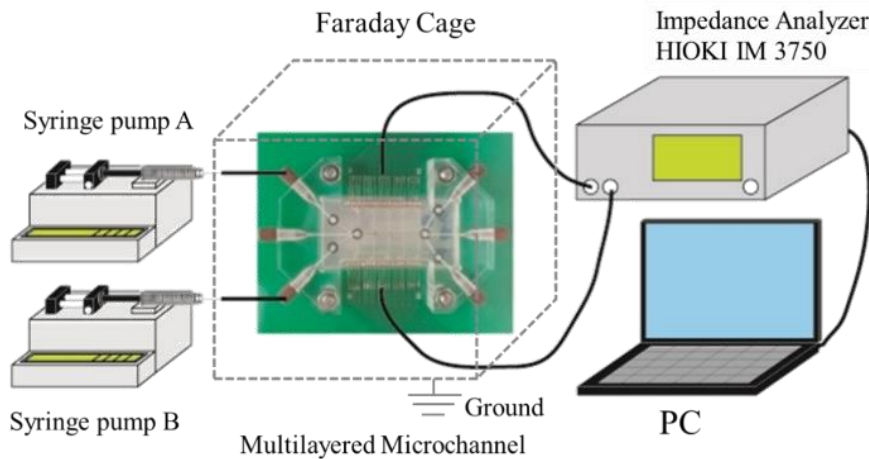


図 3.1 Experimental setup



図 3.2 Impedance analyzer (HIOKI IM3570)

表 3.1 Specification of Impedance analyzer

Manufacturer	HIOKI
Measurement mode	LCR, Sweep, Continuous
Measurement range	100mΩ~100MΩ
Measurement frequency	4Hz~5MHz
Measured voltage	5mV~5Vrms

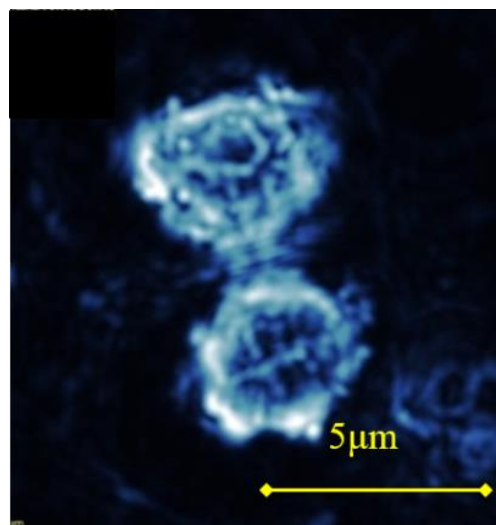


图 3.3 Microgram of Yeast cells

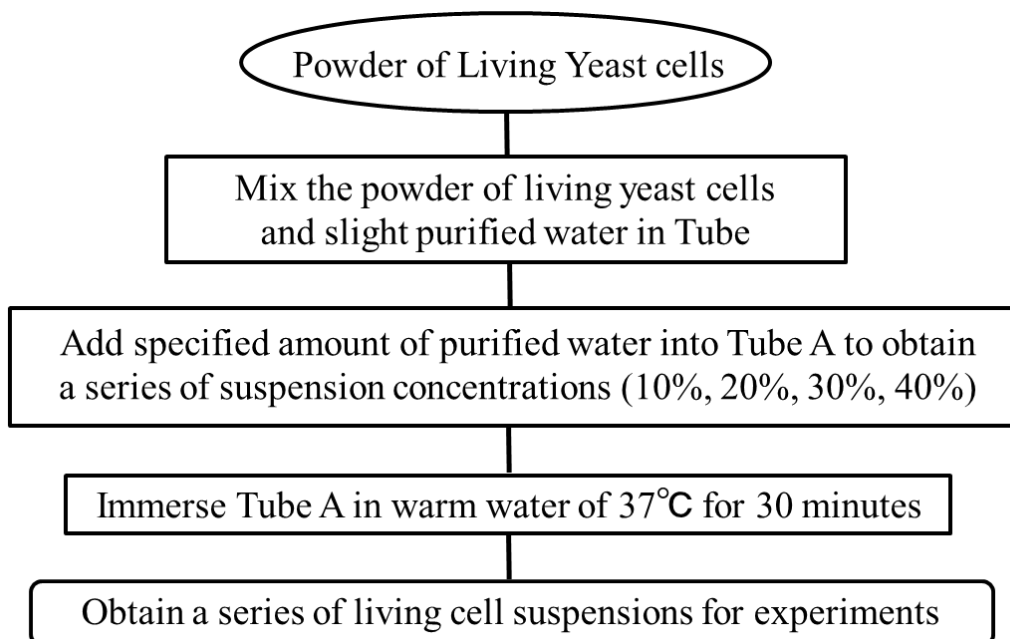


图 3.4 Flowchart of making yeast cell suspensions

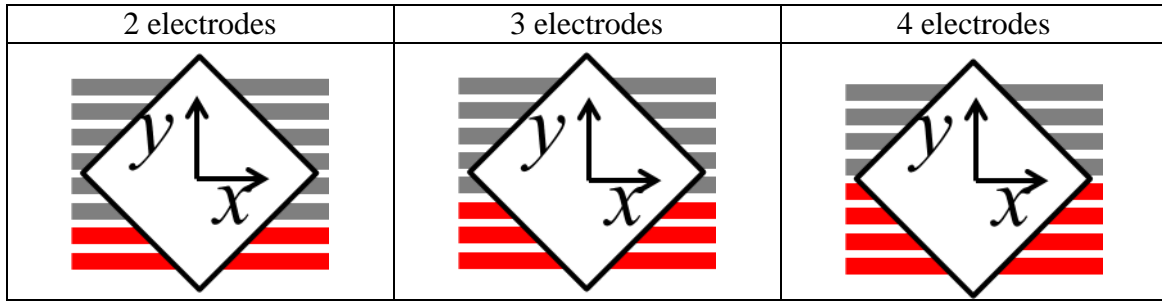


図 3.5 Measurement electrode pair

実験結果および考察

計測した Z および θ から、キャパシタンス C_p 、コンダクタンス G 、比誘電率 ϵ' 、導電率 σ 、誘電損失 ϵ'' を、

$$C_p = \frac{\sin \theta}{2\pi f Z} \quad (3.2)$$

$$G = \frac{\cos \theta}{Z} \quad (3.3)$$

$$\epsilon' = \frac{C_p - C_r}{C_0} \quad (3.4)$$

$$\sigma = \frac{\epsilon_0 G}{C_0} \quad (3.5)$$

$$\epsilon'' = \frac{\sigma - \sigma_L}{2\pi f \epsilon_0} \quad (3.6)$$

で算出した。ここで、 σ_L は直流導電率を表している。

体積濃度 $\Phi = 10\text{vol}\%$ の懸濁液を、2 電極、3 電極、4 電極で計測した場合の ϵ' の値を横軸に f をとって、図 3.6 にグラフ化した。各計測データに共通していることは、低周波領域において ϵ' が線形的に減少している点であり、これはマイクロチャンネルに設置された電極の電極分極が影響している。Schwan] が電極分極では低周波数帯において、金属電極と導電性溶媒の間に電気二重層が発生し、測定結果に無視できない問題が生じることを報告している。そのため、電極分極の影響を避けるために $f = 60\text{Hz}$ 以上での誘電スペクトルが主に研究されている。

$f = 100\text{k} \sim 2\text{MHz}$ にかけては細胞懸濁液の ϵ' が一定となっており、この現象は細胞を構成する様々な成分による界面分極 (Maxwell-Wagner 分極) が原因でもたらされる。使用した電極ごとに比較してみると 2 電極で計測した場合が、最も界面分極を起こす周波数範囲が広がっている。今後の結果においては 2 電極での計測についての結果を用いる。

図 3.7 に体積濃度 Φ の異なる懸濁液を 2 電極で計測した時の横軸 f 、縦軸 ϵ' のグラフを示す。懸濁液の Φ が増加するにつれて、 ϵ' の値が上昇することがわかる。これは、 Φ が高い懸濁液のほうが流路下部に体積する細胞の数量が多くなるため、より高い誘電緩和につながるからである。

図 3.8 に各測定周波数 f における、比誘電率 ϵ' と細胞懸濁液の体積濃度 Φ の関係を示す。図 3.8 から分かるように、 ϵ' と Φ の間には比例関係が成り立ち、これは様々なケースで適用でき、直線の傾きは f に依存する。また、Asami らはゲル中に静止したイースト菌細胞に電磁的手法を用い、測定周波数 $f=1\text{MHz}$ において、細胞濃度とキャパシタンスの間に相関係数 $R^2=0.998$ を持つ比例関係が成り立つことを報告している[8]。本研究における $f=1\text{MHz}$ での結果と Asami らの結果を比較すると、相関係数の差異からノイズによる誤差が認められるが、同様の傾向を示していることがわかる。表 3.2 に各周波数における Φ と ϵ' の直線近似式とその相関係数 R^2 を示す。この関係式を導いたことにより、誘電率を測定することでオンライン細胞濃度計測が可能であることが示唆された。

図 3.9 に Φ の異なる懸濁液における f と誘電損失 ϵ'' の関係を示す。 Φ が増加するにつれて懸濁液の抵抗成分が増えるため ϵ'' も増加する。また、各細胞懸濁液において、 ϵ'' にピーク値が現れることを確認出来る。それらのピーク値が発生する周波数が緩和周波数であり、 $f=100\text{k}\sim 4\text{MHz}$ の間に、4つの緩和周波数(f_{relax1} 、 f_{relax2} 、 f_{relax3} 、 f_{relax4})を確認できる。これらの緩和周波数については図 3.10 に示す Hanai らの細胞分極モデル[14]に基づいて説明することが出来る。生体細胞が溶媒中に懸濁されている場合、細胞が複数の層で成り立つと考えることで複数の誘電分散が伴うと考えられる。まず細胞表面においては電位変化に伴い電気二重層(EDL)が形成され、低周波数印加時($f_{\text{relax1}}=210\text{kHz}$)に α 分散を引き起こし、溶媒に接触する細胞と他の表面に重大な影響を与えている。また、 β 分散(界面分極もしくは Maxwell-Wagner 分散[33])は、細胞壁や細胞膜、細胞質などの細胞構成成分から生じる。接触している異なる構成成分間の界面において、原子の電磁相互作用により分極が起こる。そのため、イースト菌細胞の3つの構成要素が高周波数帯での3つの緩和周波数($f_{\text{relax2}}=1.6\text{MHz}$ 、 $f_{\text{relax3}}=2.6\text{MHz}$ 、 $f_{\text{relax4}}=3.0\text{MHz}$)に対応していると考えられる。特に最も高い周波数である f_{relax4} においては細胞懸濁液と細胞質の間に分極が生じることで、事実上細胞膜キャパシタンスが短絡し発生する[34]。また、緩和周波数を用いることにより細胞の大きさや細胞の生存状態を識別することも可能である。以上より、細胞懸濁液の誘電特性を計測することで、マイクロチャンネル内の細胞分布を非侵襲的に測定できる。

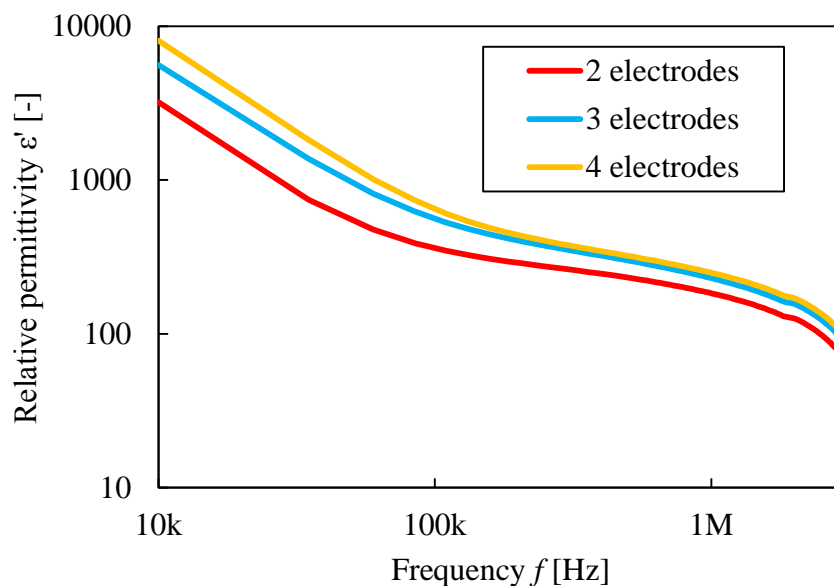


図 3.6 Dielectric spectra of cell suspensions with different electrode-combinations of the 3rd cross-section in Microchannel

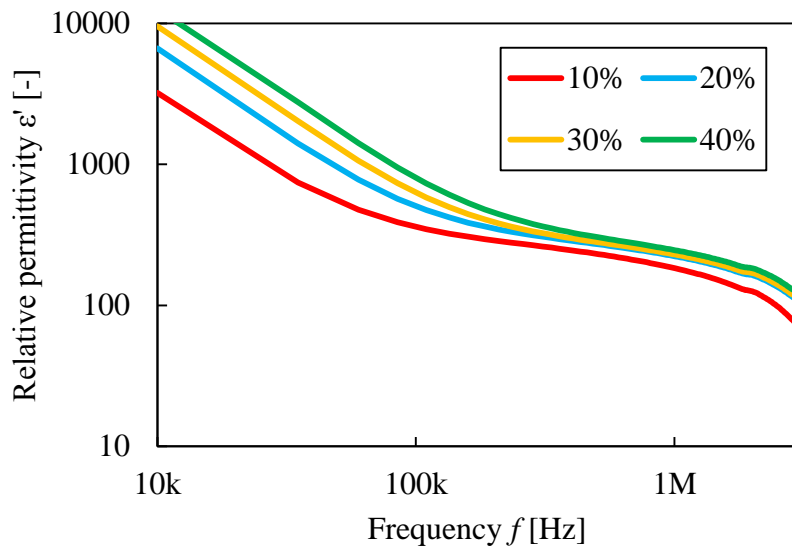


图 3.7 Dielectric spectra of cell suspensions with different concentration of the 3rd cross-section in Microchannel

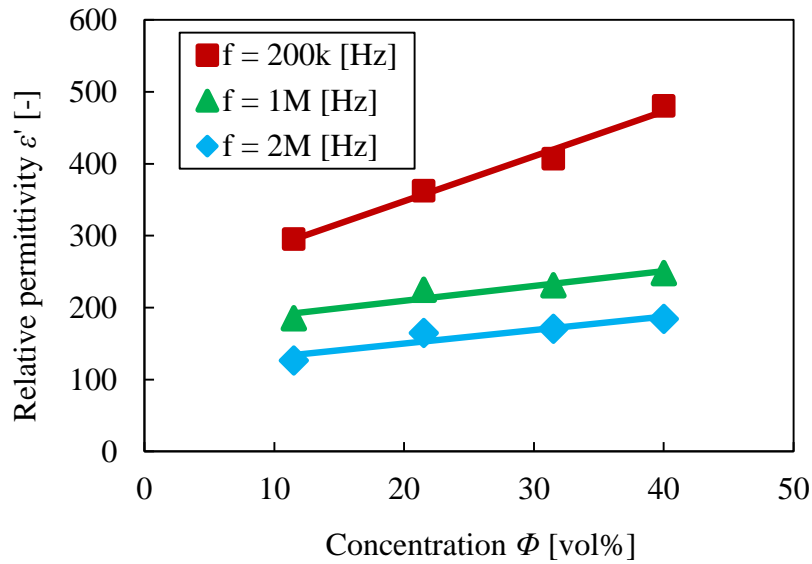


图 3.8 Linear relationship with AC frequency dependence between the relative permittivity and the concentration of cell suspensions with 2-pair of electrodes

表 3.2 Linear equations with AC frequency dependency for cell concentration calculation

Applied frequency	Linear equation	Coefficient of determination R^2
$f_1 = 200 \text{ kHz}$	$\Phi_1 = (\varepsilon' - 78.5)/6.25$	0.9866
$f_2 = 1 \text{ MHz}$	$\Phi_2 = (\varepsilon' - 78.5)/2.05$	0.9036
$f_3 = 2 \text{ MHz}$	$\Phi_3 = (\varepsilon' - 78.5)/1.88$	0.8859

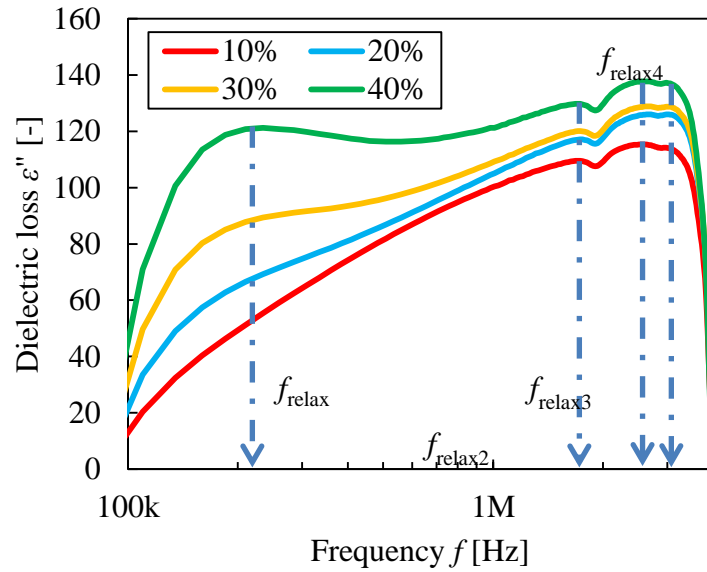


図 3.9 Relaxation frequency of different cell concentrations

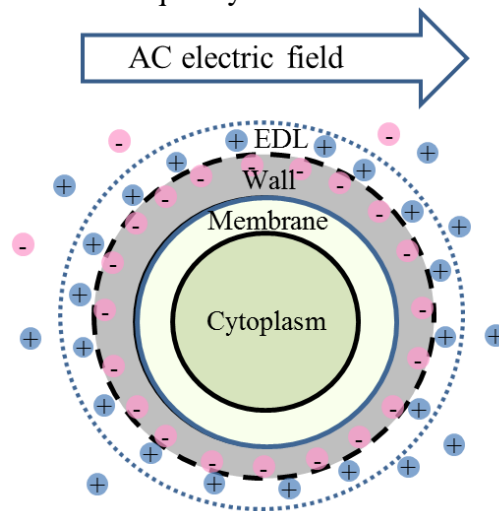


図 3.10 Cell polarization model in solution

3.2 EIS 法を用いた流動場における細胞の濃度計測

実験装置、実験条件および実験方法

前節において静止場における細胞の誘電特性計測から比誘電率 ϵ'' と体積濃度 Φ との間の比例関係を明らかとしたので、本節ではそれを応用し流動場での細胞体積濃度計測を行う。

実験装置は前節に示した図 3.1 に示したものと同様のものを使用した。シリンジポンプ A には体積濃度 $\Phi=10\text{vol}\%$ のイースト菌細胞懸濁液を、シリンジポンプ B には純水を充填した。まず、両溶液をマイクロチャンネル内に充填した後に、シリンジポンプ B(純水)のみを送り量 $w=1.0\text{mL/h}$ で流し、測定流路内に純水のみの流れを形成する。その後両シリンジポンプの送り量を $w=0.5\text{mL/h}$ に設定し、計測を行った。この時、マイクロチャンネル測定流路内の平均流速は $v_{\text{mean}}=0.87\text{mm/s}$ である。測定周波数 f は 1MHz、2MHz、3MHz、4MHz、5MHz の 5 つに設定し 50 回掃引した。1 度の掃引につき各周波数の 3 プロット平均を計測データとした。印加電流は $I=10\text{mA}$ で、測定には各計測断面を使用し図 3.5 の 2 電極の組み合わせを使用した。

実験結果および考察

測定周波数を $f=1\text{M}\sim 5\text{MHz}$ の 5 つの周波数に設定し、掃引を 50 回行ったところ計測時間

は 35 秒となった。マイクロチャンネル内の平均流速は $v_{\text{mean}}=0.87 \text{ mm/s}$ であるため、計測終了時のイースト菌細胞の推定到達距離は $L_{\text{yeast}}=30.45 \text{ mm}$ である。この時、マイクロチャンネルの流路長さは $Z=20 \text{ mm}$ であるため、イースト菌細胞は流路内全域に流れていると考えられる。図 3.11 に横軸計測時間 t 、縦軸に比誘電率 ϵ' から純水のみを流動した時の ϵ_w' を引いた $\Delta\epsilon'$ をとったグラフを示す。全ての断面において言えることは、時間が経過するにつれて比誘電率が上昇しているということである。また、5 つの断面において、流入口に近ければ近いほど $\Delta\epsilon'$ の値が大きくなり、反対に最も流出口に近い断面では 35 秒後においても $\Delta\epsilon'$ は 10 に満たなかった。これはマイクロチャンネル内の v_{mean} が小さいため、沈降したイースト菌細胞が押し流されず、流入口付近から順に堆積していつているためであると考えられる。細胞の沈降の理由を検討するために、Bryan らはイースト菌細胞の密度計測を行った[36]。その密度は $\rho_{\text{yeast}}=1.2\sim 1.3 \text{ g/mL}$ であり、室温での精製水の密度 $\rho_w=1.0 \text{ g/mL}$ より高い値であった。

次に、図 3.11 に対し表 3.2 に示した ϵ' と Φ の関係式のうち $f_2=1 \text{ MHz}$ のものを適用して求めた体積濃度 Φ と流動距離との関係を図 3.12 に示す。図 3.11 と同様に時間経過とともに細胞が堆積していることがわかる。

以上のように、積層電極内装型マイクロチャンネルの 5 つの計測断面を用いて誘電特性計測を行い、そこから細胞濃度分布の測定を実現した。

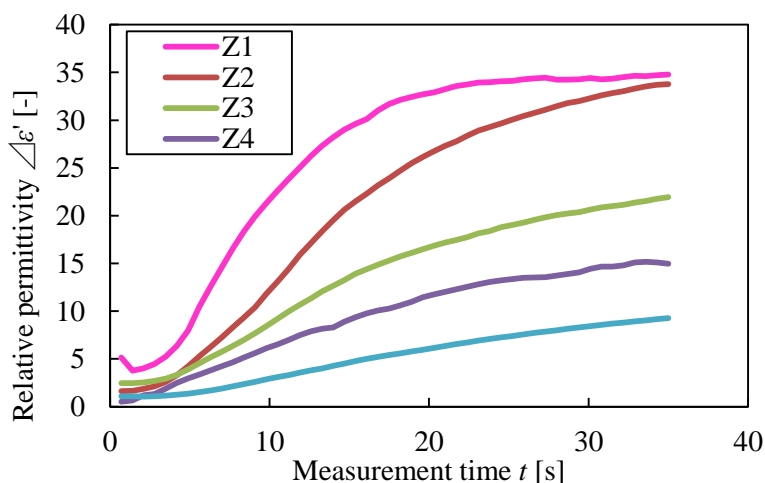


図 3.11 Changes of relative permittivity of cell suspensions when cells are flowing through from the 1st cross-section (Z1) to 5th cross-section (Z5) of the microchannel

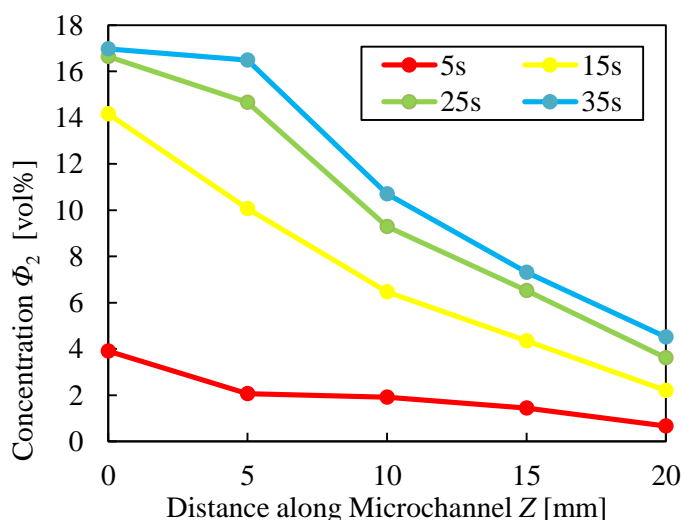


図 3.12 Cell concentration distribution along Microchannel from Z1 to Z5.

