

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：52501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750143

研究課題名(和文)電気信号法を用いた血栓形成の早期検出方法の確立

研究課題名(英文)Early detection of thrombosis formation using electrical signal analysis of blood

研究代表者

SAPKOTA ACHYUT (SAPKOTA, ACHYUT)

木更津工業高等専門学校・その他部局等・助教

研究者番号：70724706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：体外循環装置(補助人工心臓、人工透析装置および人工心肺装置など)では、血栓形成が問題となっている。それを未然に防ぐため、定期的に抗凝固処置を行う必要がある。しかしながら、この処置を行うことにより出血や血小板減少症などの副作用が発症する。そこで、血栓性をリアルタイムで調べ、必要なときだけ抗凝固処置を行う方法が望まれる。本研究では、血液の電気的特性を計測することによってリアルタイムの計測で、血栓を早期段階で検出する方法を確立した。本研究の成果により、血液体外循環装置を利用する患者の自宅から病室および手術室まで様々な医療現場で抗凝固処置を最適に行うことが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The real-time detection of blood coagulation is important in various extra-corporeal circulation devices like hemodialyzer, heart-lung-machine and ventricular assistance devices. In this study, we developed a coagulation detection system based on measurement of electrical properties of blood under thrombosis formation. An electrical parameter called characteristic frequency of blood was useful in the coagulation monitoring. This finding was verified by comparing the results against conventional analysis method like activated clotting time (ACT) readings. Further analysis of the measurement readings, showed that the remarkable change in the electrical characteristic frequency of blood coincided with the conversion of the soluble Fibrinogen to Fibrin monomers. This effect, along with other biophysical changes during blood coagulation on the electrical properties of blood, was also analyzed by computational methods in addition to experimental methods.

研究分野：生体医工学

キーワード：血液凝固 体外循環 人工臓器

### 1. 研究開始当初の背景

小型化した補助人工心臓の開発および薬事承認により、重症心不全患者は、体内に補助人工心臓を装着することによって退院し、日常生活を送ることが可能となっている。しかしながら、その装着された補助人工心臓における血栓の形成が大きな問題の一つである。この問題の対策として、定期的に抗凝固薬を投与しているが、その副作用として出血などのリスクが高まる。このようなリスクは、補助人工心臓を使用する患者だけではなく、人工透析(血液透析)や人工心肺を用いたバイパス手術を受ける患者にもある。これらの治療方法は、血栓形成を防止するために幾つかの指標(トロンボエラストグラフィ(TEG)や活性化凝固時間(ACT)のオフライン計測など)を用いてオフラインで血栓性を調べているに過ぎない。そのため、最適な投与量および投与のタイミングを判断するのが非常に困難である。そこで、リアルタイムで血栓形成を把握し、最適な抗凝固処置を行うためのオンライン計測法が重要となるが、未だそのような方法は存在しない。

### 2. 研究の目的

本研究課題ではオンラインで血液をモニタリングし、電気信号法を用いた方法で、早期に血栓形成を検出する方法を確立することを目的とした。具体的には

- (1) 血栓形成の客フェーズ(凝固因子の活性化によるフェーズ、赤血球の凝集フェーズ)での電気信号の変動の情報をシミュレーションおよび電気化学実験を用いて求める。
- (2) 上記(1)の結果(無血栓の場合の実験も含め)を先験的情報として扱い、リアルタイムの計測と比較し、血栓形成の有無とフェーズを区別できるようにする。

### 3. 研究の方法