ステージ【2-2】

【2-2】 高速アルゴリズムの開発

1. 電気インピーダンス・トモグラフィー (EIT) 法

EIT 法は流路の外周に複数の電極センサを配置し、管内の導電率 σ 、比誘電率 ϵ' の異なる物質のインピーダンスを測定する。プロセスは大きく 3 つに分けられ、1) 2 つの電極間に交流電流 I を印加した時の電極間のインピーダンス Z の測定、2) 順問題によるヤコビ行列 \mathbf{J} (感度関数) の計算、および 3) 逆問題による空間導電率分布 $\sigma_{(x,y)}$ もしくは空間比誘電率分布 $\epsilon'_{(x,y)}$ の算出からなり、流路内の物質空間分布を再構成画像として表示する。本研究では計測されたインピーダンスデータ Z とあらかじめ順問題で求めたヤコビ行列 \mathbf{J} を既知として、未知数である空間導電率分布 σ を求め、画像再構成を行う。

本実験では電極間のインピーダンス Z を測定するときの電極組み合わせの選び方として **Opposite Method** を採用した。図 1.3 に示すようにマイクロチャンネル外周上に設置された電極の向かい合う電極 (例えば 1-9) を電流印加電極とし交流電流を印加し、電流印加電極の近傍電極 (ここでは 8) を電圧計測の **Reference** とし、残りの電極との間の電圧 U を計測し、インピーダンスを算出する。その後、電流印加電極を次の組み合わせ (1.10) に移し、同様にしてインピーダンス Z を計測する。計測組み合わせ数 M は、

$$M = \frac{1}{2} m_e (m_e - 3) \tag{1.1}$$

で表される。ここで m_e は電極数である。本研究では $m_e = 16$ であるため、 $M = 104$ ($Z \in \mathbf{R}$) である。表 1.1 に計測組み合わせを示す。

表 1.1 Measurement pair

Measurement number M	Current injecting pair m		Voltage measurement pair n	
1	1	9	2	8
2	1	9	3	8
3	1	9	4	8
4	1	9	5	8
5	1	9	6	8
6	1	9	7	8
7	1	9	10	8
8	1	9	11	8
9	1	9	12	8
10	1	9	13	8
11	1	9	14	8
12	1	9	15	8
13	1	9	16	8
14	2	10	3	9
15	2	10	4	9
16	2	10	5	9
17	2	10	6	9
18	2	10	7	9
19	2	10	8	9
20	2	10	11	9
21	2	10	12	9
22	2	10	13	9
23	2	10	14	9
24	2	10	15	9
25	2	10	16	9

26	2	10	1	9
27	3	11	4	10
28	3	11	5	10
29	3	11	6	10
30	3	11	7	10
31	3	11	8	10
32	3	11	9	10
33	3	11	12	10
34	3	11	13	10
35	3	11	14	10
36	3	11	15	10
37	3	11	16	10
38	3	11	1	10
39	3	11	2	10
40	4	12	5	11
41	4	12	6	11
42	4	12	7	11
43	4	12	8	11
44	4	12	9	11
45	4	12	10	11
46	4	12	13	11
47	4	12	14	11
48	4	12	15	11
49	4	12	16	11
50	4	12	1	11
51	4	12	2	11
52	4	12	3	11
53	5	13	6	12
54	5	13	7	12
55	5	13	8	12
56	5	13	9	12
57	5	13	10	12
58	5	13	11	12
59	5	13	14	12
60	5	13	15	12
61	5	13	16	12
62	5	13	1	12
63	5	13	2	12
64	5	13	3	12
65	5	13	4	12
66	6	14	7	13
67	6	14	8	13
68	6	14	9	13
69	6	14	10	13
70	6	14	11	13
71	6	14	12	13
72	6	14	15	13
73	6	14	16	13
74	6	14	1	13

75	6	14	2	13
76	6	14	3	13
77	6	14	4	13
78	6	14	5	13
79	7	15	8	14
80	7	15	9	14
81	7	15	10	14
82	7	15	11	14
83	7	15	12	14
84	7	15	13	14
85	7	15	16	14
86	7	15	1	14
87	7	15	2	14
88	7	15	3	14
89	7	15	4	14
90	7	15	5	14
91	7	15	6	14
92	8	16	9	15
93	8	16	10	15
94	8	16	11	15
95	8	16	12	15
96	8	16	13	15
97	8	16	14	15
98	8	16	1	15
99	8	16	2	15
100	8	16	3	15
101	8	16	4	15
102	8	16	5	15
103	8	16	6	15
104	8	16	7	15

ヤコビ行列（感度関数）

ヤコビ行列は流路断面における導電率分布 σ もしくは比誘電率分布 ε' のポテンシャルを表し、測定されたインピーダンス Z から各分布を求めるのに必要な行列である。ヤコビ行列は順問題を解くことで求められるが、用いるセンサの条件によって値が変化するため、センサ固有の値である。

本研究で用いたヤコビ行列を図 1.3 に示す。計測組み合わせ $M=104$ 、空間解像度は図 1.4 に示すように $N=1024(32 \times 32)$ であるので、 $\mathbf{J} \in \mathbf{R}^{104 \times 1024}$ である。図 1.5 はヤコビ行列の 12 行目までの各行を 32×32 の解像度を持つ流路断面画像に分解したもので、任意の電極における導電率分布 σ のポテンシャルを示す。

ヤコビ行列 \mathbf{J} は流路断面内の感度行列であり、行列の各要素は導電率 σ に対する計測ペア M におけるインピーダンス Z^M の変化率を表し、

$$\mathbf{J}^M = \begin{bmatrix} \frac{\partial Z^1}{\partial \sigma_1} & \frac{\partial Z^1}{\partial \sigma_2} & \dots & \frac{\partial Z^1}{\partial \sigma_N} \\ \frac{\partial Z^2}{\partial \sigma_1} & \frac{\partial Z^2}{\partial \sigma_2} & \dots & \frac{\partial Z^2}{\partial \sigma_N} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial Z^M}{\partial \sigma_1} & \frac{\partial Z^M}{\partial \sigma_2} & \dots & \frac{\partial Z^M}{\partial \sigma_N} \end{bmatrix} \quad (1.2)$$

で表され、ヤコビ行列を求める計算式は

$$\begin{aligned} \mathbf{J} &= \frac{\delta Z(m,n)}{\delta \sigma(x,y)} \\ &= \int \nabla \phi^m \cdot \nabla \phi^n dS \\ &= \int \mathbf{E}^m \cdot \mathbf{E}^n dS \end{aligned} \quad (1.3)$$

で表される。 S は計測領域を、 ϕ^m 、 ϕ^n は各電極ペア m 、 n に電流を印加した時のポテンシャル、 \mathbf{E}^m 、 \mathbf{E}^n はそれぞれに対応する電場を表す。ここで、流路断面におけるポテンシャル ϕ と導電率 σ の関係を、

$$\nabla[\sigma_{(x,y)} \nabla \phi_{(x,y)}] = 0 \quad (1.4)$$

のラプラス方程式で仮定する。そして式(2.4)を有限要素法 (FEM) により離散化し、

$$\int_{e_l} \mathbf{i}^l dA = I_l \quad (1.5)$$

$$\mathbf{n} \cdot \nabla \phi|_{(x,y)=wall} = 0 \quad (1.6)$$

$$\phi^l + z_l \mathbf{i}^l = U_l \quad (1.7)$$

$$\sum_{l=1}^{m_e} I_l = 0, \sum_{l=1}^{m_e} U_l = 0 \quad (1.8)$$

で表される境界条件によりポテンシャル $\phi_{(x,y)}$ の分布を求める。ここで l は電極番号、 e_l は電

極 l の表面、 A は電極面積、 i^l は電極 l 上における電流密度、 I_l は電極 l における電流、 z_l は電極 l におけるコンタクトインピーダンス、 U_l は電極 l における電圧、 \mathbf{n} は法線ベクトルを示している。そして得られた 104×1024 のヤコビ行列 \mathbf{J}

$$\mathbf{J} = \begin{bmatrix} J_1^1 & J_2^1 & \cdots & J_{1024}^1 \\ J_1^2 & J_2^2 & \cdots & J_{1024}^2 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ J_1^{104} & J_2^{104} & \cdots & J_{1024}^{104} \end{bmatrix} \quad (1.9)$$

の列要素を、列ごとにすべて和をとり 1×1024 の行列

$$\begin{aligned} \mathbf{AJ} &= [\mathbf{AJ}_1 \quad \mathbf{AJ}_2 \quad \cdots \quad \mathbf{AJ}_N] \\ \mathbf{AJ}_N &= \sum_{l=1}^{104} J_N^l \end{aligned} \quad (1.10)$$

を作る。この行列 \mathbf{AJ} で \mathbf{J} の各行を除することで正規化ヤコビ行列

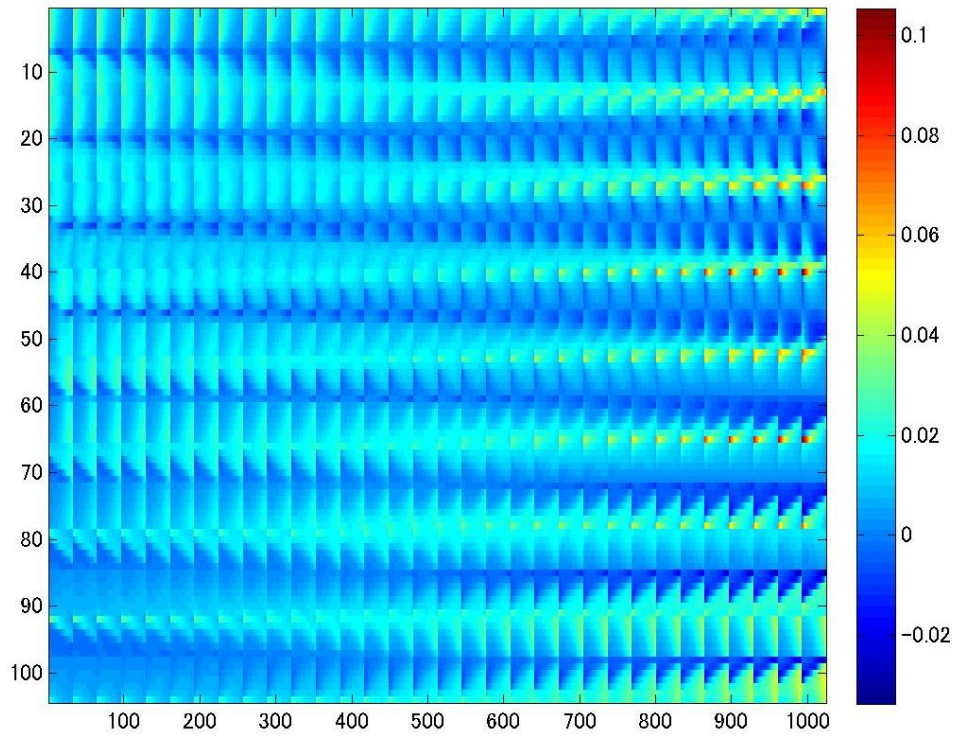
$$\mathbf{J}^* = \begin{bmatrix} J_1^1 / \mathbf{AJ}_1 & J_2^1 / \mathbf{AJ}_2 & \cdots & J_{1024}^1 / \mathbf{AJ}_{1024} \\ J_1^2 / \mathbf{AJ}_1 & J_2^2 / \mathbf{AJ}_2 & \cdots & J_{1024}^2 / \mathbf{AJ}_{1024} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ J_1^{104} / \mathbf{AJ}_1 & J_2^{104} / \mathbf{AJ}_2 & \cdots & J_{1024}^{104} / \mathbf{AJ}_{1024} \end{bmatrix} \quad (1.11)$$

を得る。これ以降本論文においてヤコビ行列とはこの正規化ヤコビ行列 \mathbf{J}^* を指す。

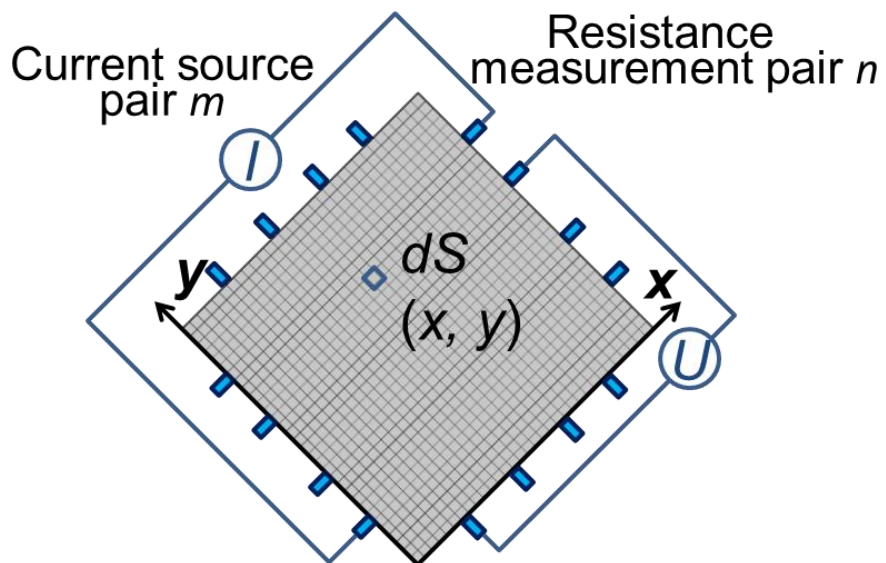
このヤコビ行列を用いると、未知の空間導電率分布 σ と電極間インピーダンス（測定インピーダンス） \mathbf{Z} の間には、

$$\mathbf{Z} = \mathbf{J}\sigma \quad (1.12)$$

の行列式が成り立つ。本実験においては $\mathbf{Z} \in \mathbf{R}^{104 \times 1}$ 、 $\mathbf{J} \in \mathbf{R}^{104 \times 1024}$ 、 $\sigma \in \mathbf{R}^{1024 \times 1}$ の行列であるので、未知数 σ を求める際には未知数の数が式数よりも多い不適切逆問題となり、一意的に解を求めることが出来ない。



⊠ 1.3 Jacobian matrix



⊠ 1.4 Schematic diagram of measurement pair $m - n$

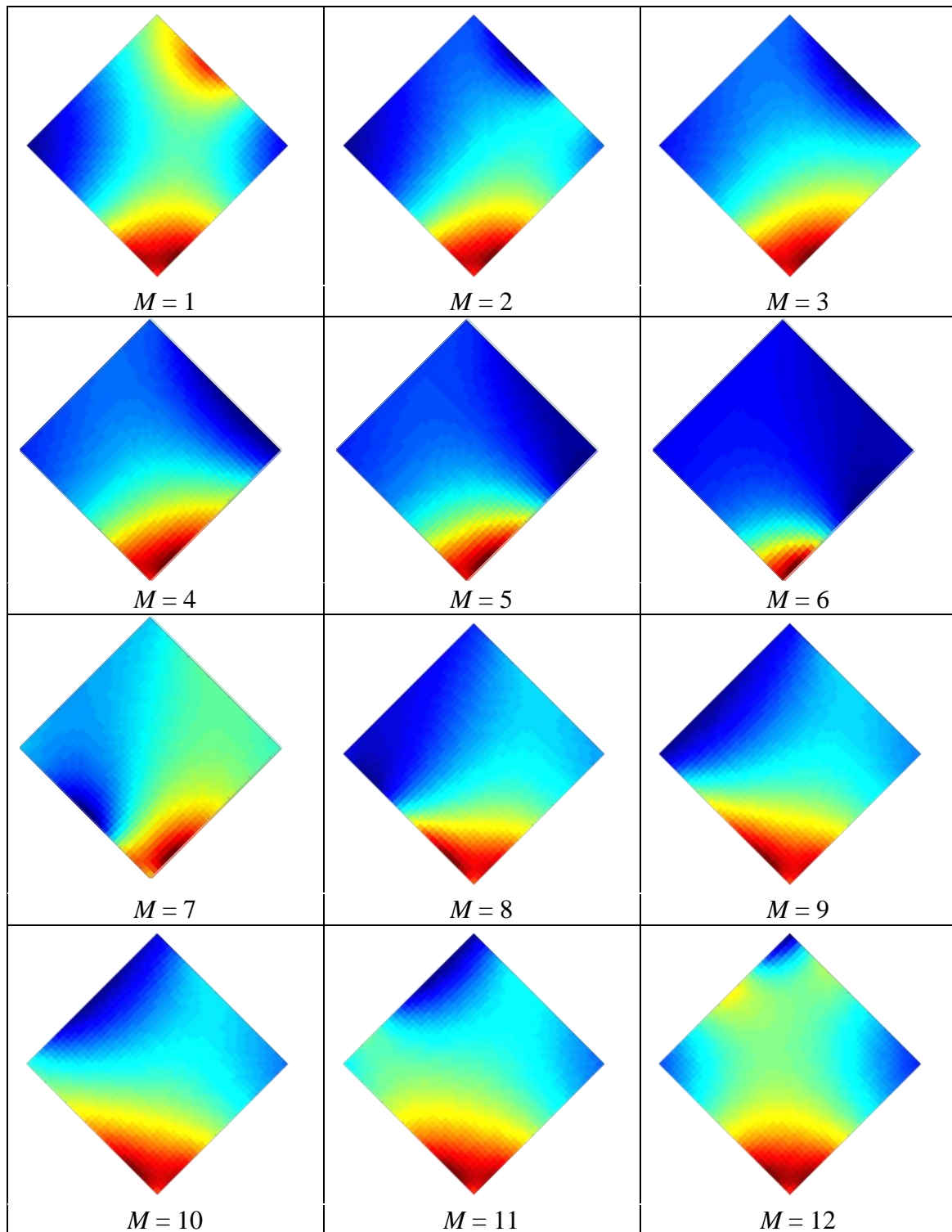


図 1.5 Jacobian matrix ($M = 1 \sim 12$)

画像再構成法

前項で述べたように EIT 法は不適切逆問題であるため、一意的に σ を求めることが出来ない。そのため、画像再構成のために様々な手法が応用されている。画像再構成に用いられる手法は数多くあるが、大きく分けて非反復法と反復法に分けられる。非反復法はアルゴリズムが単純であるため計算が早いというメリットを持つが、得られる再構成画像の精度は良くない。対して反復法は再構成画像の精度は高いが、アルゴリズムが煩雑になるた

め計算に時間がかかる。

本項では 1)Linear Back Projection (LBP)法、2)Tikhonov 正規化法、3)Landweber 反復法、および 4)Projected Landweber 反復法について述べる。

1) Linear Back Projection (LBP)法

式(11)において、ヤコビ行列 \mathbf{J} の逆行列 \mathbf{J}^{-1} が存在するならば、式(1.12)は直接的に

$$\boldsymbol{\sigma} = \mathbf{J}^{-1} \mathbf{Z} \quad (1.13)$$

を用いて求めることが出来るが、 \mathbf{J} は正方行列ではないため逆行列 \mathbf{J}^{-1} は存在せず、解を求めるには他の方法を用いなければならない。 \mathbf{J} が空間導電率分布 $\boldsymbol{\sigma}$ からインピーダンスベクトル \mathbf{Z} への線形マッピングであると仮定すると \mathbf{J} の転置行列 \mathbf{J}^T は \mathbf{Z} から $\boldsymbol{\sigma}$ への線形マッピングとして考えることが出来る。この方法を Linear Back Projection (LBP)法といい、与えられる近似解は

$$\boldsymbol{\sigma} = \mathbf{J}^T \mathbf{Z} \quad (1.14)$$

となる。式(1.14)の正規化、もしくは重みを付けた形は

$$\boldsymbol{\sigma} = \frac{\mathbf{J}^T \mathbf{Z}}{\mathbf{J}^T \mathbf{Z}_c} \quad (1.15)$$

で表すことが出来る。ここで \mathbf{Z}_c は単位列ベクトルである。式(1.14)の $\boldsymbol{\sigma}$ は数学的に式(1.15)の近似解である。再構成画像の精度を改善するために、

$$\left\{ \begin{array}{l} \bar{Z} = \frac{\sum_{l=1}^M Z_l}{M}, \quad \alpha = \frac{\sum_{j=1}^N \sigma_j}{N}, \quad \sigma_l = \alpha(1 - \bar{Z}) \\ \sigma_j(\text{filtering}) = \begin{cases} 0 & \sigma_j < \sigma_l \\ \sigma_j & \sigma_l \leq \sigma_k < 1 \\ 1 & \sigma \geq 1 \end{cases} \end{array} \right. \quad (1.16)$$

で表されるフィルタリングを行う。

LBP 法は数学的に正確ではないが単純な原理の為、オンライン画像構成においてはまだ広く用いられている。しかし LBP 法では再構成画像の精度が悪く、精度を改善するためには他の手法と併用する必要がある。

2)Tikhonov 正規化法

正規化の手法は不適切逆問題を解くために開発されてきた。これは重要な拘束情報を用いることで解のセットを決め、そのセットから 1 つの解を選出するために使われる。正規化法の 1 つである Tikhonov 正規化法は一般的に用いられる手法である。式(1.12)は測定エラーを考慮すると、

$$\mathbf{Z} = \mathbf{J}\boldsymbol{\sigma} + \mathbf{e} \quad (1.17)$$

となる。これに対し Tikhonov 正規化法を用いると式(1.12)および式(1.17)の解は、

$$\boldsymbol{\sigma} = (\mathbf{J}^T \mathbf{J} + \mu \mathbf{I})^{-1} \mathbf{J}^T \mathbf{Z} \quad (1.18)$$

で表され、 μ は正の規化パラメータ、 \mathbf{I} は単位行列である。Tikhonov 正規化法の精度は正規化パラメータ μ に強く依存しているため、真に近い解を得るためには適切な μ の選出が重要である。一般的に μ を小さくするほど元画像に近い画像を得られるが、エラーが解に与える影響が大きくなる。逆に μ を大きくするとエラーの影響を抑制できるが、元画像との差が大きくなる。ほとんどの場合において μ は経験的に選ばれる。本研究においては下記の式、

$$\begin{cases} \boldsymbol{\sigma}_0 = (\mathbf{J}^T \cdot \mathbf{J} + \mu \mathbf{I})^{-1} \mathbf{J}^T \cdot \mathbf{V} \\ \boldsymbol{\sigma}_{k+1} = \boldsymbol{\sigma}_k + (\mathbf{J}^T \cdot \mathbf{J} + \mu \mathbf{I})^{-1} (\mathbf{J}^T \cdot \mathbf{V} + \mu \boldsymbol{\sigma}_k) \end{cases} \quad (1.19)$$

を用いて繰り返し計算を行い、その後式(1.16)を用いてフィルタリングを行った。

3) Landweber 反復法

Landweber 反復法は最適化理論として広く用いられる最急降下（勾配降下）法の変分である。Landweber 反復法では、以下の関数

$$f(\boldsymbol{\sigma}) = \boldsymbol{\sigma}^T \mathbf{J}^T \mathbf{J} \boldsymbol{\sigma} - 2\boldsymbol{\sigma}^T \mathbf{J}^T \mathbf{Z} + \mathbf{Z}^T \mathbf{Z} \quad (1.20)$$

を最小化させる $\boldsymbol{\sigma}$ を見つけることをゴールと仮定する。 $f(\boldsymbol{\sigma})$ の勾配は単純に

$$\nabla f(\boldsymbol{\sigma}) = \mathbf{J}^T \mathbf{J} \boldsymbol{\sigma} - \mathbf{J}^T \mathbf{Z} = \mathbf{J}^T (\mathbf{J} \boldsymbol{\sigma} - \mathbf{Z}) \quad (1.21)$$

として計算でき、最急降下法では次の反復への新しい方向として $f(\boldsymbol{\sigma})$ を最も早く減少させる方向、つまり $f(\boldsymbol{\sigma})$ の傾きと反対にとる。反復手順は

$$\boldsymbol{\sigma}_{k+1} = \boldsymbol{\sigma}_k - \mu_k \nabla f(\boldsymbol{\sigma}_k) = \boldsymbol{\sigma}_k - \mu_k \mathbf{J}^T (\mathbf{J} \boldsymbol{\sigma}_k - \mathbf{Z}) \quad (1.22)$$

で表される。 μ_k は $\nabla f(\boldsymbol{\sigma}_k)$ と $\nabla f(\boldsymbol{\sigma}_{k+1})$ が直行するように選ぶが、その算出には多くの計算を必要とする。そのため、単純化するために μ_k を固定値とする場合も多い。本研究では $\boldsymbol{\sigma}_0$ は LBP 法を用いて計算し $\mu_k = \mu$ で一定とした。また、反復が終了した後に式(1.16)を用いてフィルタリングを行った。

4) Projected Landweber 反復法

Landweber 反復法を用いることで非反復法に比べて再構成画像の精度を改善することが出来たが、Landweber 反復法は実際には収束性が保障されていないという問題点がある。そこで Landweber 反復法の収束性を改善するシンプルな方法として Projected Landweber 反復法を取り上げる。この手法は、

$$\sigma_{k+1} = P[\sigma_k - \mu \mathbf{J}^T (\mathbf{J}\sigma_k - \mathbf{Z})] \quad (1.23)$$

で表現される。ここで \mathbf{P} は以下の

$$P[f(x)] = \begin{cases} f(x) & \text{if } 0 \leq f(x) \leq 1 \\ 0 & \text{if } f(x) < 0 \\ 1 & \text{if } f(x) > 1 \end{cases} \quad (1.24)$$

で記述される投影オペレータである。Landweber 反復法と Projected Landweber 反復法の違いは各反復データが凸集合に投影されているということである。Landweber 反復法と同じく σ_0 は LBP 法を用いて計算する。

2. EIS 法を用いた細胞の誘電特性計測

2.1. シミュレーション

条件、方法

本研究で使用するヤコビ行列や画像再構成法について検討するためにシミュレーションを行う。図 2.1 に示すようにジオメトリを作成した。各寸法は本研究で使用した積層電極内装型マイクロチャンネルの断面寸法と同様である。各辺に 4 つ、計 16 個の電極を配置し、それ以外の壁面は絶縁壁となっている。その後ジオメトリ内の領域を画像再構成の空間解像度と同じく 32×32 の領域に分け、図 2.2 に示すような 5 つのファントムを作成した。青色部に細胞が存在することを想定しており、他の領域は水とした。Phantom1 はマイクロチャンネルの中心から下半分に細胞が堆積している場合、Phantom2 はマイクロチャンネル中心部に細胞が存在している場合、Phantom3 は細胞が壁面を覆うおように存在している場合、Phantom4 は細胞が 3 つの塊として存在している場合、Phantom5 は細胞がマイクロチャンネルの下四分の一に堆積している場合を想定している。細胞部、溶液部の比誘電率 ϵ' 、導電率 σ は模擬的に表 2.1 に示すように設定した。その後、各計測組み合わせにおける電場を計算し計測インピーダンス \mathbf{Z} を取得した。その \mathbf{Z} とヤコビ行列を用いて画像再構成を行う。電場の計算や \mathbf{Z} の取得、画像再構成には FEM 解析ソフト (COMSOL Multiphysics)、数値解析ソフト (MATLAB) を使用した。また、画像再構成法は Tikhonov 正規化法、Landweber 反復法、Projected Landweber 反復法の 3 つを使用した。

また、再構成画像の評価指標として、相関係数 R 、

$$R = \frac{\sum_{j=1}^N (\sigma_j - \bar{\sigma})(\hat{\sigma}_j - \bar{\hat{\sigma}})}{\sqrt{\sum_{j=1}^N (\sigma_j - \bar{\sigma})^2 \sum_{j=1}^N (\hat{\sigma}_j - \bar{\hat{\sigma}})^2}} \quad (2.1)$$

ソリューションエラー E_{SI} 、

$$E_{SI} = \frac{\|\hat{\sigma} - \sigma\|_2}{\|\hat{\sigma}\|_2} \quad (2.2)$$

を導入し、各手法について比較を行った。ここで σ は再構成導電率、 $\hat{\sigma}$ はファントムで設定した導電率、 $\bar{\sigma}$ 、 $\bar{\hat{\sigma}}$ はそれぞれ σ 、 $\hat{\sigma}$ の平均値を表している。 R は1に近いほど、 E_{SI} は0に近いほど再構成画像の精度が良くなる。

図 2.3 に本章で用いたカラーバーを示す。再構成した導電率 σ を以下の式、

$$\sigma^* = \frac{\sigma - \sigma_{\min}}{\sigma_{\max} - \sigma_{\min}} \quad (2.3)$$

で0.0から1.0で正規化を行っている。

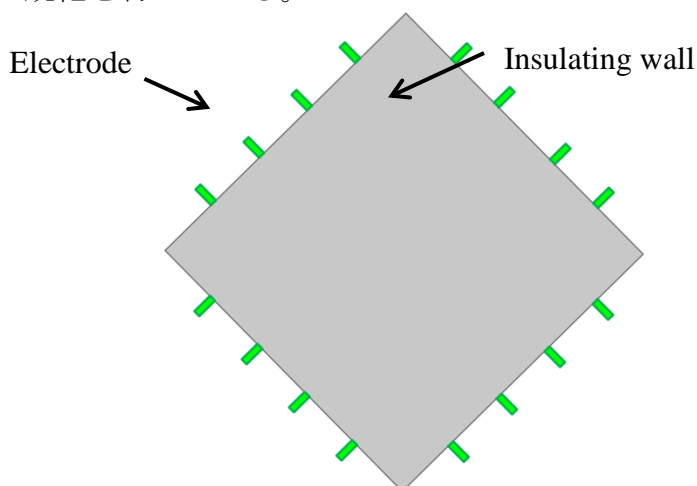


図 2.1 Geometry

表 2.1 Dielectric property of Phantom materials

Material	Conductivity σ [S/m]	Relative permittivity ϵ' [-]
Cell	0.1	5
Water	1	1

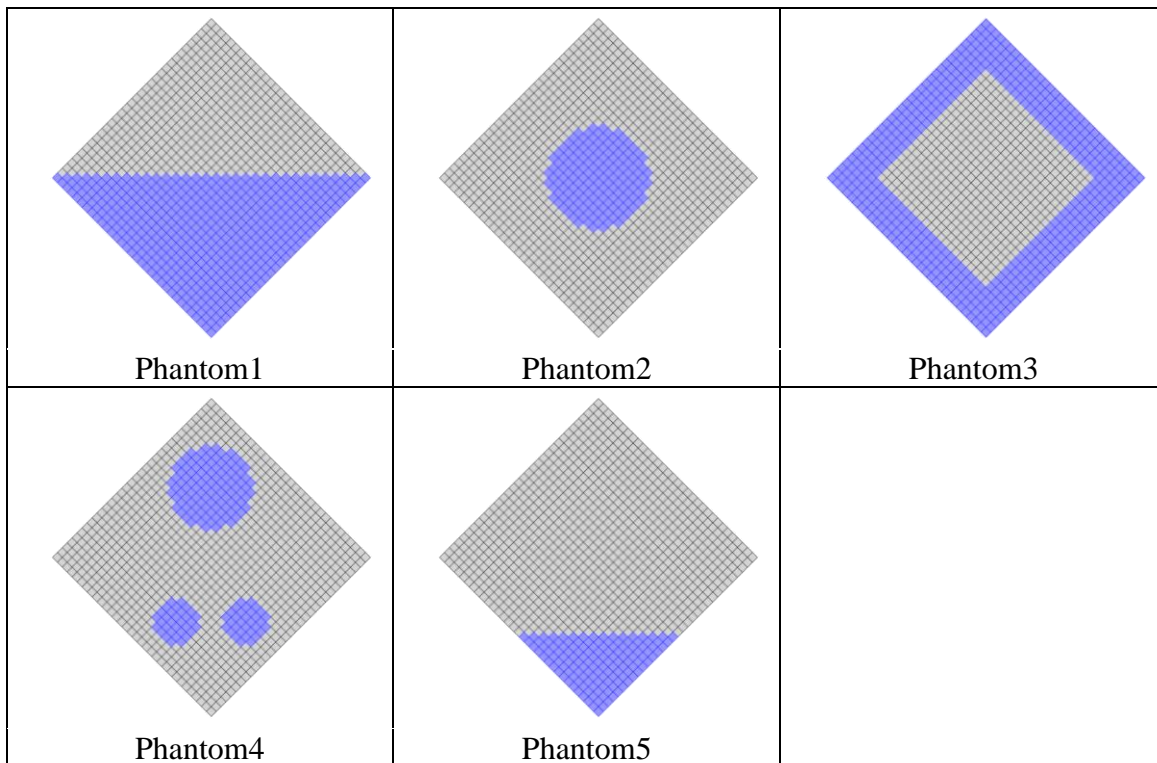


図 2.2 Phantoms



図 2.3 Color bar

結果および考察

まず、図 2.4 に Tikhonov 正規化法を用いた時の各ファントムの再構成画像を示し、表 2.2 にその時の相関係数 R とソリューションエラー E_{SI} を示す。ここで、 n_{itr} は繰り返し計算の回数を示す。Tikhonov 正規化法においては、 $(J^T J + \mu I)^{-1}$ の計算が非常に複雑であるため、繰り返しの時間がかかる。また、各ファントムについて見てみると、Phantom5 が最も精度が高く $R=0.710$ 、 $E_{SI}=0.736$ である。一方、Phantom4 は $R=0.191$ と非常に低く、元画像の判別は不可能である。次に、Landweber 反復法を用いた時の各ファントムの再構成画像を図 2.5 に、その時の R と E_{SI} を表 2.3 に示す。Tikhonov 正規化法に比べ、Phantom1、Phantom5 において R が増加し、 E_{SI} が低下していることから、精度が改善されたことがわかる。しかし反対に、Phantom2、Phantom3、Phantom4 においては精度が低下した。最後に、Projected Landweber 反復法を用いて画像再構成を行った時の結果を図 2.6 と表 2.4 に示す。Landweber 法と比較すると、Phantom1、Phantom2、Phantom5 の 3 つにおいて R 、 E_{SI} ともに改善していることが分かり、Phantom3 についても E_{SI} が低下している。Tikhonov 正規化法と比較すると Phantom1、Phantom2、Phantom5 において精度が改善されている。Phantom3 においては E_{SI} が改善されているが、 R は Tikhonov 正規化法の方が良い。Phantom4 は 3 つの手法どれにおいても R が 0.2 を超えず、非常に精度が悪いと言える。各画像再構成法の相関係数 R の値をまとめたものを図 2.7 に、ソリューションエラー E_{SI} をまとめたものを図 2.8 に示す。Phantom1、Phantom2、Phantom5 においては R 、 E_{SI} ともに最も高くなり、Phantom3 においても E_{SI} が最も高くなること、実際の計測実験ではイースト菌細胞が沈降し、マイクロチャンネル下部に堆積すると考えられることから、次節における計測実験においては Projected Landweber 反復法を用いて画像再構成を行うこととする。

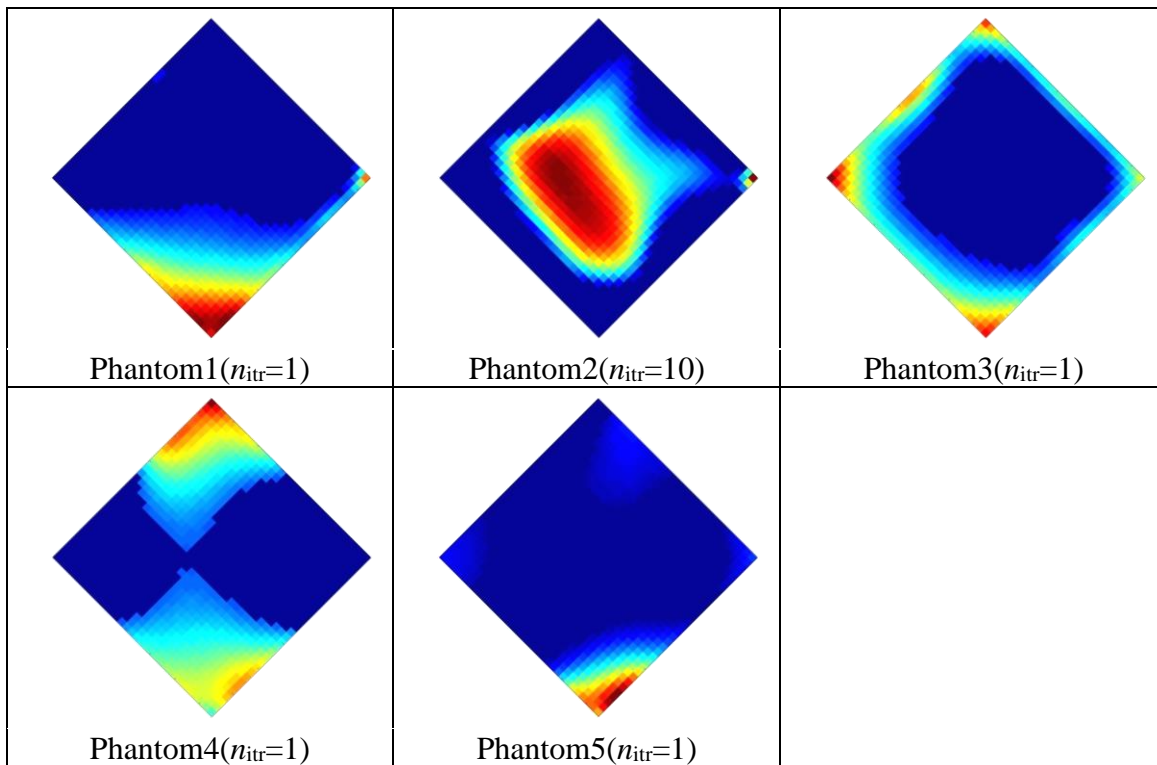


图 2.4 Reconstructed images by Tikhonov regularization method ($\mu=0.07$)

表 2.2 Solution errors and correlation coefficients in 图 2.4

	Phantom1	Phantom2	Phantom3	Phantom4	Phantom5
R	0.525	0.616	0.641	0.191	0.710
E_{SI}	0.809	0.836	0.761	0.970	0.736

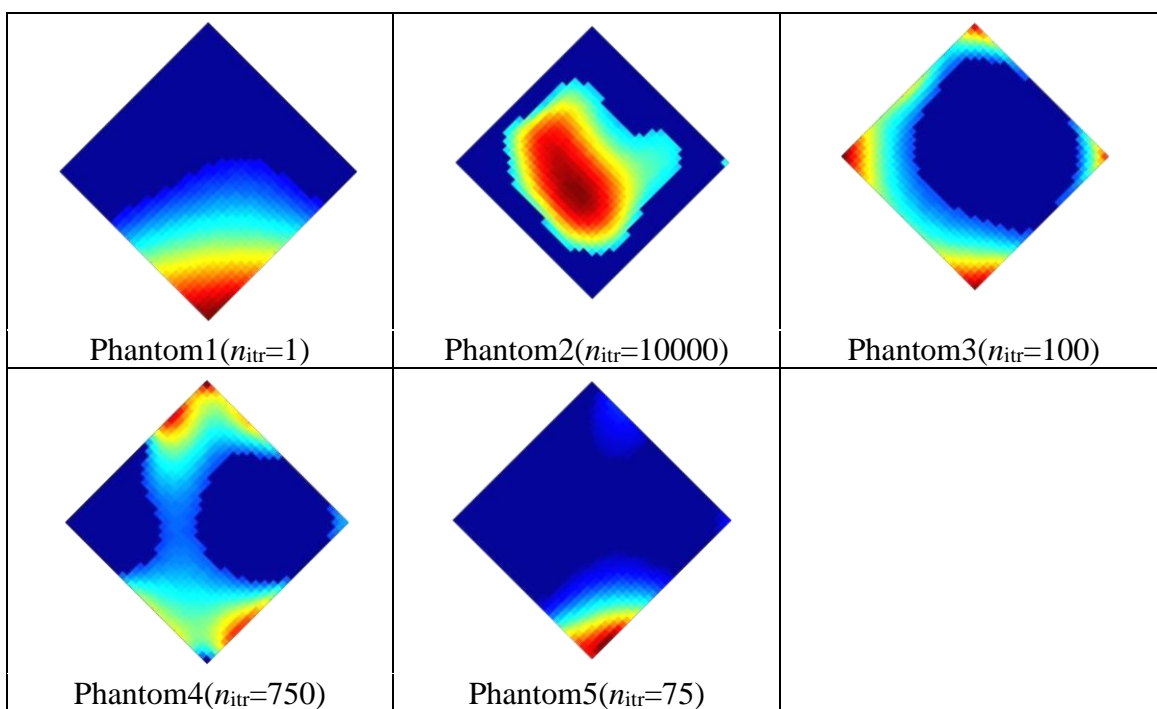


图 2.5 Reconstructed images by Landweber iteration method ($\mu=0.07$)

表 2.3 Solution errors and correlation coefficients in 图 2.5

	Phantom1	Phantom2	Phantom3	Phantom4	Phantom5
R	0.630	0.546	0.548	0.115	0.800
E_{SI}	0.738	0.939	0.760	1.004	0.649

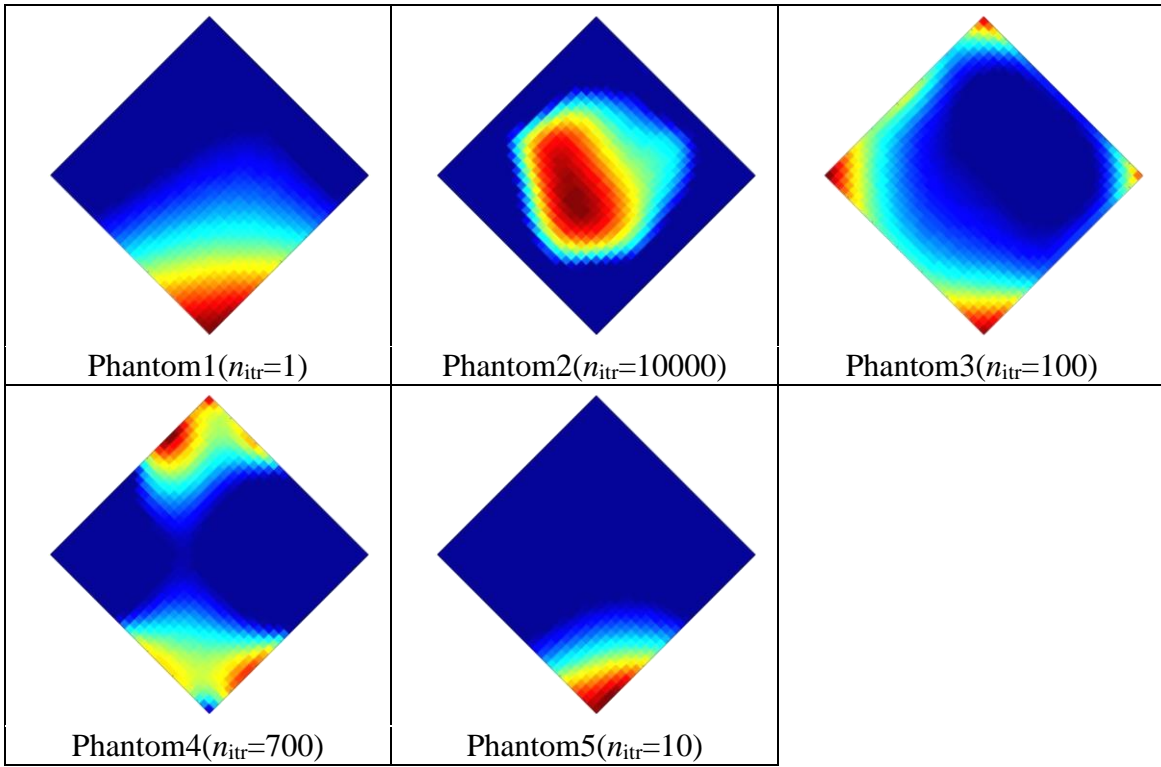


图 2.6 Reconstructed images by Projected Landweber iteration method ($\mu=0.07$)

表 2.4 Solution errors and correlation coefficients in 图 2.6

	Phantom1	Phantom2	Phantom3	Phantom4	Phantom5
R	0.637	0.686	0.545	0.109	0.846
E_{SI}	0.731	0.738	0.748	1.023	0.597

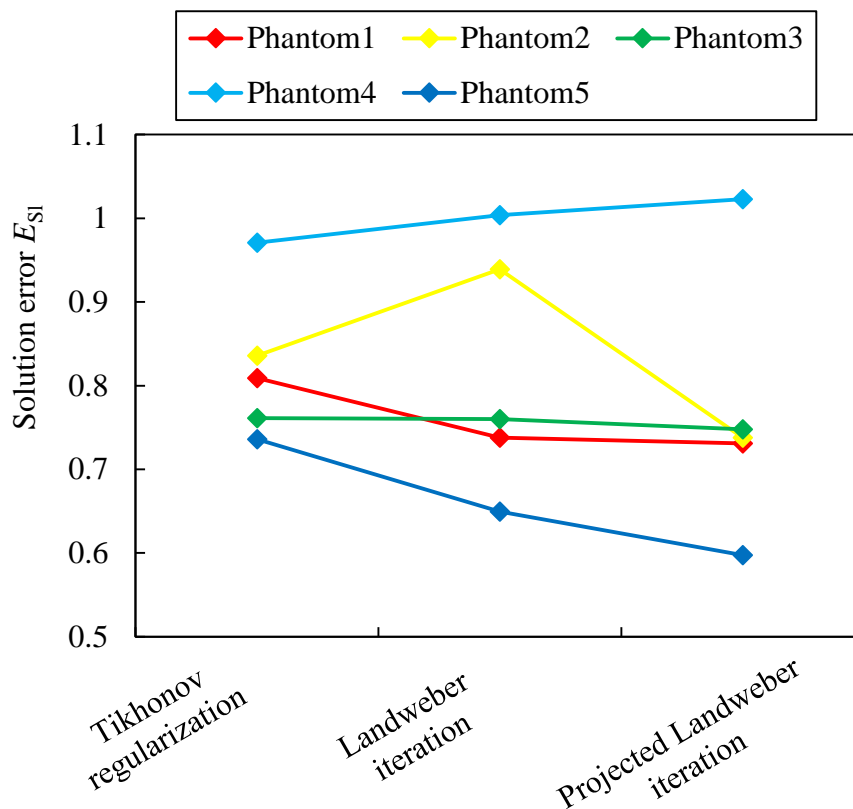
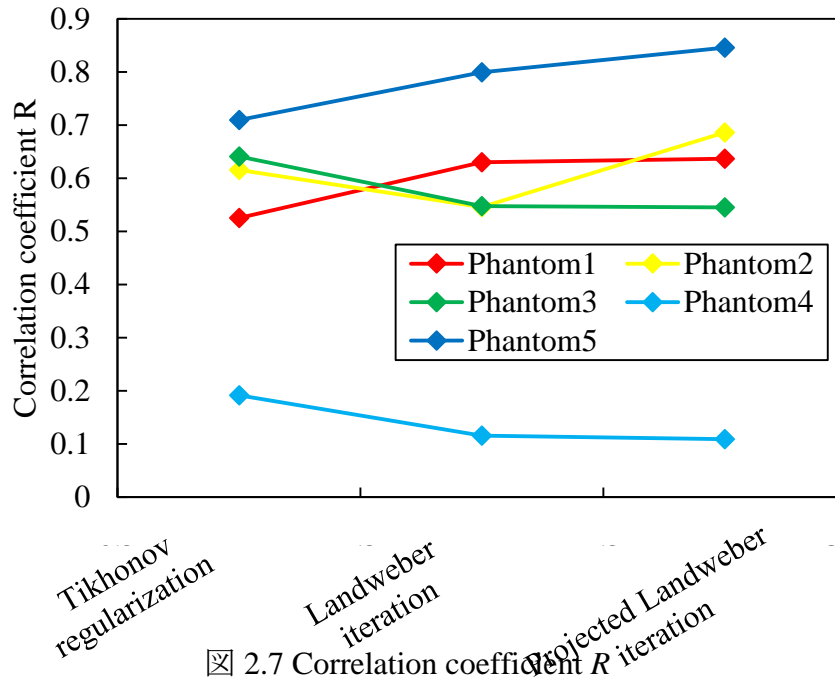


図 2.8 Solution error E_{S1}

2.2. 積層電極内装型マイクロチャンネル内における EIT 法による細胞濃度計測

実験装置、実験条件、実験方法

本節で使用した実験装置を前節に示した図 2.9 に示す。2つのシリンジポンプ、マイクロチャンネル、スイッチングユニット、インピーダンスアナライザ、および PC で構成されている。シリンジポンプ A には体積濃度 $\Phi=10\text{vol}\%$ イースト菌細胞懸濁液を、シリンジポンプ B には純水を充填した。まず、両溶液をマイクロチャンネル内に充填した後に、シリ

ンジポンプ B(純水)のみを送り量 $w = 1.0\text{mL/h}$ で流し、測定流路内に純水のみの流れを形成する。その後両シリンジポンプの送り量を $w = 0.5\text{mL/h}$ に設定し 35 秒経過後に両シリンジポンプを止めた。30 分間静置しイースト菌細胞が完全に沈降するのを待ってからスイッチングユニットを用いて全計測組み合わせについて計測を行った。測定周波数 f は 10kHz、60kHz、100kHz、250kHz、500kHz、750kHz、1MHz、2MHz、3MHz、4MHz、5MHz の 11 個に設定した。測定データは各測定周波数 f につき 3 回計測したものの平均値をプロットし、更に周波数掃引を 3 回繰り返してその平均値を計測データとした。印加電流は第 3 章の実験と同じく $I=10\text{mA}$ で一定とし、測定はマイクロチャンネルの第 1 断面(Z1)、第 3 断面(Z3)、第 5 断面(Z5)で行った。画像再構成は前節で述べたように Projected Landweber 反復法を用いて行った。

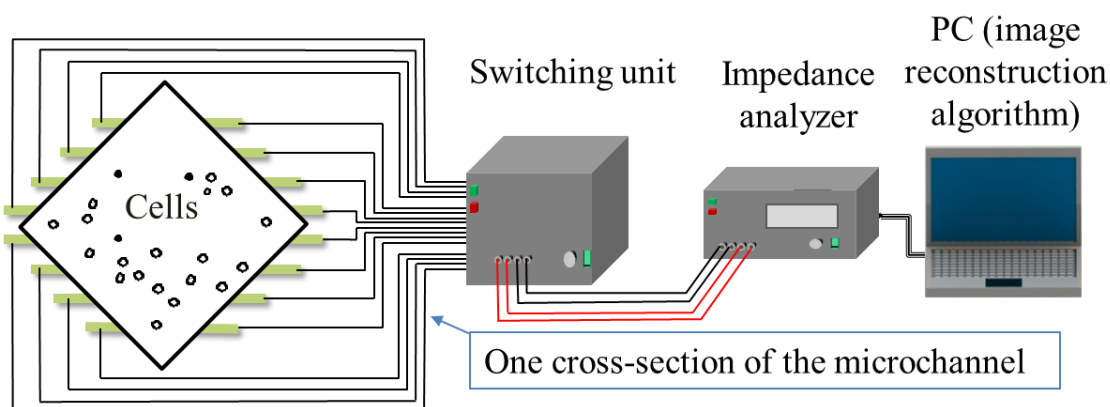


図 2.9 Experimental setup

実験結果および考察

図 2.10 に測定周波数 $f=1\text{MHz}$ における画像再構成結果を示す。第 1 断面においてはほぼ下半分に広がる 0.5 以上の緑から赤色の部分が、断面が第 3 断面から第 5 断面へと進むに従ってより下部へと収束していつていることが分かる。正規化された再構成導電率 σ が 0.5 以上である割合 S を表 2.5 に示す。これからも、 σ が 0.5 を超える範囲が収束していることが分かる。これは第 3 章 2 節の流動実験の結果と一致しており、マイクロチャンネル内で細胞濃度の変化を画像化出来たと言える。しかしながら、図 3.12 で示された体積濃度 Φ と S の値は一致せず、ヤコビ行列や画像再構成法の改善が必要である。図 2.11 に図 3.12 と図 2.10 を比較したものを示す。

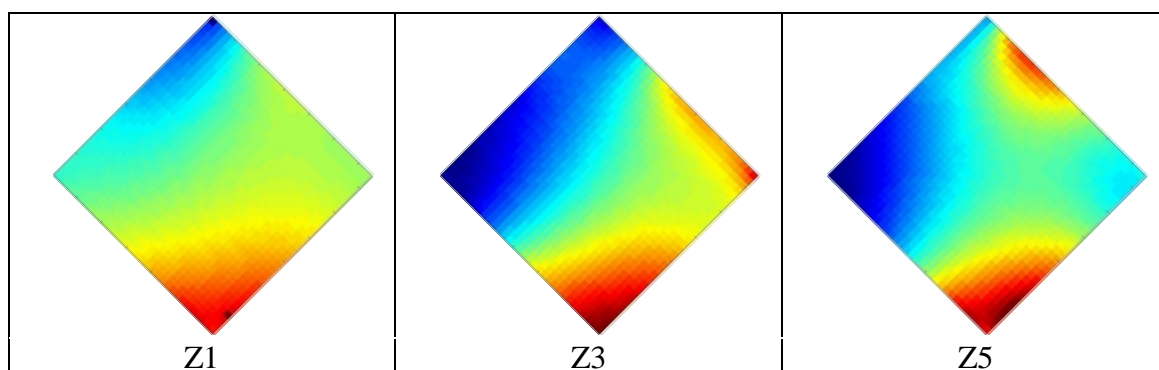


図 2.10 Reconstructed images by Projected Landweber method
($\mu=2.5 \times 10^{-6}$, $f=1\text{MHz}$)

表 2.5 Percentage of σ is bigger than 0.5

	Z1	Z3	Z5
S[%]	61.23	45.01	30.95

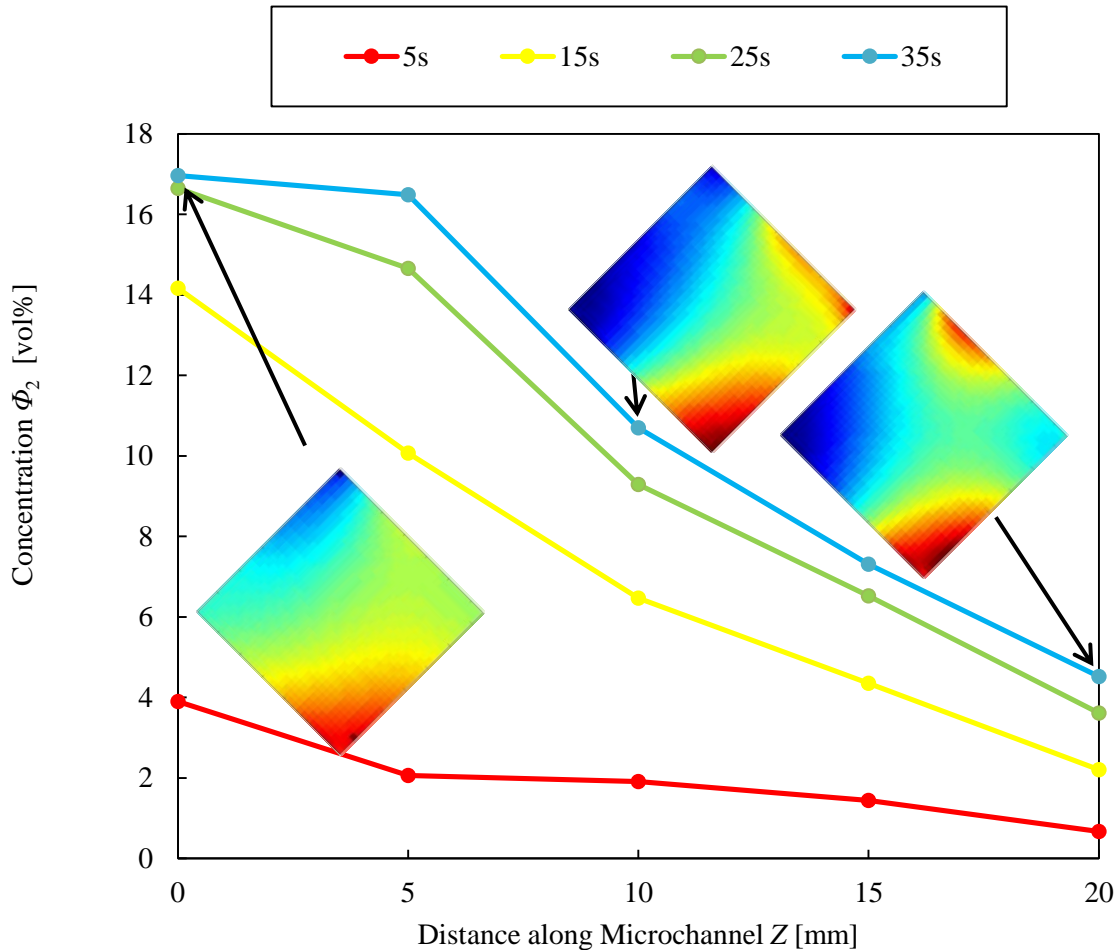


図 2.11 Comparison with 図 3.12 and 図 2.10

3. 結言

本研究では細胞懸濁液の誘電特性と積層電極内装型マイクロチャンネルの特異形状を併用し、EIS法、EIT法を用いた細胞濃度分布計測法の開発を行った。第一にEIS法を用いて細胞の誘電特性を計測した。異なる体積濃度 V を持つ細胞懸濁液の誘電特性をインピーダンスアナライザにより計測し、Hanai Cell Modelに基づいて確立されたMaxwell-Wagner分散理論と細胞分極モデルを用いて、計測した誘電特性を分析した。第二にEIT法を用いて積層電極内装型マイクロチャンネル内における細胞濃度分布の画像化を行った。FEMソフトウェアを用いて積層電極内装型マイクロチャンネルの垂直断面における細胞分布のモデルを作成し、画像再構成アルゴリズムについて考察しその後、積層電極内装型マイクロチャンネルの各計測断面に設置された電極を用いてインピーダンス Z の計測を行い、画像再構成アルゴリズムを用いて画像化した。最後にEIS法とEIT法における計測結果の比較を

行うことで積層電極内装型マイクロチャンネル内における誘電特性を用いた細胞の空間的濃度分布計測について検討した。以上の結果より、以下のことが明らかとなった。

- (1) EIS 法を用いた計測では $f=100\text{kHz}$ 以下の低周波数領域で電極分極の影響により比誘電率 ϵ' が線形的に減少し、 $f=100\text{kHz}\sim 2\text{MHz}$ においては ϵ' が一定となり、界面分極の影響を計測できた。また、これらの減少は Maxwell-Wagner 分散理論で説明できる。また、界面分極の影響で ϵ' が一定になる範囲は 2 電極で計測した場合が最も広がった。
- (2) Hanai Cell Model に基づいて確立された細胞分極モデルにより EIS 法による計測結果を解析した結果、 $f=100\text{kHz}\sim 4\text{MHz}$ の周波数範囲に細胞懸濁液の 4 つの緩和周波数 ($f_{\text{relax}1}=210\text{kHz}$ 、 $f_{\text{relax}2}=1.6\text{MHz}$ 、 $f_{\text{relax}3}=2.6\text{MHz}$ 、 $f_{\text{relax}4}=3.0\text{MHz}$) を検出した。
- (3) EIS 法で計測した ϵ' と体積濃度 Φ を比較した結果、明確な線形関係が得られ、その傾きは交流周波数に依存している。 $f=1\text{MHz}$ における相関係数 R^2 は 0.9036 であった。この結果を用いることで、マイクロチャンネル内における細胞濃度をオンラインで推定することが可能である。
- (4) 細胞をマイクロチャンネル内に流動させた状態で、マイクロチャンネルの Z 軸方向、つまり流路に沿う方向で細胞の濃度分布を EIS 法により計測することに成功した。 t が 35 秒である時、第 1 断面 (Z1) における細胞濃度は第 5 断面 (Z5) の 3 倍以上であり、これは細胞の沈降、堆積に起因している。
- (5) マイクロチャンネルを模擬したファントムを作成し、EIT 法を用いた画像再構成をシミュレーションした結果、マイクロチャンネル内の画像化には Projected Landweber 反復法が最も適しており、Phantom5 の画像再構成時の R は 0.846、 E_{SI} は 0.597 で 3 つの手法を用いて 5 パターンのファントムの画像再構成を行った中で最も精度が高かった。
- (6) EIT 法を用いてマイクロチャンネル内の画像化を行った結果、Z 軸方向の細胞の濃度分布を可視化することに成功した。しかしながら、EIS 法での濃度分布計測と比較した場合、その値には差異があり、ヤコビ行列や画像再構成法の改善が必要であることが明らかとなった。

以上より、EIS 法と EIT 法を用いて非侵襲かつオンラインでの細胞濃度計測が可能であると明らかにした。今後の研究において精度を改善し、また緩和周波数に着目することで、生死などといった状態の異なる細胞をオンラインで識別することが出来ると予想される。これにより、特異細胞の高速かつオンラインでの識別、分離が可能となる。

ステージ【2-3】

【2-3】 血液循環流路における実験

1. 緒言

1.1. 研究目的

血液の体外循環流路における微小血栓および血栓形成をリアルタイム、オンラインで予測、検出できるモニタリングシステムの開発を最終目的とする。本研究では、下記の実験を行い血液と血栓の電気特性の計測および可視化を行うことで、血栓が電気特性に及ぼす影響について検討することを目的とする。

(1) 血液流量を変化させ、赤血球の配向の影響を可視化計測する。

(2) キャパシタンストモグラフィセンサー (ECT センサ) による非接触キャパシタンス計測を行い、静止場での血栓形成過程のキャパシタンス特性の確認をする。

(3) 循環流路内の血栓形成過程において、ECT センサと二電極センサを用いてキャパシタンス計測を行い、

(i) その時間変化について接触と非接触センサーの感度の比較検討する。

(ii) 流動場における血栓形成過程とキャパシタンスの間の相関性について検討する。

2. キャパシタンスと赤血球の関係

2.1 で示したように、血液のキャパシタンスには赤血球が強く影響を及ぼす。この節では Hct (赤血球の体積分率)、赤血球の配向、赤血球の形状とキャパシタンスの関係をシミュレーションによって示す。シミュレーションは Hanai の式を用いて計算を行った。パラメータには Relative capacitance C_R を用い、シミュレーションの初期状態のキャパシタンスを 1 として算出している。

・ Hct

初期条件を Hct = 30 % とし、Hct = 50% まで増加させた。図 2.1 にキャパシタンスの変化、図 2.2 に Hct 増加のイメージ図を示す。この条件の Hct の範囲においては、は Hct の上昇に伴い C_R は線形的に増加し、最終的に 46% 増加した。

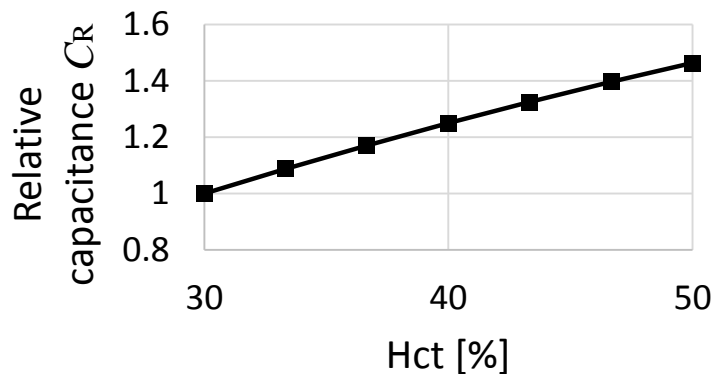


図 2.1 Relative capacitance C_R change with Hct

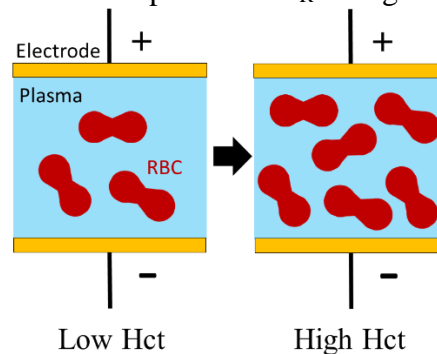


図 2.2 Schematic image of increasing of Hct

・ 配向

赤血球は楕円体であるため、電流に対して赤血球がどのように配向しているかでキャパシタンスは大きく変化する。ここでは図 2.4 に示すように赤血球の短径方向を x 、長径方向を y とし、 x 軸が電流に対して平行な割合を α_x とする。図 2.3 に、初期条件を $\alpha_x = 1$ とし、 α_x を変化させたときの計算結果を示す。電流に対して α_x が 1 に近づくほど電荷をためる面積が増え、 C_R が増加する。ここでも、ほぼ線形的な変化が見られた。

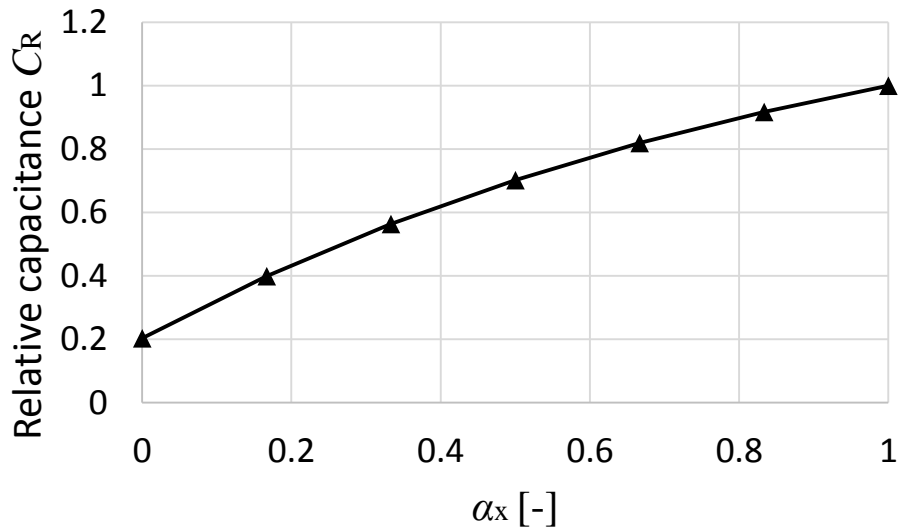


図 2.3 Relative capacitance C_R change with α_x

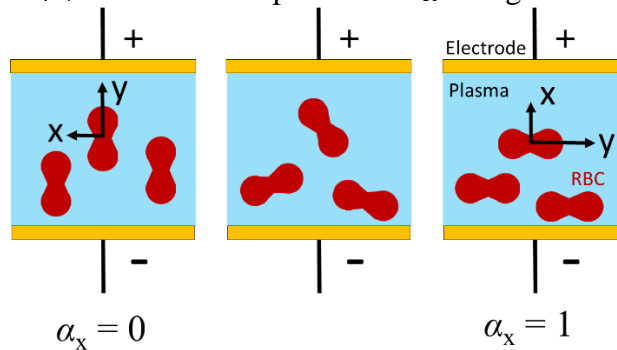


図 2.4 Schematic image of orientation of RBC

・ 形状

赤血球は円盤型をしておりその断面形状はおおよそ $8 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ の楕円形をしている。この短径を D_x 、長径を D_y とすると、通常 $D_y/D_x = 4$ 程度である。ここでは $D_y = D_z$ して D_y/D_x 値を変化させた場合を考える。図 2.5 に、初期条件を $D_x = 2 \mu\text{m}$ 、 $D_y = 8 \mu\text{m}$ とし赤血球の体積を一定として形状を球に近づけた。 D_y/D_x が 1 より多おおきければ円盤、1 と等しければ球、1 より大きければ卵のような形状となる。球に近いほど表面積が小さくなり電気容量も小さくなる。

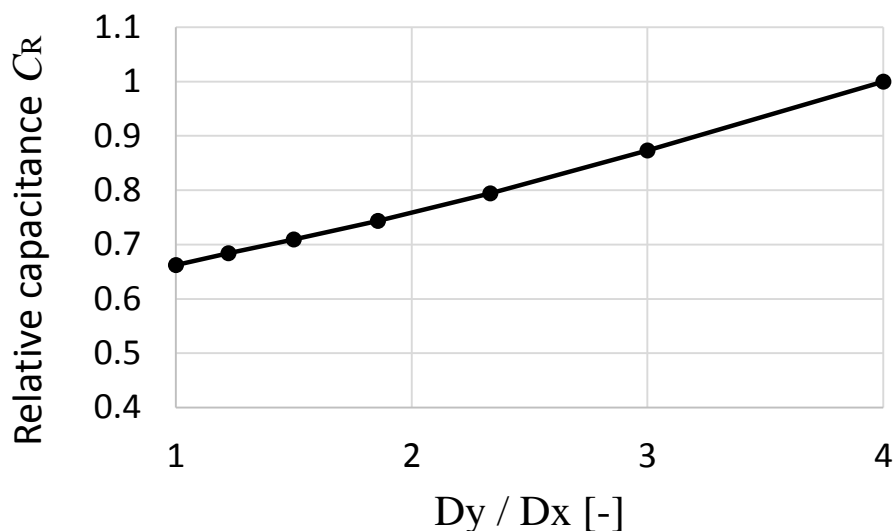


図 2.5 Relative capacitance C_R change with Dy / Dx

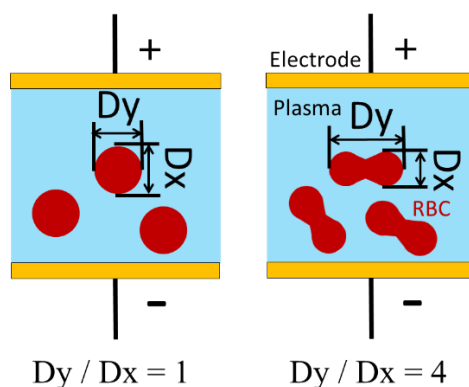


図 2.6 Schematic image of deformation of RBC

3. 血液流量変化実験

3.1. 血流量とキャパシタンス分布

実験目的

円管内を流れる血液の流量を変化させながらキャパシタンス計測を行うことで、赤血球の配向がキャパシタンスの断面分布に与える影響を調べる。

実験装置と試料

図 3.1 は実験装置を示す。実験装置は恒温槽(HB-1400; AS ONE Corporation, Japan)、リザーバー(SENKO MEDICAL INSTRUMENT Mfg. Co., Ltd., Japan)、流量計 (VNS-10F; Aichi Tokei Denki Co., Ltd, Japan) 、ローラーポンプ(RP-PLB; Furue Science K.K., Japan)、ECT センサー、マルチプレキサー、インピーダンスアナライザー(IM 3570; HIOKI EE. K.K, Japan)、制御用 PC で構成されている。回路長は約 4.5m である。チューブはヘパリンで抗凝固コーティングされており、外径 3/8inch、厚さ 3/32inch である。リザーバーは恒温層によって 37°C に保たれている。ECT センサーの各電極を同軸ケーブルでマルチプレキサーに繋ぎ、電極の組み合わせをスイッチングしながらインピーダンスアナライザーによってキャパシタンス計測を行う。

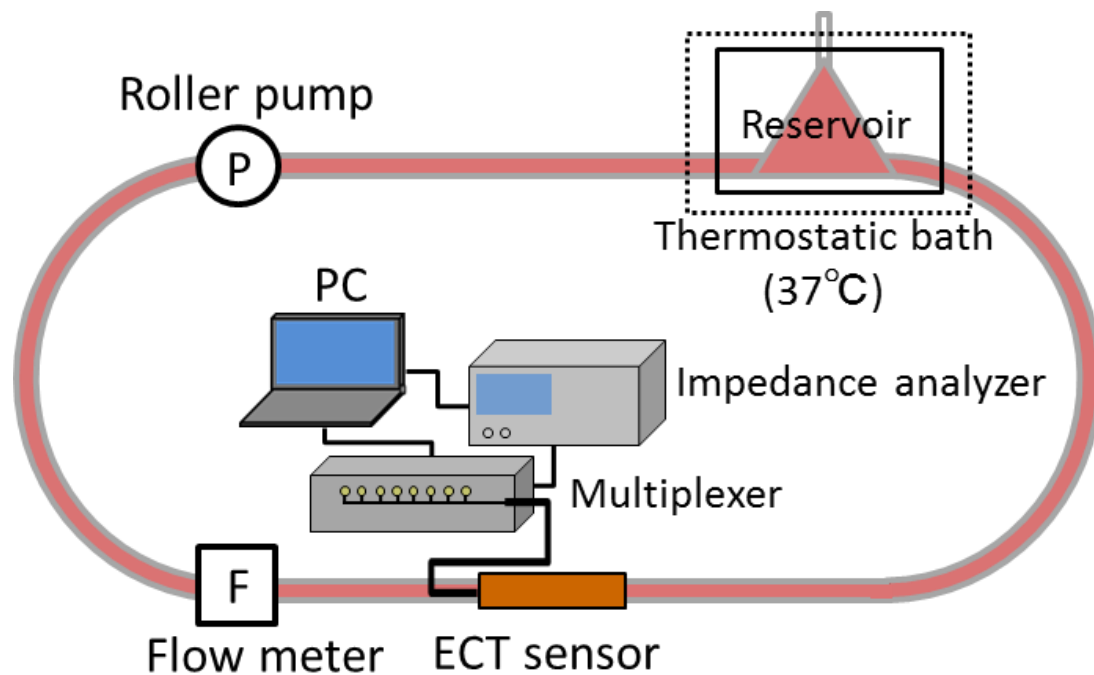


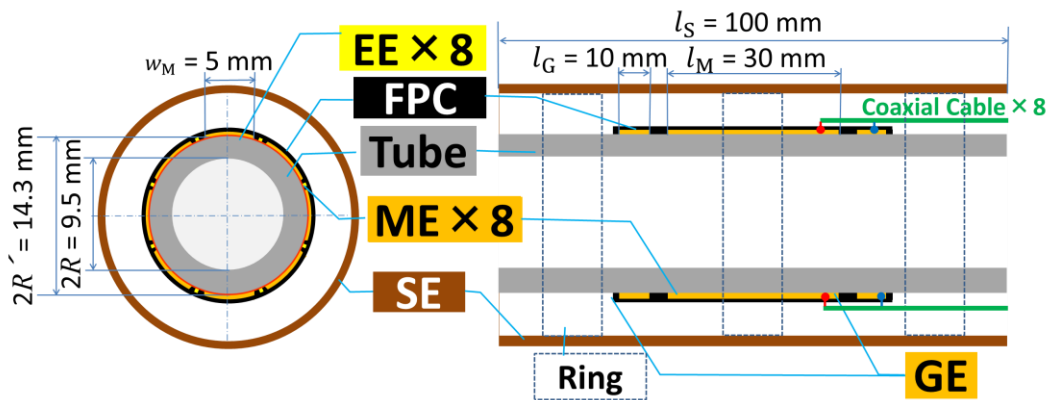
図 3.1 Experimental setup

実験に使用した血液サンプル

実験にはブタ血液(Shibaura Zouki K.K., Japan)を用いた。ブタ血液1000mLあたり、100mLの3.24%クエン酸ナトリウム水溶液(Tri-Sodium Citrate Solution; Shibaura Zouki K.K., Japan)が添加されており、血液の血漿中に含まれる遊離カルシウムイオンをクエン酸によってキレート化し、自然に凝固しないようになっている。購入した血液は遠心分離器(Micro Hematocrit Centrifuge Model 3220, KUBOTA Corporation, Japan)を用いて、12000rpmで5min遠心分離し、ヘマトクリットを測定した。実験に使用したブタ血液のHctは39%である。

ECT センサ

図 3.1 は ECT センサのスケッチである。このセンサは血液循環実験において用いている医療用チューブを基準に設計してある。Flexible PCB は Measurement Electrodes と Guard Electrodes、Earth Electrodes で構成されており、チューブの外側に巻き付けセロハンテープで固定している。図 3.2 は Flexible PCB の展開図である。各 Measurement Electrode の間には幅 0.2mm の Earth Electrode があり、上下の Guard Electrode に繋がっている。各 Measurement Electrode に同軸ケーブルの芯線をはんだ付けし、網線は Guard Electrode にはんだ付けした。ケーブルは RG174u を使用し、その長さはおおよそ 50cm である。また、Screen Electrode は厚さ 0.5mm の銅板で作っており、Guard Electrode と導線で繋げている。Guard Electrodes は Measurement Electrodes の電界の拡がりを抑えるためにあり、測定中は Guard Electrodes にも測定電極と同じ電圧がかけられている。そして、Earth Electrodes は、電極間の絶縁物に帯電させないために必要である。



- EE** Earth Electrode
- ME** Measurement Electrode w_M : Width of ME
- GE** Guard Electrode l_M : Length of ME
- SE** Screen Electrode l_G : Length of GE
- FPC** Flexible Print Circuit l_S : Length of SE

図 3.2 Cross sectional view of ECT sensor

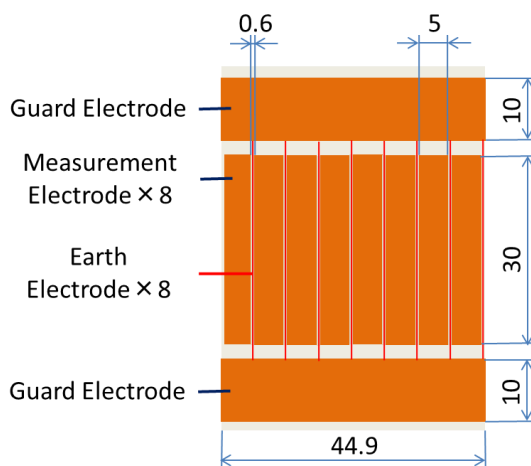


図 3.3 Design drawing of FPC

実験条件と方法

恒温槽で 37°C に保たれた流路を 900 mL のブタ血液で満たし、流量 $Q=1.5$ L/min で約 10 分間血液を循環させ、赤血球の沈降や偏りを取り除いた。その後、ポンプ出力を調整し、 $Q=2.7$ L/min から $Q=0.5$ L/min まで徐々に流量を減少さ

せ、電気計測を開始した。電気計測はポンプ出力を調整し、流量が一定になるまで循環させた後、約 3 分間行った。印加電流は 1 mA で 1 kHz ~ 3 MHz まで周波数を掃引し、その内 log プロット 100 点で計測を行った。

次に電気計測で取得したデータより、画像の再構成を行った。測定キャパシタンスの正規化に次式を用いた。

$$C^*_{ij-Q} = \frac{C_{ij-Q.f_2} - C_{ij-Q.f_1}}{C_{ij.0.f_2} - C_{ij.0.f_1}} \quad (3.1)$$

これは血誘電緩和を利用した正規化方法であり、同じ血液、同じ流量であっても周波数によって、測定されるキャパシタンスが異なる周波数領域が存在する。これを利用すること

で(3.1)式の正規化を行うことができる。 C^* は正規化キャパシタンスで、下付の i と j は電極の番号($i=1,2,\dots,7, j=i+1,\dots,8$)、 Q は流量、 f_1, f_2 は測定周波数である ($f_1 \neq f_2$)。 C^* は流量 Q のときの測定キャパシタンスの($C_{ij-Q, f_2} - C_{ij-f_1, Q-f_1}$)を $Q=0.0\text{L/min}$ のときの測定キャパシタンス($C_{ij_0, f_2} - C_{ij_0, f_1}$)で除することで定まる。以上の正規化を行った後、LBP 法によって画像の再構成を行う。

実験結果と考察

実験結果を図 3.4 に示す。正規化は $f_2 = 100\text{ kHz}$ で固定とし f_1 の値を変化させている。

$f_1 = 150 \sim 550\text{ kHz}$ においては、 $Q = 0.8 \sim 1.6\text{ L/min}$ にかけて血液流量の増加に伴い、中央部の低キャパシタンス域が増加している。 $Q = 2.3\text{ L/min}$ 以上の流量では赤血球が配向し、導電率が増加することが知られている¹²。そこで、キャパシタンスの変化について、赤血球の配向の影響が大きいと考えて考察を行う。

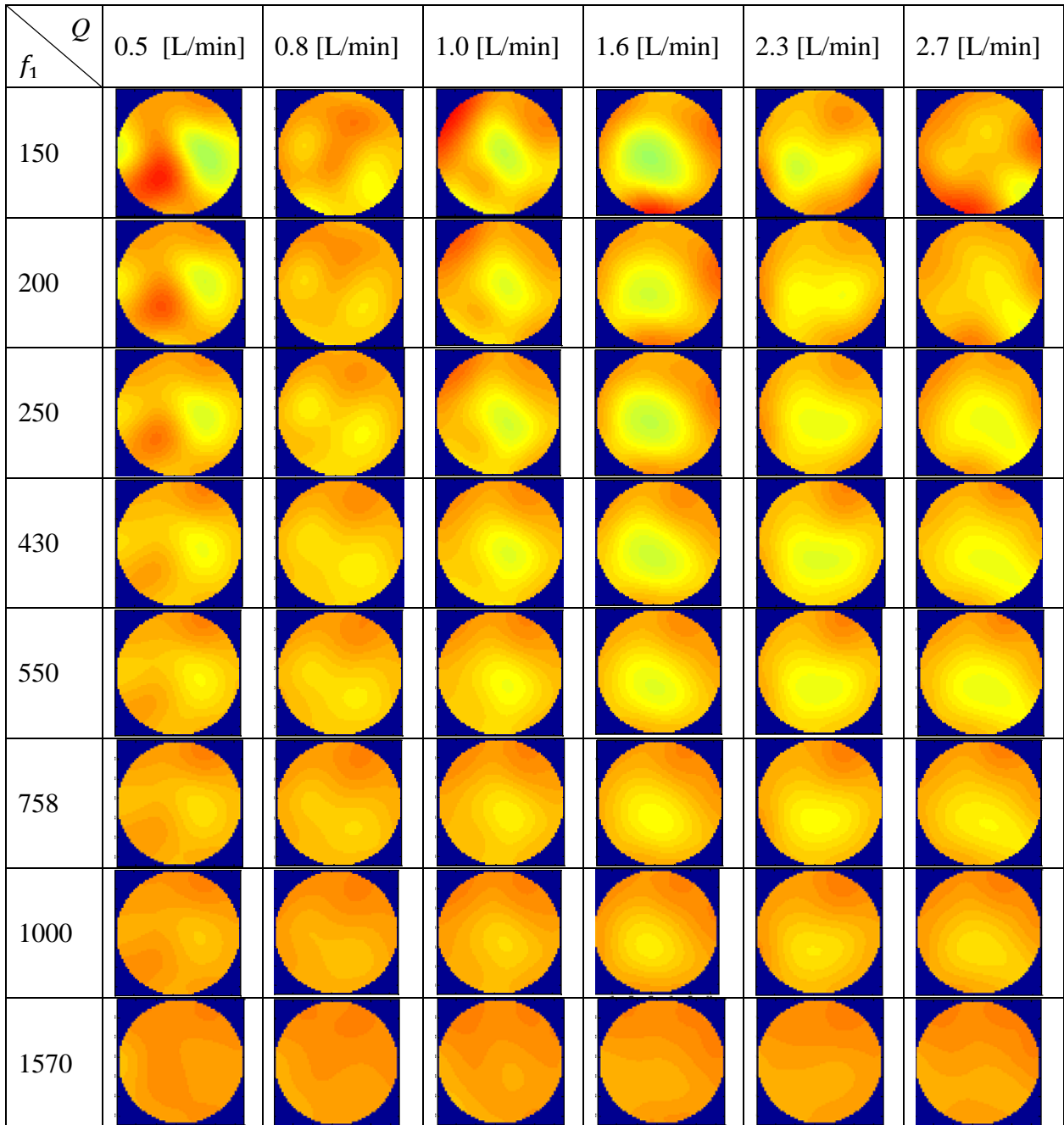


図 3.4 Experimental result of reconstructed images

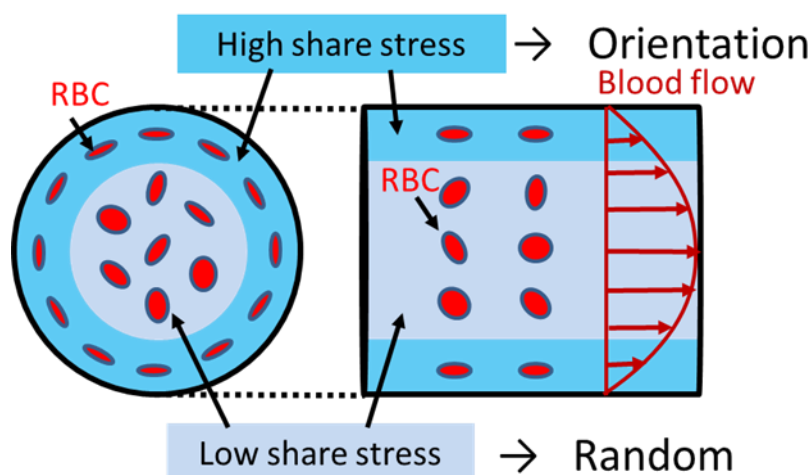


図 3.5 orientation

2.5L/min以下の流量で、流量の増加に伴って緩和周波数が増加した。これは赤血球の配向による影響が強く、流量が増加すると電流に平行な赤血球の量が増えるためだと考えられる。この実験結果に対して、せん断応力と赤血球の配向の関係を仮定してシミュレーションを行った。

血液がポアズイユ流れに従うと仮定すると、最大速度 v_{max} は

$$v_{max} = 2 \frac{Q}{A} \quad (3.1)$$

である。ここでチューブの断面積 $A = \frac{\pi d^2}{4}$ 、 d は管内径 9.5mm である。

v_{max} から、せん断応力は

$$\tau(r) = v_{max} \frac{8\eta}{d^2} r \quad (3.2)$$

である。ここで r は半径、 η は粘性係数であり $4\text{mPa} \cdot \text{s}$ とする。赤血球が電流に垂直な割合 a_x を

$$a_x(r) = \frac{2}{3} \frac{f(r)}{1+f(r)} \quad (3.3)$$

と仮定した。ここで f は

$$f(r) = \begin{cases} 1 & (\tau(r) < \tau_1) \\ \frac{\tau(r) - \tau_2}{\tau_1 - \tau_2} & (\tau_1 \leq \tau(r) \leq \tau_2) \\ 0 & (\tau_2 < \tau(r)) \end{cases} \quad (3.4)$$

とし、 $\tau_1=0.03\text{Pa}$ 、 $\tau_2=0.4\text{Pa}$ とした。流量が増加すると緩和周波数も増加するという傾向は実験結果と合い、配向の影響が見られたが、絶対値が大きく異なるため、流動場では配向以外にも考慮すべき現象があると考えられる。

3.2. 血液と球状微粒子サスペンションとの比較

実験目的

3.1 で可視化した血流のキャパシタンス分布は楕円体である赤血球の配向によるものであることを球状粒子との比較で確かめる。

実験装置と試料

実験装置は 3.1 で使用した循環流路と同様のものであるが、マルチプレキサーとインピーダンスアナライザーにかわり ECT 用のキャパシタンス測定システム (ACECT, ECT Instruments Ltd, England) を使用している。ECT センサの測定電極を同軸ケーブルで ACECT に接続し、全 28 組の電極ペアでキャパシタンスの測定を行う。全てのペアの測定をまとめて 1 測定とすると、測定スピードは 75 measurement/sec である。制御用 PC でデータの保存、リアルタイムでの画像の再構成を行っている。

実験に使用した試料

血液は 3.2 と同様の処理がされたブタ血液であるが、この実験では Hct = 40% である。球状微粒子サスペンションは、真球状架橋ポリマー微粒子 (Artpearl, Negami Chemical Industrial Co., Ltd, Japan) を生理食塩水 (Otsuka normal saline, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Japan) に分散させたものである。各試料について特性等を表 3.2.1 に示す。

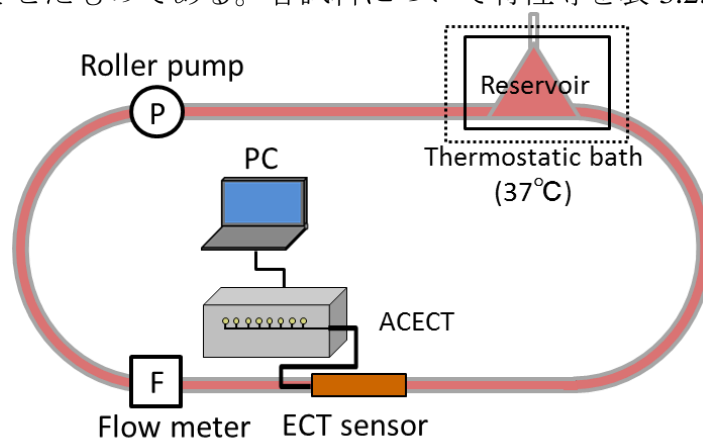


図 3.6 Experimental setup

表 3.2.1 Characteristics of the blood and the suspension

	Porcine blood		Saline + particle	
Cell	Red blood cell		Acrylic fine particle	
Vol. % of cell	38		30	
Shape	Ellipsoid		Sphere	
Diameter	8 μm \times 2 μm		10 μm	
Conductivity	Plasma	RBC	Saline	particle
	High	Low	High	Low

実験条件と方法

恒温槽で 37°C に保たれた流路を 800mL の試料で満たし、流量 $Q=1.5$ L/min で約 10 分間循環させ、試料の沈降や偏りを取り除いた。その後、ポンプ出力を調整し、 $Q=2.7$ L/min から $Q=0.5$ L/min まで徐々に流量を減少させ、電気計測を開始した。電気計測はポンプ出力を調整し、流量が一定になるまで循環させた後、約 2 分間行った。生理食塩水について

も同様にキャパシタンス計測を行った。全ての試料において、印加電圧は 18V、測定周波数は 160kHz である。

画像再構成のための正規化には次式を用いた。

$$C^*_{ij} = \frac{C_{ij,m} - C_{ij,low}}{C_{ij,high} - C_{ij,low}} \quad (3.2)$$

これは、2種類のキャパシタンスの異なる物質を用いて、上限と下限を決定する正規化方法である。 $C_{ij,m}$ は測定キャパシタンス、 $C_{ij,low}$ はセンサ内を低いキャパシタンスの物質で満たしたときの測定キャパシタンス、 $C_{ij,high}$ はセンサ内を高いキャパシタンスの物質で満たしたときの測定キャパシタンスである。 $C_{ij,m} = C_{ij,low}$ の場合、正規化キャパシタンス $C^*_{ij} = 0$ となり、 $C_{ij,m} = C_{ij,high}$ の場合、 $C^*_{ij} = 1$ となる。つまり $1 \geq C^*_{ij} \geq 0$ となる。 $C_{ij,m}$ が正規化で定めた上限もしくは下限の値を超えてしまう場合、 C^*_{ij} は 1 もしくは 0 の値をとる。この実験での正規化の条件を表 3.2.2 に示す。A と B の二つのパターンで行った。

表. 3.2.2 Normalization pattern

	High	Low
Normalization A	Pure water (static)	Saline (static)
Normalization B	$Q = 0.0$ L/min	$Q = 2.7$ L/min

Normalization A では純水と生理食塩水を用いる。静止場において、ECT センサをこの二種の液体でそれぞれ満たしたときのキャパシタンスを $C_{ij,high}$ 、 $C_{ij,low}$ とする。キャパシタンスの文献値はどちらの液体もほぼ同じであるが、ECT センサを用いてキャパシタンスを測定する場合には、生理食塩水の導電率が高いため見かけのキャパシタンスが純水より低くなることを利用し、正規化を行う。血液についても生理食塩水と同様で、血漿の導電率が高いため、実際のキャパシタンスより見かけのキャパシタンスが低くなる。その見かけのキャパシタンスは純水と生理食塩水の間にある。

また、血液は静止場と流動場ではキャパシタンスが異なることが予想される。静止場では赤血球の凝集が起り、キャパシタンスが高くなるためである。これを利用し、Normalization B の正規化を行う。Normalization B では測定対象となる液体のみを用いて球状微粒子サスペンション、生理食塩水についても同様に、それぞれ静止場と流動場 ($Q = 2.7$ L/min) のキャパシタンスを計測し、正規化を行った。画像の再構には A、B どちらの正規化パターンにおいても LBP 法を用いた。

実験結果と考察

図 3.7 にパターン A で正規化した再構成画像を示す。正規化で定めた下限 (0) と上限 (1) を 2^8 で分割し、新たに下限を 0、上限を 255 とするパラメータを各ピクセルに割り当て、それに対応するカラスケールで再構成画像は表される。本稿では、このパラメータを Capacitance parameter C_p と呼ぶ。図 3.7 では、球状微粒子サスペンション、生理食塩水にはどの流量においても変化が見られず、血液のみに流量による変化が見られた。

この血流量によるキャパシタンスの変化を C_p を用いてグラフにしたものを図 3.9 に示す。横軸 Relative radius r は図 3.9 のように再構成画像の中心を通る直線である。 $Q \neq 0.0$ L/min の場合、曲線は下に凸の傾向が見られた。これは、3.1 と同様に赤血球の配向によって周囲のキャパシタンスが高くなり、中央は低くなったためと考えられる。 $Q = 0.0$ L/min の場合に、 r 全域で比較的 C_p が高く、曲線が上に凸であるのは、赤血球が特に中央で凝集しているためと考えられる。また、 $Q = 1.5$ L/min と $Q = 2.7$ L/min を除き、流量が増加するにつれて中央部の C_p が減少していることから、赤血球の配向だけではない影響があると考えられる。

図 3.10 にパターン B で正規化し再構成画像を示す。 C_p とカラスケールはパターン A

と同様である。球状微粒子サスペンションと生理食塩水においてはパターン B の正規化によって画像を得ることができなかった。これはこの二種の試料が流量によってキャパシタンス変化しないことを裏付けている。血液のキャパシタンス変化は $Q = 0.5 \text{ L/min}$ からほぼ全領域において 0 に近い値

本来ならば、 $Q = 0.0 \text{ L/min}$ の場合は r 全域において $C_p = 255$ 、 $Q = 2.7 \text{ L/min}$ の場合は r 全域において $C_p = 0$ であるが、実際は $Q = 0.0 \text{ L/min}$ の外側 4 分の 1 程度の C_p が 255 よりも低い値となっている。これは静止場においては赤血球の挙動が安定せず、絶えず動いているためと考えられる。また $Q = 2.7 \text{ L/min}$

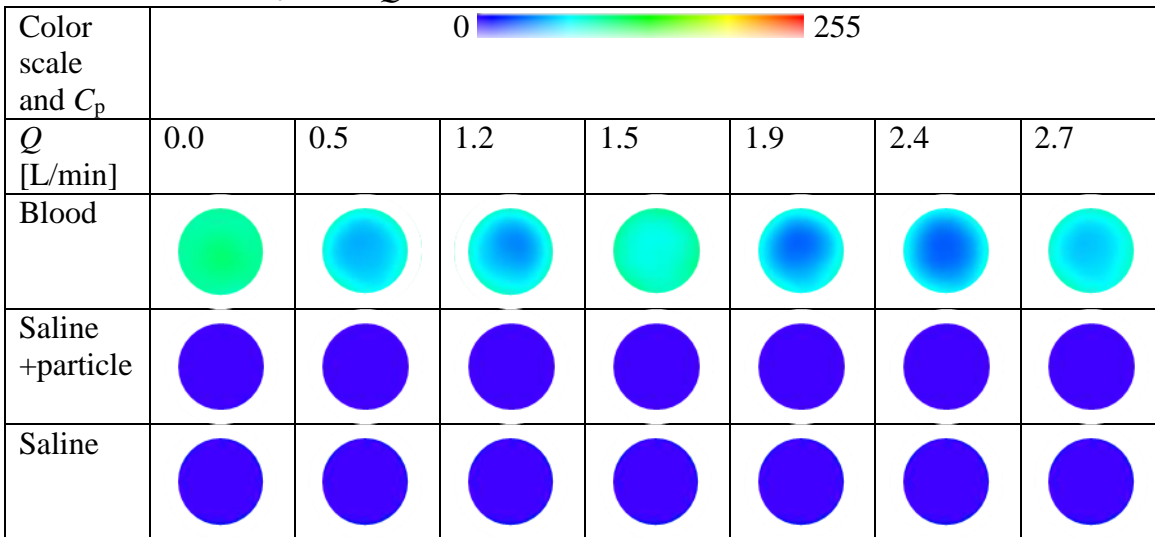


図 3.7 Reconstructed images normalized with pure water and saline (pattern A)

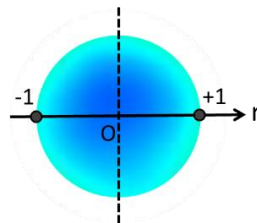


図 3.8 Schematic image of relative radius

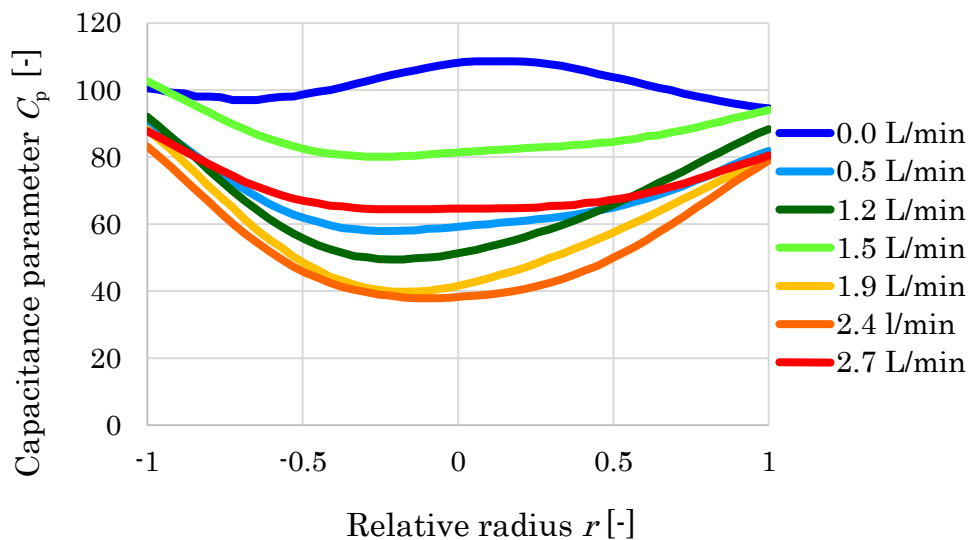


図 3.9 C_p change with blood flow rate (pattern A)

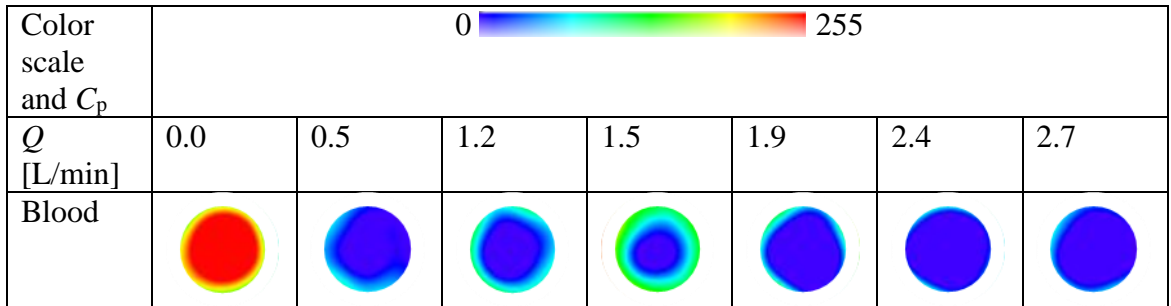


図 3.10 Reconstructed images normalized with flow rate change (pattern B)

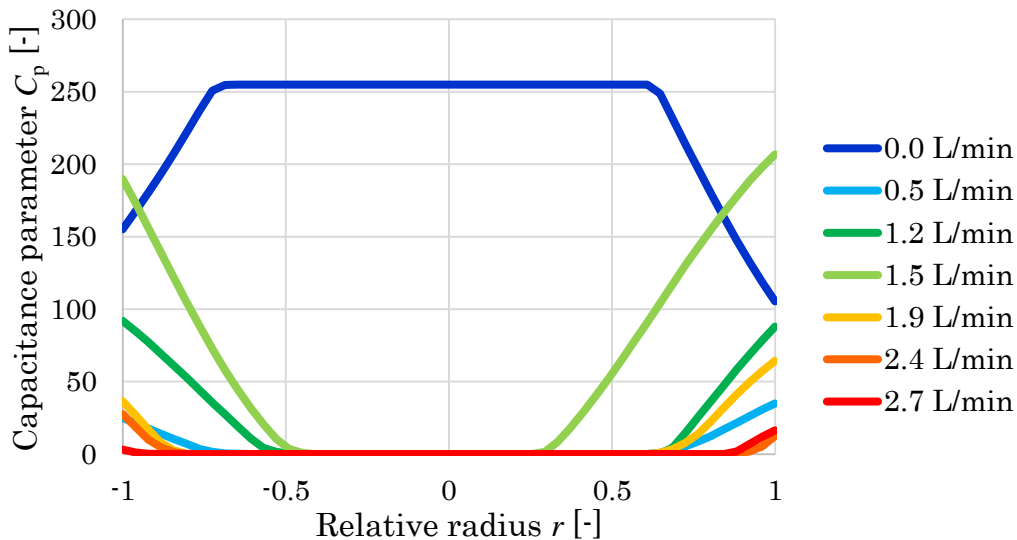


図 3.11 C_p change with blood flow rate (pattern B)

4. 静止場中の血栓形成過程の計測

4.1. 実験目的

静止中の血液にカルシウムイオンを添加して血栓形成を促し、ECT センサでキャパシタンス計測を行い、抗凝固処理が施された血液のキャパシタンス計測の結果と比較することで、ECT センサによる非接触キャパシタンス計測の血栓形成過程に対する有効性を確認する。

4.2. 実験装置と試料

図 4.1 に実験装置を示す。実験装置は ECT センサ、ACECT、制御用 PC で構成されている。ECT センサを取り付けたチューブをクランプで固定し、センサ下部のチューブを鉗子でとめる。ECT センサは同軸ケーブルで ACECT に接続され、キャパシタンスの測定、データの保存、画像の再構成を行う。これらの電極と ACECT は同軸ケーブル (RG174/U, Image System Application Co., Ltd., Japan) により接続されている。使用した血液は 3 章と同様にブタ血液であるが、この実験では Hct=43% である。凝固剤として 2% 濃度の塩化カルシウム液 (Otsuka calcium chloride, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Japan) を使用した。

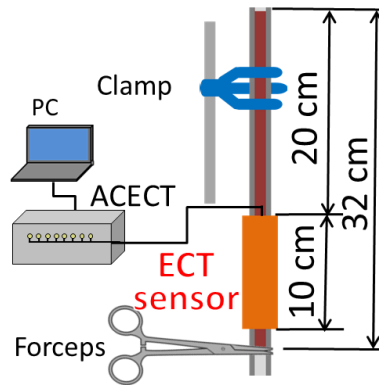


図 4.1 Experimental setup

4.3. 実験条件と方法

まず、塩化カルシウムを添加しない血液(a)30ml をチューブ上部より注ぐ。注ぎ終わったところで計測を開始する。(a)の計測終了後、チューブを洗浄し、(b)の計測を行う。(b)の血液の場合、事前に血液 50ml と塩化カルシウム 0.75ml を遠沈管で手早く混ぜ、その内の 30ml をチューブ上部より注ぐ。実験は室温 (20°C) で行われた。正規化は(3.2)式を用いており、下限に静止血液、上限には静止純水を使用した。画像の再構成には LBP 法を使用している。

4.4. 実験結果と考察

図 4.2 はキャパシタンス時間変化をグラフにしたものである。このグラフは ECT センサの電極の組み合わせの内、**opposite pair** (1-5,2-6,3-7,4-8)の測定キャパシタンス C_m の平均値 $C_{<m>}$ をとったもので、正規化が行われていないオリジナルデータである。**opposite pair** の C_m を採用したのはチューブ内全体のキャパシタンス変化を見るため適しているからである。計測開始およそ 6 分後より (a) と (b) で $C_{<m>}$ の変化の傾向に差異がみられた。このときのキャパシタンスの値 $C_{<m,6min>}$ を 1 とし、(a) と (b) それぞれで **Relative capacitance** C_R を求めている。 C_R は次式で算出される。

$$C_R = \frac{C_{<m>}}{C_{<m,6min>}} \quad (4.1)$$

図 4.2 には約 5 秒間分の C_R のデータの移動平均をとってノイズを減少させた曲線を示してある。また、図 4.3 に再構成画像を示す。本稿には掲載していないが、再構成画像 3 章のようなは 0~255 まで均一にわけたカラスケールでは時間的な変化が見えなかった。そこで 45 を上限として、45~255 は同一色で表し、その分 0~45 までのカラーが細かく変化するカラスケールを使用した。また画像は、時間帯ごとの傾向を表す代表的なものを 1 枚ずつ選んでいる。これらの画像からもキャパシタンスの変化傾向みることができた。この実験では、ノイズを減少させながら詳細かつ容易に観測できる C_R をパラメータとし、キャパシタンス変化の評価を行う。

計測開始 6 分後より、(a) の C_R が時間と共に徐々に増加しているのに対し、(b) は 10 分頃にピークを迎えたのち減少した。また、目視による観察では(a)では赤血球の沈降が見られたが、(b)ではそれが見られなかった。(a)の C_R が増加したのは、Fig4.3 のスケッチのように赤血球の沈降によってセンサ部の Hct が増加したためであると考えられる。また、(b)の C_R の変化は Hayashi らの接触センサを用いた静止場における血栓形成過程の実験結果と定性的に一致する[論文]。以上より、作成した ECT センサでの血栓形成過程のキャパシタンス計測は、従来の接触センサ同様、有効であることが確認された。なお、計測開始初期に見られるキャパシタンスの減少は、(a)、(b)で共に見られることから血栓の形成には寄与しないものと考えられる。従ってここでは議論しない。

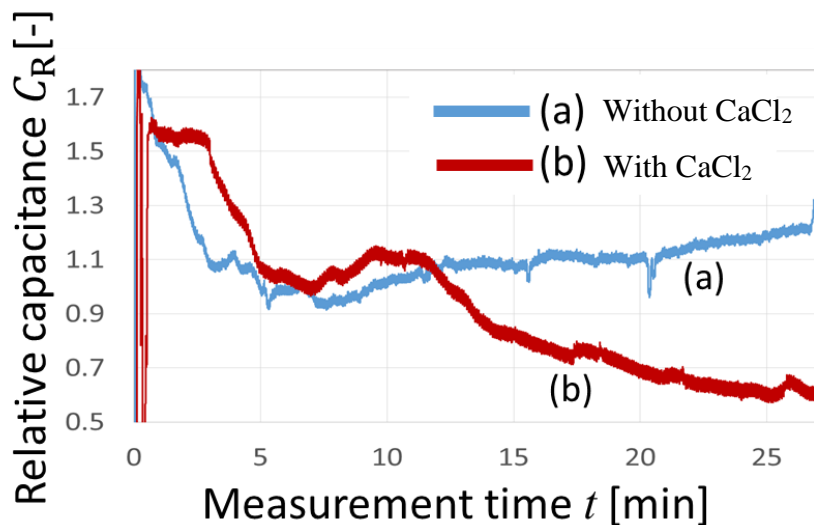


図 4.2 Capacitance change with time

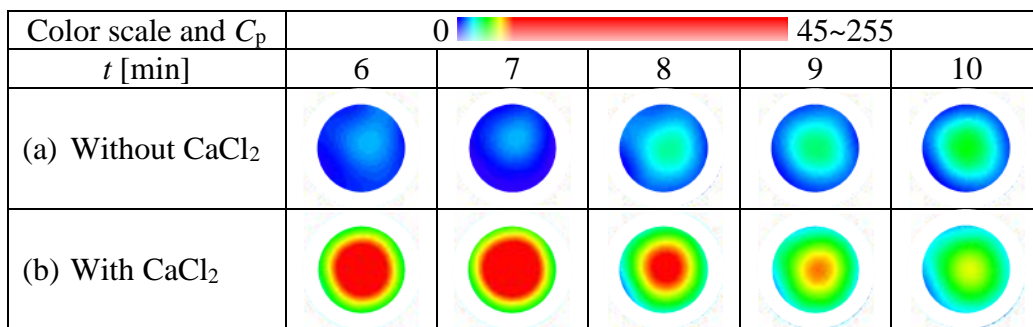


図 4.3 Reconstructed images

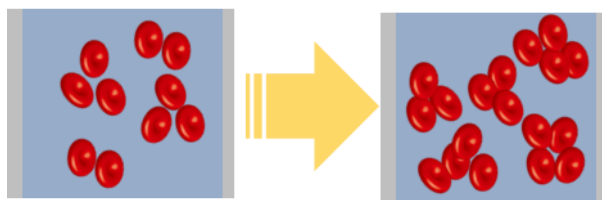


図 4.4 Image of sedimentation

5. 流動中の血栓形成過程の計測

5.1. 実験目的

流動中の血液にカルシウムイオンを添加して血栓形成を促し、キャパシタンス計測、Hct 測定、ACT（Activated Clotting Time: 活性化全血凝固時間）測定、目視観察を行うことで、血栓形成に伴う血液の変化を調べる。また非接触計測の ECT センサと接触計測の二電極センサを比較する。

5.2. 実験装置と試料

実験装置は 3.2 で使用した循環流路に、二電極センサを取り付けたもので図 5.1 に示す。使用した血液も同様にブタ血液だが、この実験では Hct=46.5% である。凝固剤には 4 章と同様の 2% 濃度の塩化カルシウム液を使用した。図 5.2 に二電極センサを示す。センサはステンレス製であり、図に示す通り、外径 11mm、長さ 30mm の円筒状電極、電極間距離

60mm で配置されている。これらの電極とインピーダンスアナライザーは 4 端子プローブ (Four-terminal probe L2000: HIOKI EE. K.K, Japan)により接続されている。インピーダンスアナライザーは測定対象のキャパシタンスを測定し、制御用 PC でデータの記録を行う。血液凝固分析装置 (Sonoclot, IMI CO.,LTD, Japan) を用いて ACT 計測を行い、血液の目視観察には工業顕微鏡 (ECLIPS LV100,Nikon, Japan) を使用した。

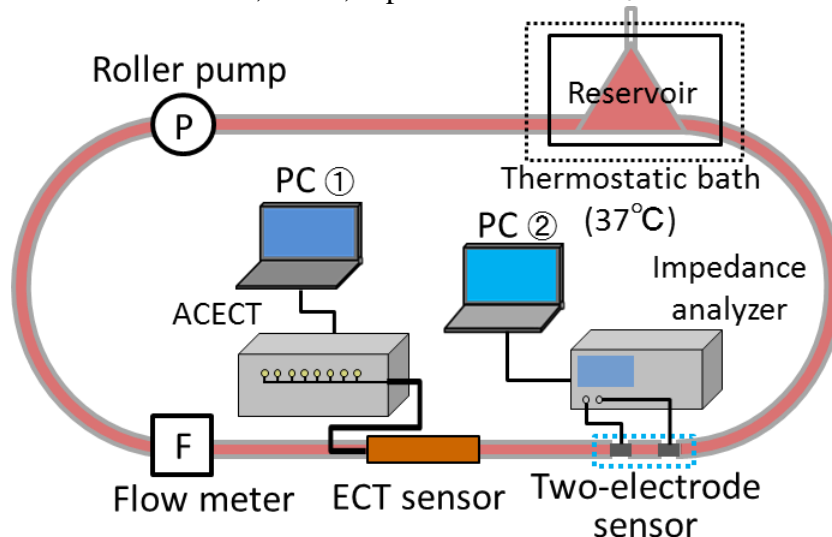


図 5.1 Experimental setup

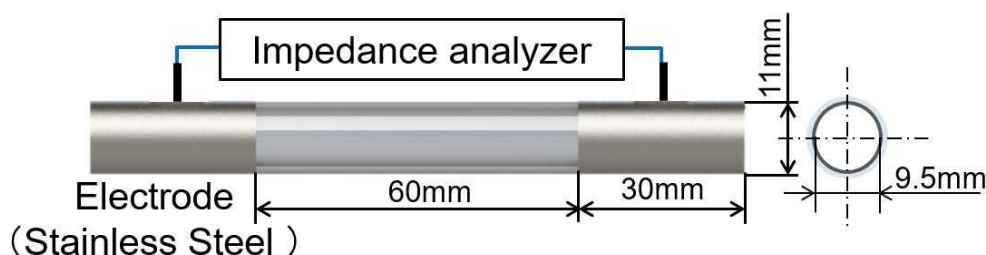


図 5.2 Two-electrode sensor

5.3. 実験条件と方法

恒温槽で 37°C に保たれた流路を 800mL のブタ血液で満たし、流量 $Q = 1.5 \text{ L/min}$ で約 10 分血液を循環させ、赤血球の沈降や偏りを取り除いた。Port より CaCl_2 溶液 12ml を 1 分掛けて注入し、注入し終えた時点を計測開始 0 分 (計測時間 $t = 0 \text{ min}$) とした。測定条件を表. 5.1 に示す。二電極センサのインピーダンスアナライザーによる計測は、測定前にケーブル長 1m において、OPEN 補正、SHORT 補正を行った。測定周波数 f は 100 kHz から 300 MHz の範囲で対数プロットにおいて均等に 200 点計測を行った。また、ECT センサでの正規化は(3.2)式を用いており、下限に静止生理食塩水、上限には静止純水を使用した。画像の再構成には LBP 法を使用している。

また、キャパシタンス計測と並行し、Hct 計測と顕微鏡観察、そして血液凝固能を測るクリニカルテストとして ACT 計測を行った。ACT は異物 (本実験ではガラス粒) が全血に接触してからの外因系による凝固時間のことであり、血液の固まりやすさを表している。ACT の値分、計測に時間がかかり、例えば ACT が 200 の場合は計測に 200 秒程度の時間を要する。通常、生体内の血液の ACT は 200 以下であるため、本実験では 600 を上回った時点で十分に大きいとして計測を打ち切っている。採血した全血で直ちに測ることができるため、実験中はこの値をもとに血液の状態を知り、実験の終了時間を決めた。購入した血液には抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムが添加されているため、 CaCl_2 溶液添加前の血液

の ACT は非常に大きく計測できない。2.4 で説明したが、フィブリノゲンは血栓の材料であり、フィブリノゲンが血中から減少することは血栓形成が進んでいることを示す。またフィブリノゲンがなくなった場合には凝固は起きないので、ACTは無有限大となる。

表.5.1 Measurement condition

	ECT sensor	Two-electrode sensor
Applied Voltage V / Current I	18 V	0.1 mA
Measurement frequency f	160 kHz	100 kHz ~ 300 MHz (200 point)
Sampling speed t_s	75 measurement/sec	1 spectrum/ sec
Measurement time t	23 min	
ACT・Microscope	Every 6 min	
Hct	$t = 6$ min, 23 min	

5.4. 実験結果と考察

図 5.3 (a) は 4 章と同様に、ECT センサで計測した C_R の時間変化をグラフにしたもので、ここで C_R は $t = 0$ min での $C_{<m>}$ の値 $C_{<m,0>}$ を用いて次式で表される。

$$C_R = \frac{C_{<m>}}{C_{<m,0>}} \quad (5.1)$$

図 5.3 (b) は二電極センサで計測したキャパシタンスのうち、測定周波数 $f = 2$ MHz のときの結果である。20 点のデータの移動平均をとって、ノイズを減少させている。(a)、(b) どちらのセンサで計測した結果も、計測開始直後より C_R は徐々に増加しはじめ、 $t = 15$ min ごろにピークを迎えたのち減少した。

図 5.4 に ECT 計測による再構成画像を示す。 C_p 、カラスケールは下限を 50、上限を 100 として画像を表示してある。画像は、4 章と同様に時間帯ごとの傾向を表す代表的なものを 1 枚選んでいる。これらの画像からもキャパシタンスの増加傾向、減少傾向を見ることができた。また、図 5.5 に ACT の計測結果、図 5.6 に Hct の計測結果、図 5.7 と図 5.8 には顕微鏡での観察写真を示す。 $t = 6$ min で、ACT は 78 sec となり凝固反応が進んでいることがわかる。そして $t = 12$ min で ACT は 600 sec 超え、計測ができなくなったことから、すでに血栓は形成され、凝固反応の終了もしくはそれに近い状態にあることがわかる。また、図 5.7 に示すように $t = 12$ min、18 min、24 min の観察では微小血栓が見られた。Hct は、実験開始初期時と実験終了時において変化せず、血漿の色も無色透明であったことから、この実験によって溶血は起きなかったことがわかる。溶血とは、血中の赤血球が何らかの要因によって損傷を受け、赤血球中に含まれるヘモグロビンが血漿中に漏出し、赤血球が死に至る現象である。この電気計測によって溶血が起こることはなく、言い換えると計測結果には溶血の影響はない。これらの結果より C_R の時間変化について考察する。

まず $t = 0 \sim 15$ min 頃までの C_R の増加についてであるが、これは血栓の形成や成長に伴い血栓体積が増えたことによる影響と考えられる。この血栓の形成に伴うキャパシタンスの増加は、先行研究における静止場における実験からも同様の結果が得られている¹¹。顕微鏡での観察からも、12 min から 18 min で血栓の形成・成長を見ることができた。しかし、 $t = 6$ min の顕微鏡観察では微小血栓を発見できなかったが、その時刻において C_R はすでに増加傾向を見せているため、2.4 で述べたような血栓ができる前の血液の変化がキャパシタンスに影響を及ぼすものと考えられる。

続いて、 $t = 15$ min 頃から実験終了までの C_R の減少についてである。これは血中のフィブリノゲンがなくなったことにより血栓の形成が終了し、その後血餅退縮や線溶によって血栓体積が減少したためと考えられる。血餅退縮とは、血栓が形成された後、血栓に含まれる血小板が縮み血栓を小さくする現象のことである。顕微鏡観察においても 18 min から 24

min で血栓の減少を見ることができた。また、先行研究では赤血球の変形がキャパシタンスの減少をもたらすという報告がされている。図 5.8 に示すように、本研究の実験終了時にも一部で赤血球の形状に変化が見られた。しかし、その影響についてはさらなる検証が必要である。

・センサの比較

図 5.3 の (a) と (b) を見ると、ピーク時の増加率は、二電極センサが 2% であるのに対し、非接触センサでは 7% となり、比較して 5% 大きくなった。これはコンタクトインピーダンスによる影響であると考えられる。コンタクトインピーダンス z_F は次式で表される。

$$\phi + z_F \sigma \frac{\partial \phi}{\partial n} = U$$

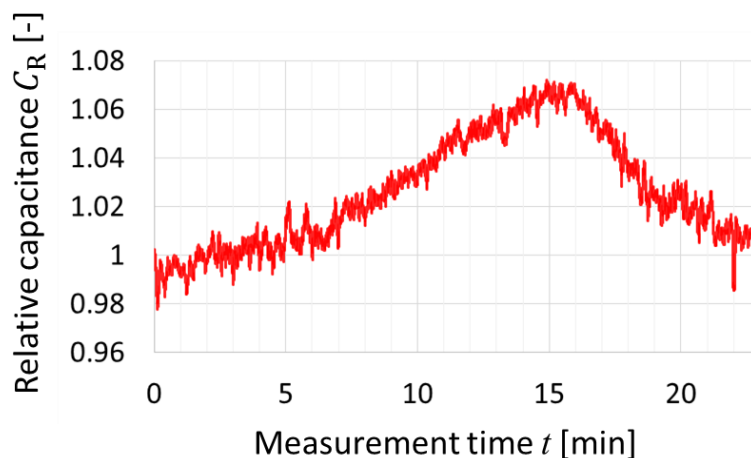
ここで ϕ 、 σ 、 n 、 U はそれぞれ、血液の電位 [V]、血液の導電率 [S/m]、外向き単位法線ベクトル、電極の電位 [V] である。非接触計測である ECT センサでは、 z_F が発生せず、二電極センサより電極界面の影響を受けにくいいため、感度が高くなった。

・測定周波数

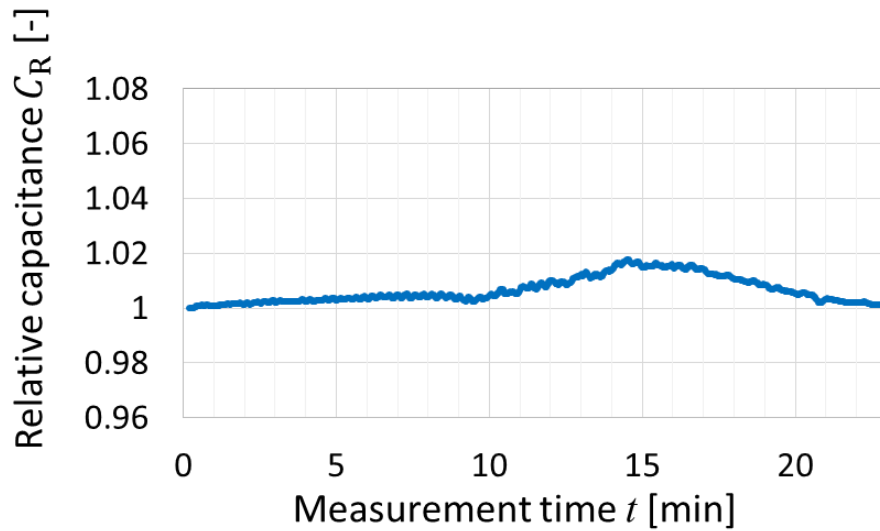
図 5.3 (b) に示した $f = 2 \text{ MHz}$ の計測データに加え、図 5.9 に $f = 160 \text{ kHz}$, 1 MHz , 4 MHz , 10 MHz のときのものを載せた。ECT センサの測定周波数と同じ $f = 160 \text{ kHz}$ のデータは、他の高周波のものと比較し、ノイズが大きい。これは低周波域では、電極界面の電気二重層の影響を受けるためである。 C_R の時間変化は、 $f = 160 \text{ kHz}$ から $f = 4 \text{ MHz}$ までの周波数域では、 $t = 15 \text{ min}$ 頃にピークを向かえた後減少する傾向が見られた。また、このピークを迎える前に、 $t = 6 \text{ min}$ 頃に $f = 160 \text{ kHz}$, 1 MHz のときは上に凸、 $f = 4 \text{ MHz}$ のときは下に凸の別のピークが見られた。このように周波数を掃引することによって、血液の状態をより詳しく見ることができるとは、計測に時間が掛かってしまうというデメリットもある。

・再構成画像

図 5.4 に示した再構成画像から、キャパシタンスの増加傾向、減少傾向を見ることができた。図 5.10 は $t = 5 \text{ min } 0.0 \text{ sec} \sim 5 \text{ min } 3.0 \text{ sec}$ の 3 秒間で得られた再構成画像である。流動場では、赤血球や血栓の動きに加え、物理的な振動が電気計測に影響を及ぼす。実際には、図に示すようにわずかな時間でも画像は変動するため、画像 1 枚のみでキャパシタンス分布の判断をすることは難しい。今回は同じ時間帯の画像を比較し、目視での選定を行ったが、これではリアルタイムでのモニタリングは実現できない。これを解決するためには、前後の画像を用いて各ピクセルごとに移動平均をとるなど、リアルタイムでノイズを除去するシステムが新たに必要である。

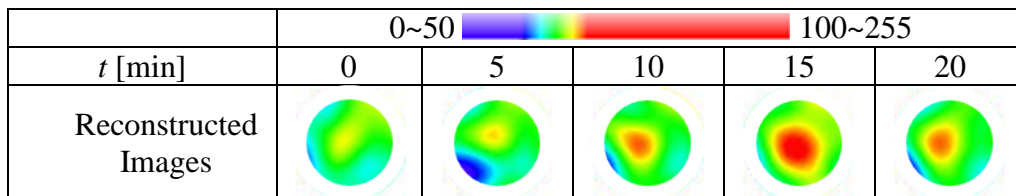


(a) ECT sensor, 18V, 160 kHz



(b) Two-electrode sensor, 0.1mA, 2 MHz

☒ 5.3 Relative capacitance C_R change with time



☒ 5.4 Reconstructed images
 $t = 0 \text{ min} \sim 20 \text{ min}$

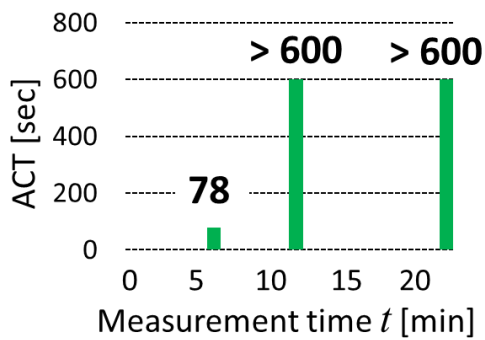


Fig. 5.5 ACT value

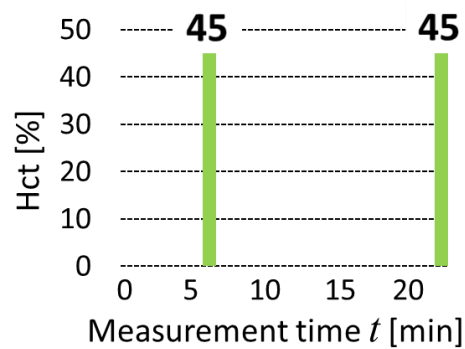
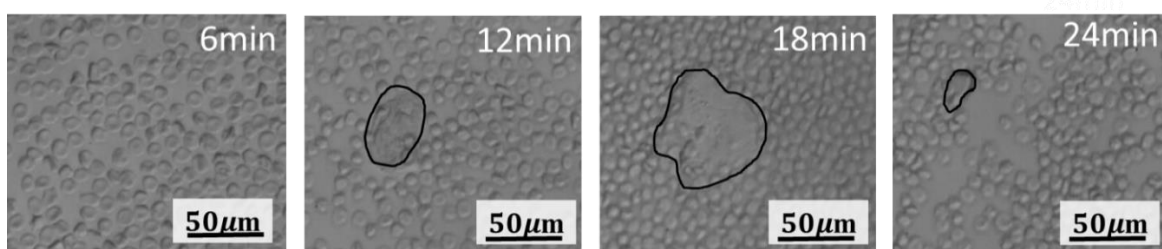


Fig. 5.6 Hct value



☒ 5.7 Images of microscope observation

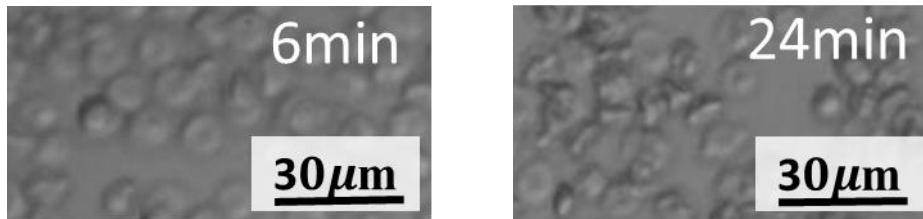


図 5.8 Deformation of RBC

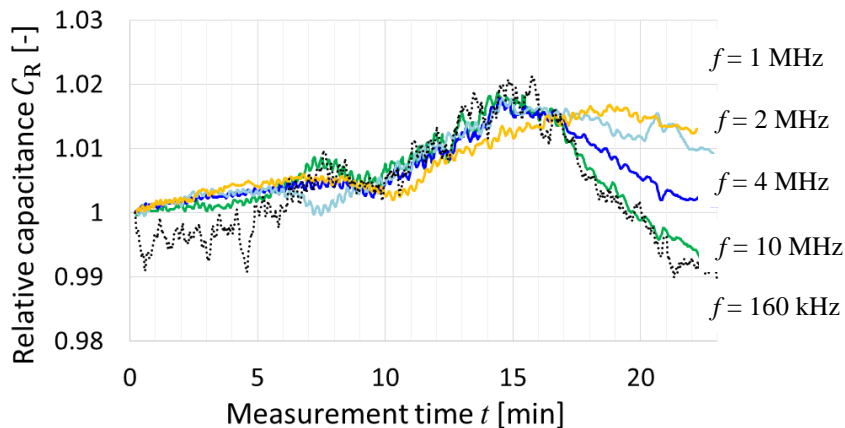


図 5.9 Relative capacitance C_R change with time and measurement frequency

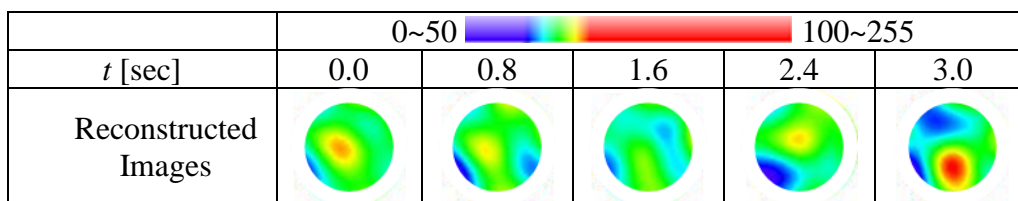


図 5.10 Reconstructed images
 $t = 5 \text{ min } 0.0 \text{ sec} \sim 5 \text{ min } 3.0 \text{ sec}$

6. 結言

本研究では、血栓形成をオンラインで予測・検出できるモニタリングシステムの実現に向けて、ECT センサを用いた非接触キャパシタンス計測を用いて、静止血液中・流動血液中での血栓形成過程の実験を行った。また、血液流量の変化を計測し、赤血球の状態がキャパシタンスに及ぼす影響を検討し、以下のことが明らかとなった。

(1) 血液流量を変化させ、赤血球の配向の影響を可視化計測する。

(2) キャパシタンストモグラフィーセンサ (ECT センサ) による非接触キャパシタンス計測を行い、静止場での血栓形成過程のキャパシタンス特性の確認をする。

(3) 循環流路内の血栓形成過程において、ECT センサと二電極センサを用いてキャパシタンス計測を行い、

(i) その時間変化について接触と非接触センサーの感度の比較検討する。

(ii) 流動場における血栓形成過程とキャパシタンスの間の相関性について検討する。

- (1) 血流量変化実験より、ECT センサによって赤血球の配向を可視化できた。
- (2) 静止場での実験より、非接触センサーによるキャパシタンス計測の結果は既往研究と定性的に一致した。
- (3) 流動場での実験より、非接触センサーによる計測は、血栓によるキャパシタンス C_R の増加率が接触センサーと比較し3%高いことを示した。
- (4) 流動場においても、血栓体積とキャパシタンスの間に相関性があることが示唆された。

以上より、ECT センサーを用いた非接触計測を用いた実験結果から、キャパシタンスから血液の状態を推測することによる流動中での血栓検出の可能性を示すことができた。

ステージ【2-4】

【2-4】 シミュレーションによる検討

1. 研究目的

本研究の目的は、最終目的である血栓形成をオンラインで予測・検出できるモニタリングシステムの実現のために、流動場で下記の実験を行い、血液の緩和周波数を計測することで、血液の状態が緩和周波数に及ぼす影響について検討することである。

- (1) 血液流量を変化させ、赤血球の配向の影響をみる。
- (2) 血栓形成過程の血液の変化をみる。

2. 血栓計測

2.1 Cole-Cole解析のプログラム

表 2.1 で Cole-Cole パラメータを求める部分の VBA プログラムを示す。円のフィッティングはニュートン法を用いて評価関数が最小となるように行い、緩和周波数は一次方程式の最小二乗法によって求められた一次方程式の切片を傾きで割ることで求めた。

円のフィッティングに用いた評価関数 D は、

$$D = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\|Z_i - C\| - r)^2} \quad (2.1)$$

$$r = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \|Z_i - C\| \quad (2.2)$$

である。ここで、 N はデータ数、 Z_i は計測インピーダンス、 C は円の中心、 $\|\bullet\|$ は二乗ノルムである。 D が最小になるように C は修正される。

表 2.1 Cole-Cole analysis program

```
Function calc_parameter()  
  Dim i As Long  
  Dim j As Long  
  Dim df As Double  
  
  Dim fp1 As Double  
  Dim fp2 As Double  
  Dim dx As Double  
  dx = 0.000001  
  
  Dim deltafp2 As Double  
  
  Dim nowdelta2 As Double  
  func = set_parameter(Cx, Cy) ' 評価関数の計算に使う値の代入  
  nowdelta2 = delta2() ' 評価関数の計算  
  
  For i = 1 To 1000  
    Call set_parameter(Cx + dx, Cy)  
    fp1 = delta2()  
    func = set_parameter(Cx - dx, Cy)  
    fp1 = (fp1 - delta2()) / 2 / dx  
  
    func = set_parameter(Cx, Cy + dx)  
    fp2 = delta2()  
    func = set_parameter(Cx, Cy - dx)  
    fp2 = (fp2 - delta2()) / 2 / dx
```



```

deltafp2 = fp1 * fp1 + fp2 * fp2

df = nowdelta2
For j = 1 To 5
    func = set_parameter(Cx - df * fp1 / deltafp2, Cy - df * fp2 / deltafp2)
    If delta2() < nowdelta2 Then
        Cx = f_Cx
        Cy = f_Cy
        RR = f_RR
        nowdelta2 = delta2()
        j = 10000
    Else
        df = df / 3
    End If

Next
If j < 1000 Then Exit For
Next i

If RR ^ 2 - Cy ^ 2 > 0 Then
    R_0 = Cx + Sqr(RR ^ 2 - Cy ^ 2)
    R_inf = Cx - Sqr(RR ^ 2 - Cy ^ 2)
Else
    R_0 = Cx + RR
    R_inf = Cx - RR
End If
alpha = 2 / pi * Arccos(Abs(Cy / RR))

For i = 1 To fnum
    data_luv(i) = Log(Sqr(((data_R_cole(i) - R_inf) ^ 2 + data_X_cole(i) ^ 2) /
((data_R_cole(i) - R_0) ^ 2 + data_X_cole(i) ^ 2)))
Next

Dim N As Long
Dim A As Double
Dim b As Double
Dim sum_xy As Double
Dim sum_x As Double
Dim sum_y As Double
Dim sum_x2 As Double
Dim sum_y2 As Double
N = 0
sum_xy = 0
sum_x = 0
sum_y = 0
sum_x2 = 0
sum_y2 = 0
For i = fnum_cole_start To fnum_cole_end
    N = N + 1
    sum_xy = sum_xy + data_lf(i) * data_luv(i)

```

```

sum_x = sum_x + data_lf(i)
sum_y = sum_y + data_luv(i)
sum_x2 = sum_x2 + data_lf(i) ^ 2
sum_y2 = sum_y2 + data_luv(i) ^ 2
Next
A = (N * sum_xy - sum_x * sum_y) / (N * sum_x2 - sum_x ^ 2)
b = (sum_x2 * sum_y - sum_xy * sum_x) / (N * sum_x2 - sum_x ^ 2)
R2 = (sum_xy - sum_x * sum_y / N) ^ 2 / (sum_x2 - sum_x ^ 2 / N) / (sum_y2 -
sum_y ^ 2 / N)
fc = Exp(Abs(b / A))
End Function

```

2.2. Hanaiの式

Hanai の式は濃厚懸濁液の複素誘電率を求める公式である。血液に対しても適用可能で¹⁰、楕円体に対する式を使用することで異方性を考慮することもできる。

球に対する Hanai の式は

$$\frac{\epsilon_b^* - \epsilon_c^* \left(\frac{\epsilon_b^*}{\epsilon_s^*} \right)^{-\frac{1}{3}}}{\epsilon_s^* - \epsilon_c^*} = 1 - H \quad (2.3)$$

である。 H はヘマトクリット。各変数は表 2.2 にまとめた。

表 2.2 Geometric and Electric parameters

全血の複素誘電率	ϵ_b^*
赤血球の複素誘電率	$\epsilon_c^* = \epsilon_m^* \frac{2(1-\nu)\epsilon_m^* + (1+2\nu)\epsilon_{cp}^*}{(2+\nu)\epsilon_m^* + (1-\nu)\epsilon_{cp}^*}, \quad \nu = \left(\frac{r}{r+d} \right)^3$
赤血球膜の複素誘電率	$\epsilon_m^* = \epsilon_m - j \frac{\kappa_m}{\omega \epsilon_0}$
赤血球膜のキャパシタンス	$C_m = 6000 \mu F / m^2$
赤血球膜の比誘電率	$\epsilon_m = C_m d / \epsilon_0 = 3.4$
赤血球膜の導電率	$\kappa_m = 0$
赤血球内部の複素誘電率	$\epsilon_{cp}^* = \epsilon_{cp} - j \frac{\kappa_{cp}}{\omega \epsilon_0}$
赤血球内部の比誘電率	$\epsilon_m = 60$
赤血球内部の導電率	$\kappa_m = 1.0 S / m$
血漿の複素誘電率	$\epsilon_s^* = \epsilon_s - j \frac{\kappa_s}{\omega \epsilon_0}$
血漿の比誘電率	$\epsilon_m = 74$
血漿の導電率	$\kappa_m = 1.7 S / m$

真空の誘電率	$\varepsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12} F/m$
ヘマトクリット	H
赤血球の等価半径	$r = \frac{1}{2} \sqrt[3]{D_x \times D_y \times D_z} = 2.5 \mu m$
赤血球の各軸の直径	$D_x = 2 \mu m, \quad D_y = 8 \mu m, \quad D_z = 8 \mu m$
赤血球膜の厚さ	$d = 5 nm$

楕円体に対する Hanai の式

楕円体に対する Hanai の式は

$$\left(\frac{\varepsilon_b^*}{\varepsilon_s^*} \right)^{-C_1} \left(\frac{\varepsilon_b^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_s^* - \varepsilon_m^*} \right)^{C_2} \left(\frac{\varepsilon_b^* + A' \varepsilon_m^*}{\varepsilon_s^* + A' \varepsilon_m^*} \right)^{-(1+A')C_3} \left(\frac{\varepsilon_b^* + B' \varepsilon_m^*}{\varepsilon_s^* + B' \varepsilon_m^*} \right)^{-(1+B')C_4} = 1 - H \quad (2.4)$$

となる。ここで、各変数は次のように計算される。

$$\left. \begin{aligned} C_1 &= \frac{L_x L_y L_z}{AB} \\ C_2 &= 1 \\ C_3 &= \frac{1}{A-B} \left(\frac{L_x L_y L_z}{A} - A^2 + L_x(A-L_y) + L_y(A-L_z) + L_z(A-L_x) \right) \\ C_4 &= \frac{1}{B-A} \left(\frac{L_x L_y L_z}{B} - B^2 + L_x(B-L_y) + L_y(B-L_z) + L_z(B-L_x) \right) \end{aligned} \right\} \quad (2.5)$$

$$A' = \frac{A}{1-A}, \quad B' = \frac{B}{1-B} \quad (2.6)$$

$$\left. \begin{aligned} b &= \frac{L_x(1-\alpha_x) + L_y(1-\alpha_y) + L_z(1-\alpha_z)}{2} \\ c &= \alpha_x L_y L_z + \alpha_y L_z L_x + \alpha_z L_x L_y \end{aligned} \right\} \quad (2.7)$$

$$A, B = b \pm \sqrt{b^2 - c} \quad (2.8)$$

$$L_k = \frac{D_x D_y D_z}{2} \int_0^\infty \frac{ds}{(D_k^2 + s) D_s} \quad (k=x,y,z) \quad (2.9)$$

$$D_s = \sqrt{(D_x^2 + s)(D_y^2 + s)(D_z^2 + s)} \quad (2.10)$$

$\alpha_x, \alpha_y, \alpha_z$ は赤血球の各軸が電流と同じ方向を向いている割合であり、和が 1 である。例

えば $\alpha_x = \alpha_y = \alpha_z = \frac{1}{3}$ であれば赤血球はランダムに配向している。 $\alpha_x = 1, \alpha_y = \alpha_z = 0$

であれば赤血球は電流に対して垂直に配向し、

$\alpha_x = 0, \alpha_y + \alpha_z = 1$ であれば赤血球は電流に対して垂直に配向しているということになる。

2.3. 緩和周波数と赤血球の関係

2.1 で示したように、血液の周波数特性は赤血球の電気容量によるものである。電気容量は与えられた電圧に対してどれだけ電荷を蓄えることができるのかを表す物理量であるが、これは交流電圧にたいする応答の鈍感さとみることができる。つまり、電気容量が大きいほど低い周波数で誘電緩和を起し、緩和周波数も低くなる傾向がある。この節ではヘマトクリット、赤血球の配向、赤血球の形状と緩和周波数の基本的な関係を示す。

ヘマトクリット

ヘマトクリットが上昇すると電気容量が増加し、緩和周波数は減少する。図 2.2 に静止場でウシ血液のヘマトクリットを変化させて計測したインピーダンスの Cole-Cole プロットを示す。周波数は 10kHz から 5MHz の範囲である。ウシ血液を使用したのは、赤血球の凝集の影響を取り除くためである。

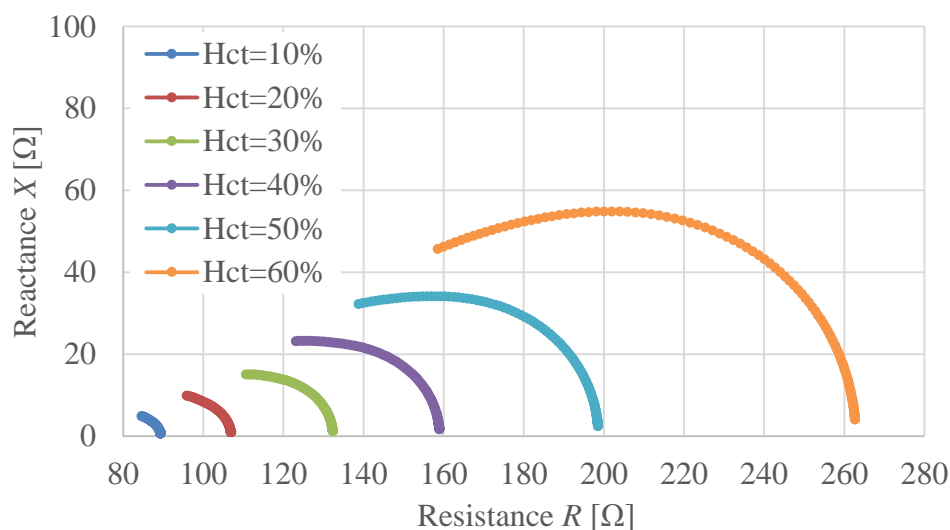


図 2.2 Measurement result of bovine blood at each Hematocrit

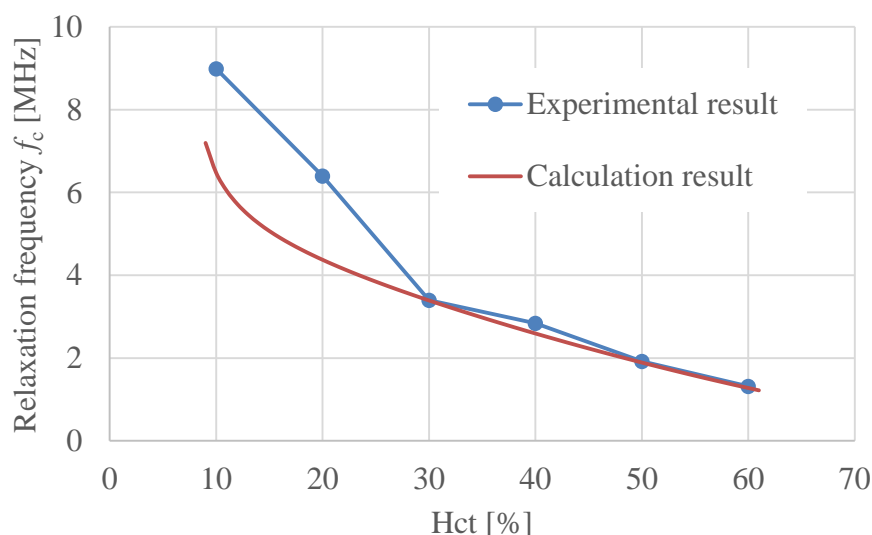


図 2.3 Comparison of experiment and calculation result of relaxation frequency at each hematocrit

図 2.3 に緩和周波数の変化を示す。計算結果は 2.4.2 の楕円体に対する Hanai の式により計算されている。ヘマトクリット 30%以上では結果は一致している。ヘマトクリット 20%以下で結果が合わないのは緩和周波数が 5MHz を超え、インピーダンスの計測範囲から外

れてしまったためである。

配向

赤血球は楕円体であるため、電流に対して赤血球が平行に配向しているか、垂直に配向しているかで緩和周波数は大きく変化する。図 2.4 に赤血球が電流に対して平行、ランダム、垂直に配向している場合を示した。

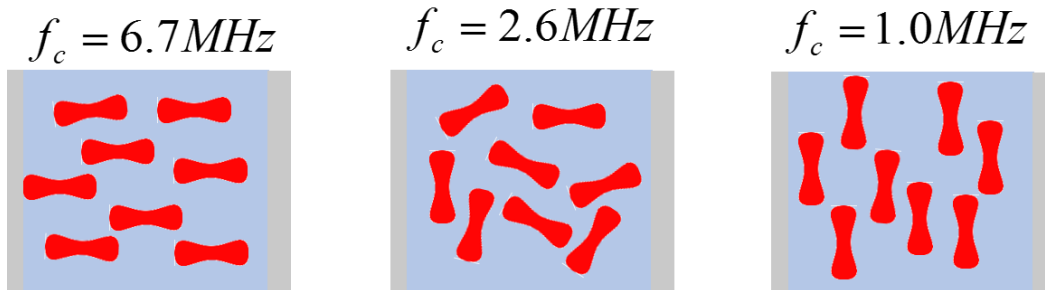


図 2.4 Image of blood orientation

図 2.5 に電流に対して赤血球が垂直な割合 a_x を変化させたときの緩和周波数の Hanai の式による計算結果を示す。赤血球が電流に対して垂直になるほど緩和周波数は低くなる。これは電流に対して赤血球が垂直になるほど電荷をためる面積が増え、電気容量が増加するためである。

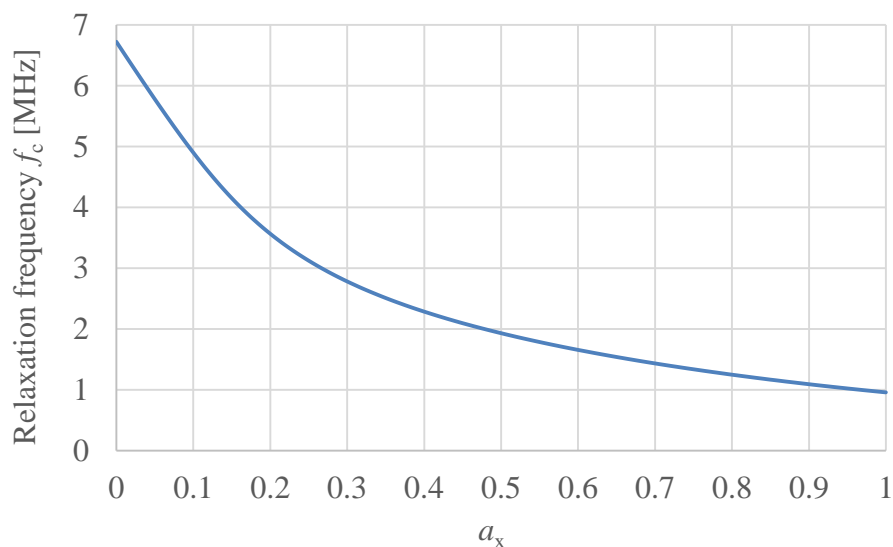


図 2.5 Relationship between relaxation frequency and blood orientation

形状

赤血球の形状によって図 2.6 に示すように緩和周波数は異なる。ここでは $D_y = D_z$ として D_x/D_y の値を変化させた場合を考える。通常は $D_x/D_y = 0.25$ 程度である。 D_x/D_y が 1 より小さければ円盤、1 と等しければ球、1 より大きければ卵のような形状となる。球に近いほど表面積が小さくなり電気容量も小さくなるため、緩和周波数が大きい。球から離れるほど緩和周波数は小さくなる。Hanai の式による計算結果を図 2.7 に示す。この結果は参考文献¹¹のウサギの赤血球の実験結果ともよくあっている。

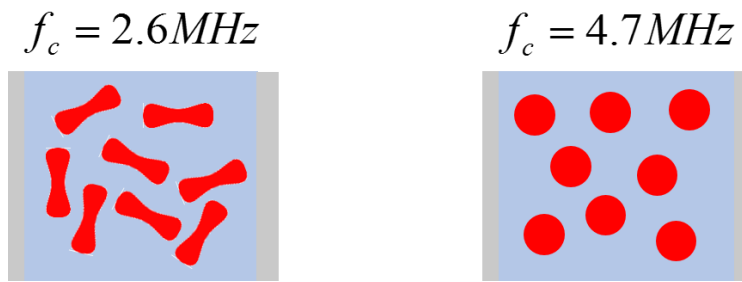


図 2.6 Image of blood geometry

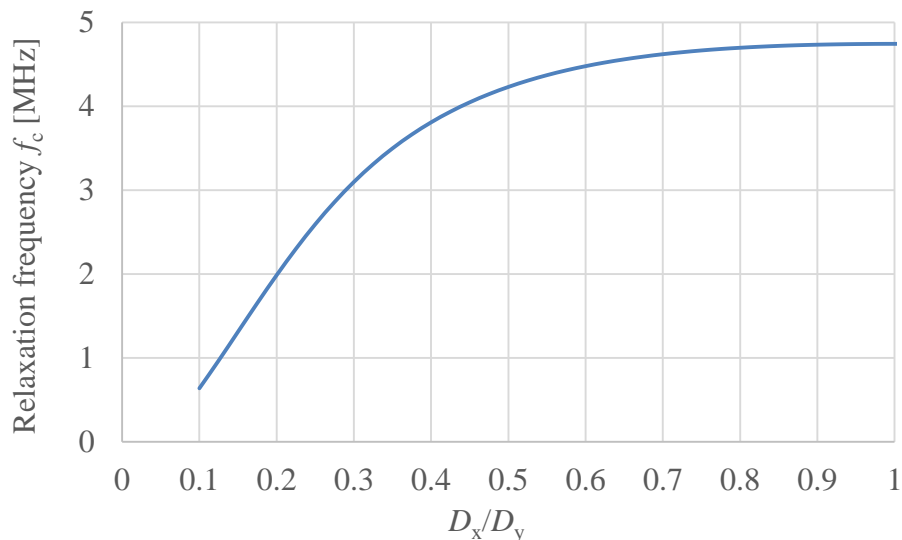


図 2.7 Relationship between relaxation frequency and axial ratio of RBC

3. 血液流量変化の検討

3.1. 実験目的

円管内を流れる血液の流量を変化させながら電気計測を行うことで、赤血球の配向が緩和周波数に与える影響を調べる。

3.2. 実験装置と試料

図 3.1 は実験装置を示す。実験装置は恒温槽(HB-1400; AS ONE Corporation, Japan)、リザーバー(SENKO MEDICAL INSTRUMENT Mfg. Co., Ltd., Japan)、流量計 (VNS-10F, Aichi Tokei Denki Co.,Ltd, Japan) 、ローラーポンプ(RP-PLB; Furue Science K.K., Japan)、Sensor-N,N'(インピーダンスアナライザー用電極)、インピーダンスアナライザー(IM 3570; HIOKI EE. K.K, Japan)、制御用 PC で構成されている。回路長は約 4.5m である。チューブはヘパリンコーティングされており、外径 3/8inch、厚さ 3/32inch である。ポンプ出力 P に対する血液流量 Q の変化を図 3.3 に示す。図 3.2 にインピーダンスアナライザー用電極を示す。インピーダンスアナライザー用電極はステンレス製であり、図に示す通り、外径 11mm、長さ 30mm の円筒状電極、電極間距離 60mm で配置されている。これらの電極とインピーダンスアナライザーは 4 端子プローブ(Four-terminal probe L2000: HIOKI EE. K.K, Japan)により接続されている。インピーダンスアナライザーは測定対象のインピーダンス (大きさ $|Z|$ と位相 θ) を測定した。制御用 PC は測定されたインピーダンスを記録し、Cole-Cole 解析を行った。

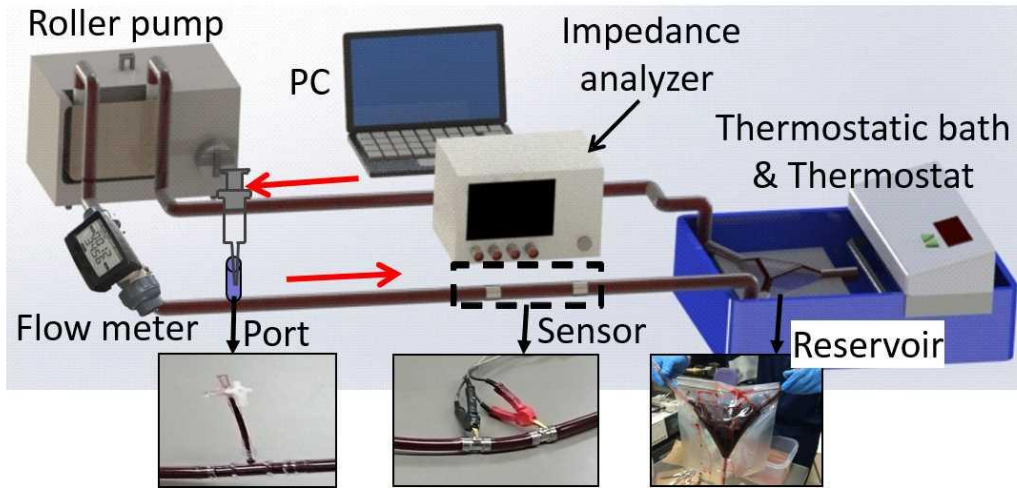


図 3.1 Experimental setup

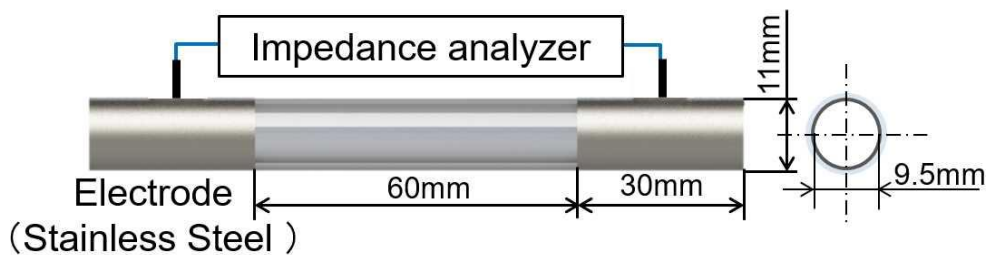


図 3.2 Arrangement and geometry of electrodes used to measure the electrical characteristics by impedance analyzer

実験に使用した血液サンプル

実験にはブタ血液(Shibaura Zouki K.K., Japan)を用いた。ブタ血液1000mLあたり、100mLの3.24%クエン酸ナトリウム水溶液(Tri-Sodium Citrate Solution; Shibaura Zouki K.K., Japan)が添加されており、血液の血漿中に含まれる遊離カルシウムイオンをクエン酸によってキレート化し、自然に凝固しないようになっている。購入した血液は遠心分離器(Micro Hematocrit Centrifuge Model 3220, KUBOTA Corporation, Japan)を用いて、12000rpmで5min遠心分離し、ヘマトクリットを測定した。実験に使用したブタ血液のヘマトクリットHctは39%である。

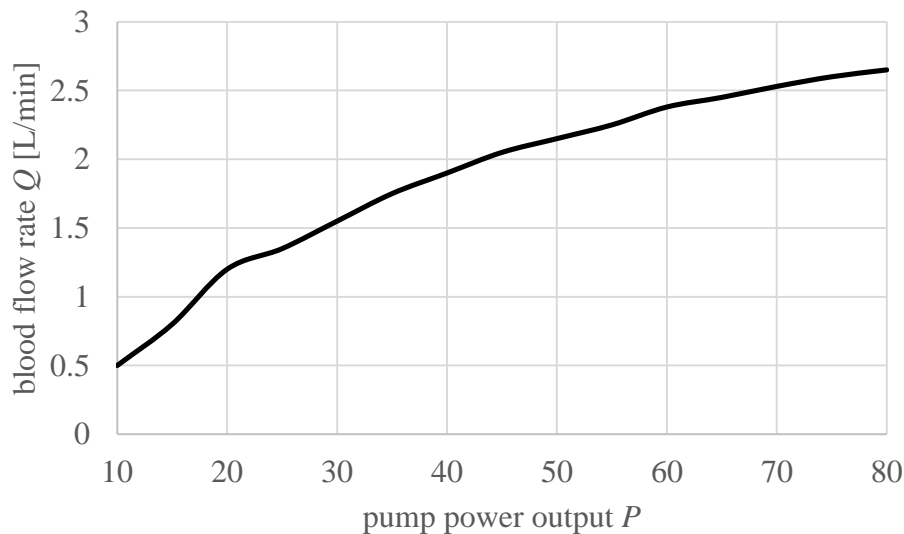


図 3.3 Relationship between pump power output and blood flow rate

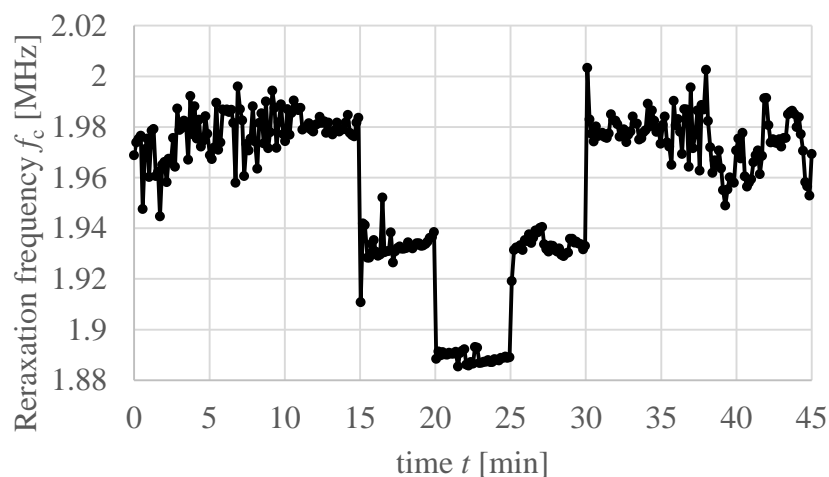
3.3. 実験条件と方法

恒温槽で 37°C に保たれた流路を 900mL のブタ血液で満たし、ポンプ出力 50 で約 10 分血液を循環させ、赤血球の沈降や偏りを取り除いた。その後ポンプ出力を 80 に設定し、電気計測を開始した。ポンプ出力は 80 から 40 まで 10 ずつ減少させ、更にまた 80 まで 10 ずつ増加させた。これは、30 以下のポンプ出力では赤血球の沈降が見られたためである。流量を変化させる度に 5 分間電気計測を行った。

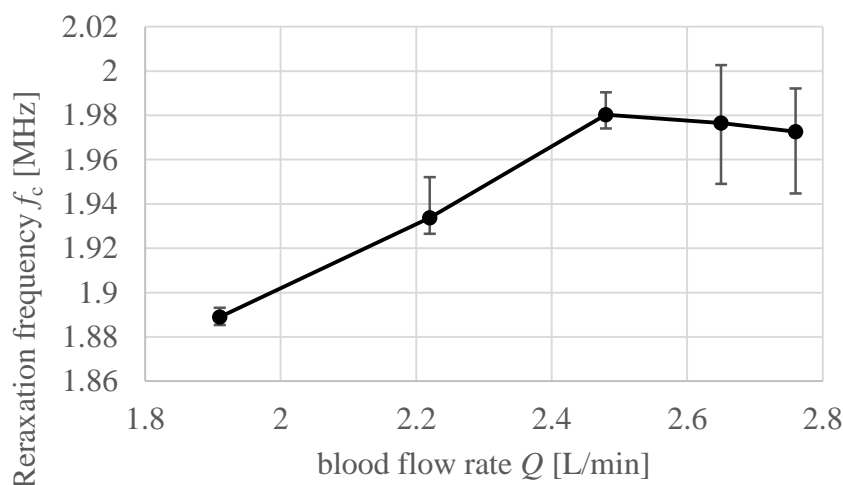
インピーダンス測定前にケーブル長 1m において、OPEN 補正、SHORT 補正を行った。測定周波数は 1kHz から 5MHz の範囲で線形的にとった 201 点であり、印加交流電流は 1.0mA である。測定 SPEED は MEDIUM であり、AVERAGE は 1 とした。

3.4. 実験結果と考察

実験結果を図 3.4-6 に示す。図 3.4(b) に示された点は平均値、範囲は最大値と最小値である。流量 2.5L/min 以下では計測が安定しているが、2.5L/min 以上では安定していない。これはポンプの振動による影響だと考えられる。血液流量の増加により赤血球が配向し、導電率が増加することが知られている¹²。そこで、緩和周波数の変化について、赤血球の配向の影響が大きいと考えて考察を行う。



(a)



(b)

図 3.4 Experimental result of relaxation frequency

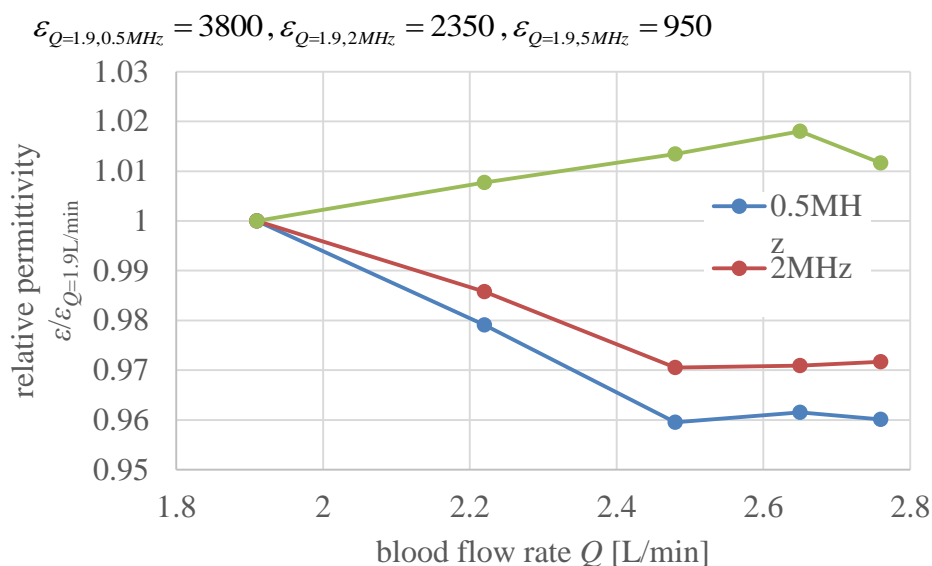


図 3.5 Experimental result of permittivity

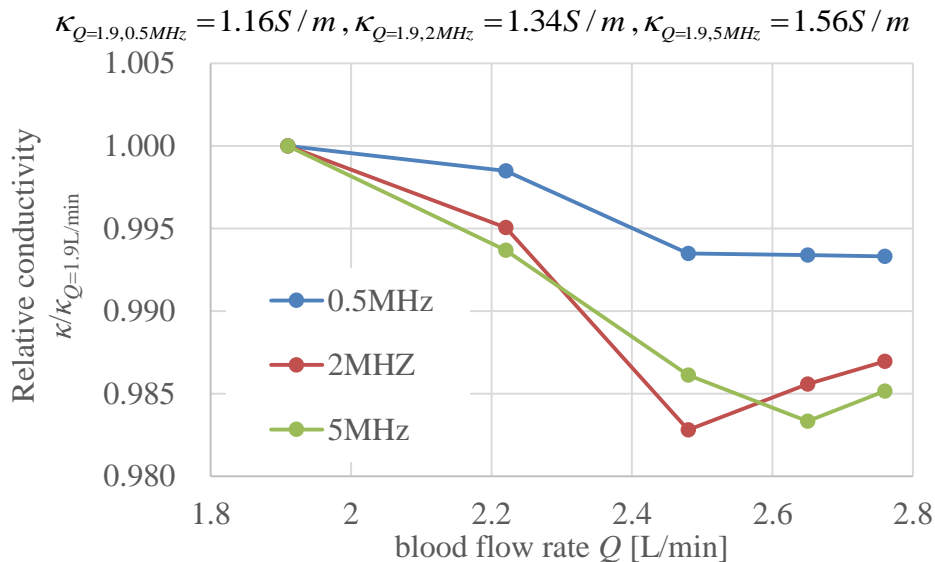


図 3.6 Experimental result of conductivity

2.5L/min 以下の流量で、流量の増加に伴って緩和周波数が増加した。これは赤血球の配向による影響が強く、流量が増加すると電流に平行な赤血球の量が増えるためだと考えられる。また、流量の増加とともに導電率が減少することも赤血球の配向によるものである。流量を時間的に増加させた場合も、減少させた場合も流量に対する緩和周波数は同じである。この実験結果に対して、せん断応力と赤血球の配向の関係を仮定してシミュレーションを行った。

血液がポアズイユ流れに従うと仮定すると、最大速度 v_{\max} は

$$v_{\max} = 2 \frac{Q}{A} \quad (3.1)$$

である。ここでチューブの断面積 $A = \frac{\pi d^2}{4}$ 、 d は管内径 9.5mm である。

v_{\max} から、せん断応力は

$$\tau(r) = v_{\max} \frac{8\eta}{d^2} r \quad (3.2)$$

である。ここで r は半径、 η は粘性係数であり $4\text{mPa} \cdot \text{s}$ とする。赤血球が電流に垂直な割合 a_x を

$$a_x(r) = \frac{2}{3} \frac{f(r)}{1+f(r)} \quad (3.3)$$

と仮定した。ここで f は

$$f(r) = \begin{cases} 1 & (\tau(r) < \tau_1) \\ \frac{\tau(r) - \tau_2}{\tau_1 - \tau_2} & (\tau_1 \leq \tau(r) \leq \tau_2) \\ 0 & (\tau_2 < \tau(r)) \end{cases} \quad (3.4)$$

とし、 $\tau_1=0.03\text{Pa}$ 、 $\tau_2=0.4\text{Pa}$ とした。以上の仮定から Hanai の式により緩和周波数を求めた結果を図 3.7 に示す。流量が増加すると緩和周波数も増加するという傾向は実験結果と合い、配向の影響が見られたが、絶対値が大きく異なるため、流動場では配向以外にも考慮すべき現象があると考えられる。

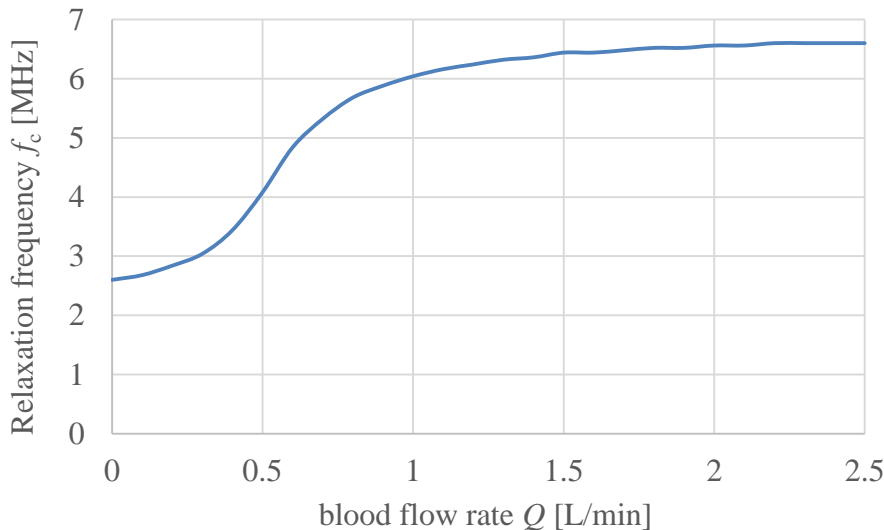


図 3.7 Calculation result of relationship between blood flow rate and relaxation frequency

4. 流動中の血栓形成過程の計測

4.1. 実験目的

流動中の血液にカルシウムイオンを添加して血栓形成を促し、電気計測を行うことで、血栓形成に伴う血液の変化を調べる。実験は2度行った。以下では二度の実験を実験 A、実験 B として扱う。

4.2. 実験装置と試料

実験装置は 3.2 で使用したものと同様である。使用した血液も同様にブタ血液だが、実験 A では $\text{Hct}=42\%$ 、実験 B では $\text{Hct}=44\%$ である。凝固剤として 0.02M 塩化カルシウム液 (SYSMEX CORPORATION, Japan) を使用した。全血の ACT の計測には Sonoclot (IMI CO.,LTD, Japan) を、血漿中の Fbg の計測には CA-101 (SYSMEX CORPORATION, Japan) を使用した。

4.3. 実験条件と方法

恒温槽で 37°C に保たれた流路を実験 A では 900mL、実験 B では 800mL のブタ血液で満たし、ポンプ出力 50 で約 10 分血液を循環させ、赤血球の沈降や偏りを取り除いた。一度目の CaCl₂ 溶液の添加直後に計測を開始した。CaCl₂ 溶液を添加した時間と量を表 4.1 に示す。インピーダンスのほかに、流量 Q 、Hct、ACT、Fbg を計測した。実験 A を行った時点では機材がなかったため、流量と Fbg は計測していない。ACT (Activated Clotting Time: 活性化全血凝固時間) は異物 (本実験ではガラス粒) が全血に接触してからの外因系による凝固時間のことであり、血液の固まりやすさを表している。基本的には ACT の値だけ計測に時間がかかる。例えば ACT が 200 の場合は計測に 200 秒程度の時間を要する。通常、生体内の血液の ACT は 200 以下であるため、本実験では 300 を上回った時点で十分に大きいとして計測を打ち切っている。採血した全血で直ちに測ることができるため、実験中はこの値をもとに血液の状態を知り、CaCl₂ 溶液の添加量や実験の終了時間などを決めた。購入した血液には抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムが添加されているため、ACT は非常に大きく計測できない。Fbg (Fibrinogen: フィブリノゲン) はフィブリノゲンの単位体積当たりの量であり、単位は mg/dL である。計測は遠心分離機で血漿と血球を分離し、血漿成分のみを取り出して行われる。フィブリノゲンは血栓の材料であり、フィブリノゲンが減少するということは血栓形成が進んでいることを示す。またフィブリノゲンがなくなった場合には凝固は起きないので、ACT は無限大となる。

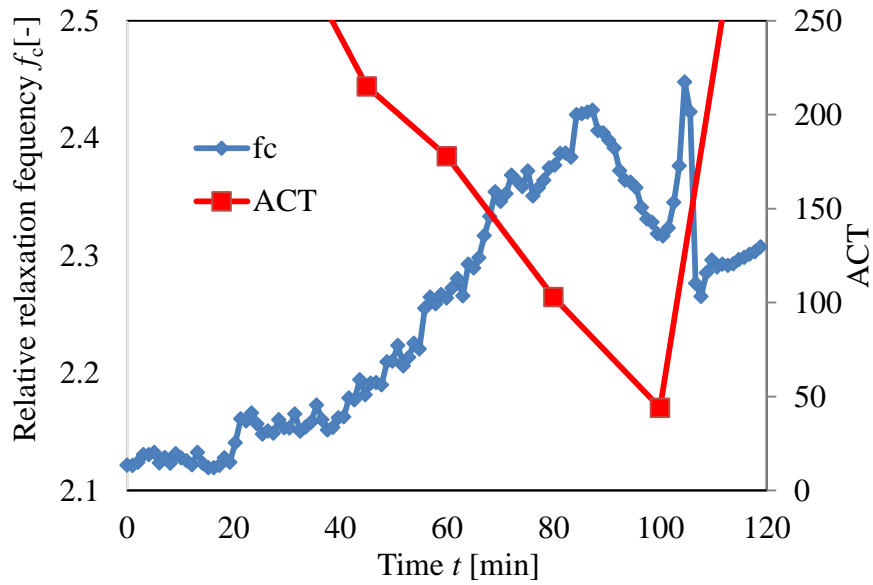
インピーダンス測定前にケーブル長 1m において、OPEN 補正、SHORT 補正を行った。測定周波数は 1kHz から 5MHz の範囲で線形的にとった 201 点であり、印加交流電流は実験 A では 1.0mA、実験 B では 0.1mA である。測定 SPEED は MEDIUM であり、AVERAGE は 1 とした。

表 4.1 Time and amount that CaCl₂ solution is administered

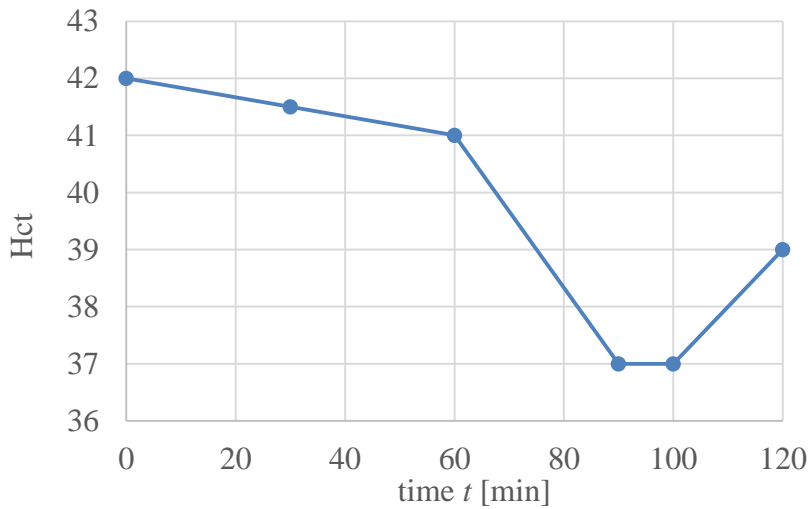
Experiment A	Time t [min]	0	20	40	55	70	85
	CaCl ₂ [mL]	70	10	10	10	10	10
Experiment B	Time t [min]	0	30				
	CaCl ₂ [mL]	70	10				

4.4. 実験結果と考察

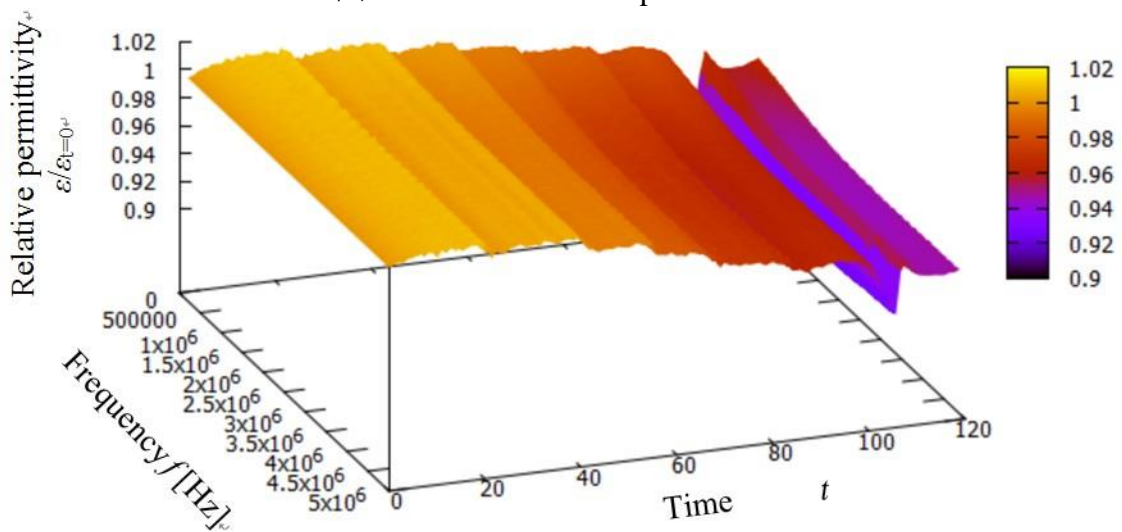
実験 A の結果を図 4.1-4 に、実験 B の結果を図 4.5-10 に示す。ACT の値からおおよそ実験 A では 80~100min の間で、実験 B では 50~70min の間で血栓形成が生じていると考えられる。図 4.1, 図 4.5 から、流動中の血栓形成過程においても静止場と同様に、緩和周波数はピークを持つことが分かった。また緩和周波数のピークは血栓形成が起きたと考えられる時間と一致するため、これらの間に深い関係があると考えられる。したがって、緩和周波数の変化と血液の状態の変化の関係を赤血球に着目して考察する。



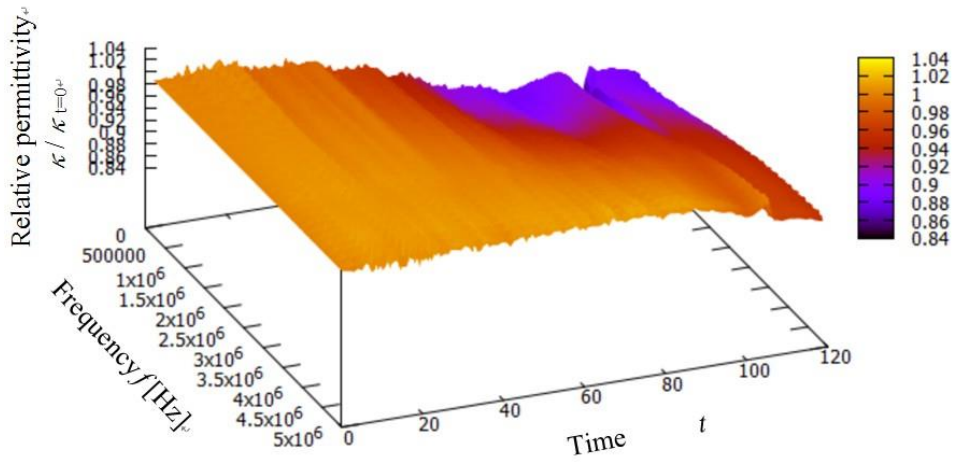
☒ 4.1 Relaxation frequency of experiment A



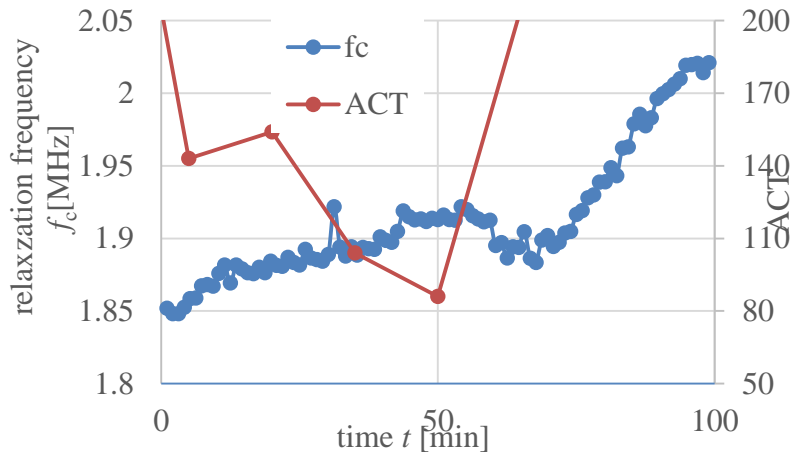
☒ 4.2 Hematocrit of experiment A



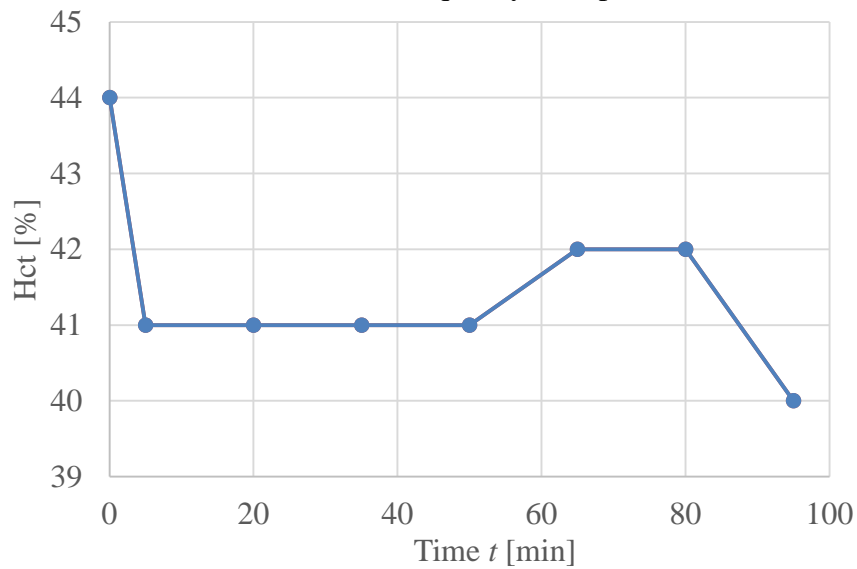
☒ 4.3 Relative permittivity of experiment A



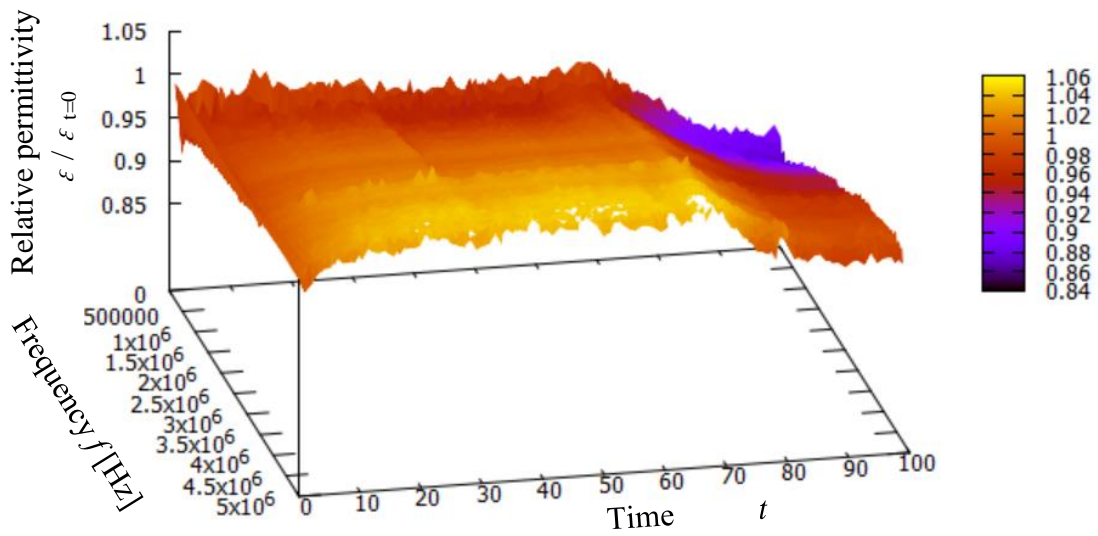
☒ 4.4 Relative conductivity of experiment A



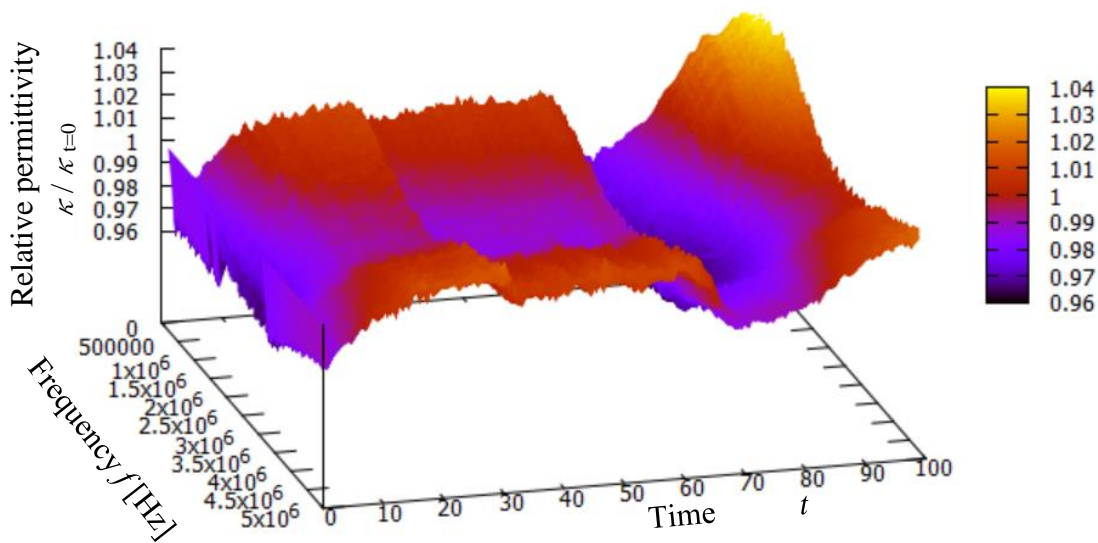
☒ 4.5 Relaxation frequency of experiment B



☒ 4.6 Hematocrit of experiment B



⊗ 4.7 Relative permittivity of experiment B



⊗ 4.8 Relative conductivity of experiment B

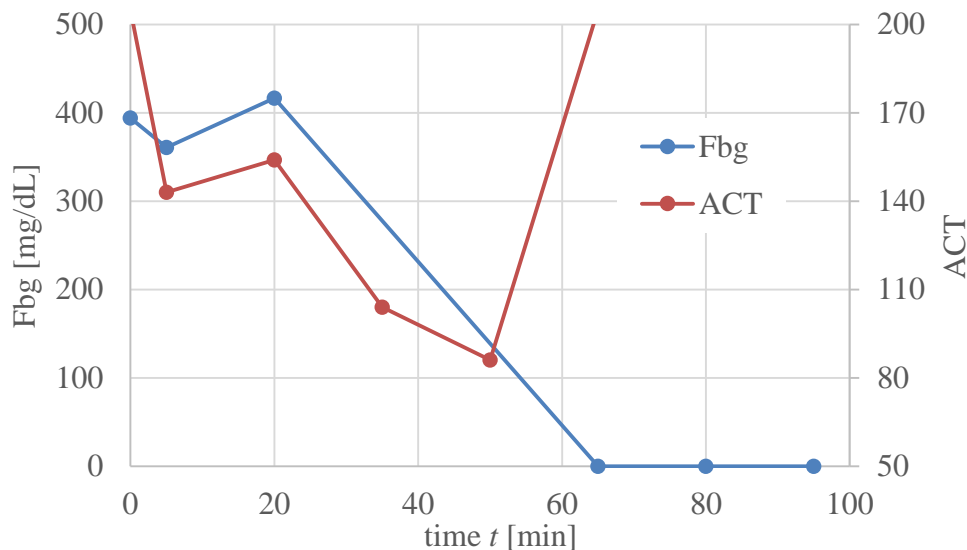


図 4.9 Fbg and ACT of experiment B

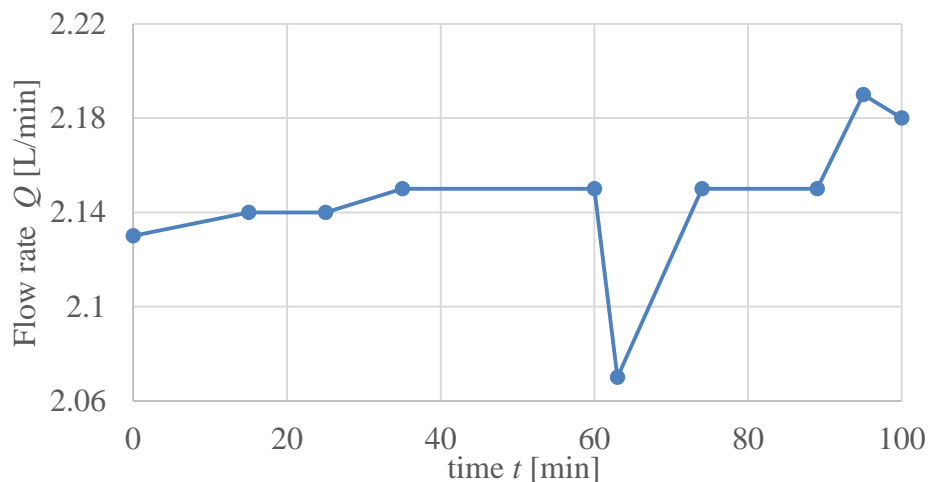


図 4.10 Blood flow rate of experiment B

赤血球の凝集能の影響を考える。赤血球は通常、円盤のように薄い形をしているが、凝集によりルローを形成すると、図 4.11 に示すように球や卵型、または棒のような形になると考えられる。ルローの形成はせん断速度にも強く影響され、壁面付近のせん断速度が高い領域では形成されない。このような凝集は赤血球の形状が円盤から離れるように働く。図 4.12 の R_x/R_y をより広範囲まで計算した結果を図 4.12 に示す。 R_x/R_y が 1 より大きくなり棒に近い形状になっても緩和周波数は 4MHz より低くはならない。したがって、円盤状の赤血球よりも凝集した赤血球は緩和周波数が高くなる。

赤血球の凝集は血漿中の高分子であるとされており、血漿成分を高分子のない溶液と置き換えると、ルローを形成しない。血液の凝固の過程で血栓が形成される直前に、高分子であるフィブリノゲンがフィブリンモノマーへと変化する。この過程が緩和周波数に大きく影響していると考えられる。おそらく、ACT が下がる血栓形成の直前で、赤血球の凝集能は増加する。そのため凝集した血液の量が増え、赤血球の形状が円盤から離れたために緩和周波数が増加したと考えられる。次第に血栓形成が進みフィブリノゲンがなくなると、凝集能が下がり今度は緩和周波数が下がったのではないかと考えられる。以上のことから、緩和周波数は赤血球の凝集能の変化を主に反映し、血栓形成過程においてピークを持ったと考えられる。



図 4.11 Image of the Rouleau formation

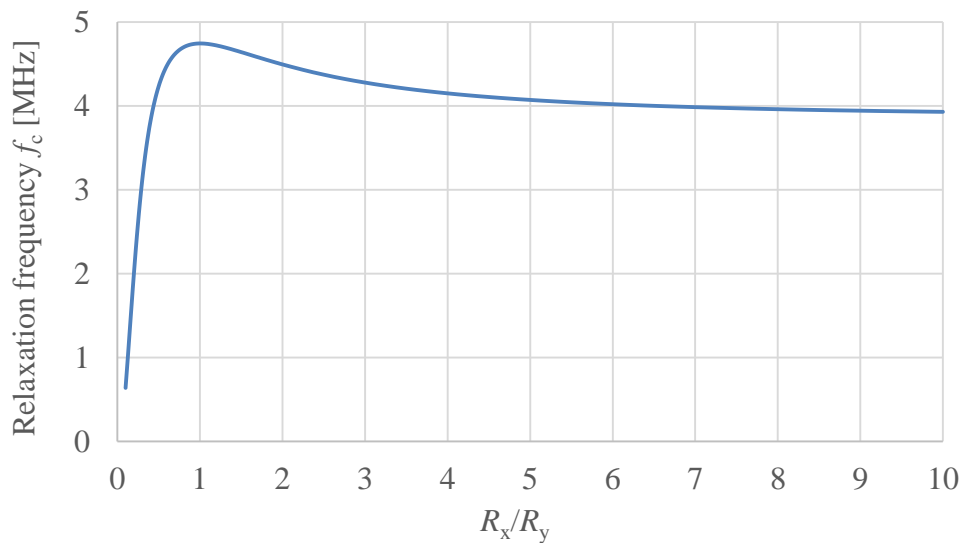


図 4.12 Relationship between relaxation frequency and axial ratio

5. 結言

本研究では、血栓形成をオンラインで予測・検出できるモニタリングシステムの実現にむけて、Cole-Cole 解析を用いて、流動血液中での血栓形成過程の実験を行った。また、血液流量の変化を電気計測し、赤血球の状態が緩和周波数に及ぼす影響を検討した以下のことが明らかとなった。

- (5) 血液流量が増加するにつれて、緩和周波数が増加することが分かった。また、血液流量 2.5L/min 以下で緩和周波数が安定して計測できることが分かった。
- (6) 血液流量の増加による緩和周波数の増加は赤血球の配向によるものであることが分かった。
- (7) 流動血液中での血栓形成過程を Cole-Cole 解析することで、緩和周波数に特徴的なピークが現れることが分かった。
- (8) 血栓形成過程において、血栓形成前の緩和周波数の増加は赤血球の凝集によるものであり、血栓形成後の緩和周波数の減少は赤血球の凝集能の低下によるものである可能性が高いことが分かった。

以上より、誘電緩和法および Cole-Cole 解析を用いた実験結果から、緩和周波数から赤血球の状態を推測することによる流動中での血栓検出の可能性を示すことができた。

参考文献

- [1]. Oshima S, Sankai Y. Development of optical sensing system for non-invasive and dynamic monitoring of thrombogenic process, *ASAIO Journal*, 2010; 56(5): 460-467.
- [2]. Oshima S, Sankai Y. Evaluation of optical propagation in blood for noninvasive detection of prethrombus blood condition, *ASAIO Journal*, 2009; 55(6): 550-555.
- [3]. D. Sakota, T. Murashige, R. Kosaka, M. Nishida, O. Maruyama, Feasibility of the optical imaging of thrombus formation in a rotary blood pump by near-infrared light, *Artificial Organs*, 38 (9) (2014) 733–740.
- [4]. Huang C, Tsui P, Wang S, Chiu C. Detecting the process of blood coagulation and clot formation with high frequency ultrasound, *Journal of Medical and Biological Engineering*, 2005; 25(4): 171-177.
- [5]. Sato, K., Hanzawa, K., Okamoto, T., Kyo, S., Hayashi, J. Frequency Analysis of High-Intensity Transient Signals of Transcranial Doppler Ultrasound in Patients Supported With a Left Ventricular Assist Device, *Journal of Artificial Organs*, 2008; 11(4): 201-203.
- [6]. Hoetink EA, Feas CJ, Visser RK, Heethaar MR. On the flow dependency of the electrical conductivity of blood, *IEEE transactions on Biomedical Engineering*, 2004; 51(7): 1251-1261, 2004
- [7]. T.-X. Zhao, B. Jacobson, Quantitative correlations among fibrinogen concentration, sedimentation rate and electrical impedance of blood, *Medical and Biological Engineering and Computing*, 35 (3) (1997) 181–185.
- [8]. G. Pop, W. Hop, L. Moraru, M. van der Jagt, J. Quak, D. Dekkers, Z. Chang, F. Gijzen, D. Duncker, C. Slager, Blood electrical impedance closely matches whole blood viscosity as parameter of hemorheology and inflammation, *Applied Rheology*, 13 (6) (2003) 305–312.
- [9]. Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ. Time course of electrical impedance during red blood cell aggregation in a glass tube: comparison with light transmittance, *IEEE Transactions on biomedical engineering*, 2010; 57(4): 969-978.
- [10]. Hayashi, Y., Katsumoto, Y., Omori, S., Yasuda, A., Asami, K., Kaibara, M., & Uchimura, I. (2010). Dielectric coagulometry: a new approach to estimate venous thrombosis risk. *Analytical chemistry*, 82(23), 9769-9774.
- [11]. Hayashi, Y., Oshige, I., Katsumoto, Y., Omori, S., Yasuda, A., & Asami, K. (2008). Dielectric inspection of erythrocyte morphology. *Physics in medicine and biology*, 53(10), 2553.
- [12]. Hoetink, A. E., Faes, T. J., Visser, K. R., & Heethaar, R. M. (2004). On the flow dependency of the electrical conductivity of blood. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 51(7), 1251-1261.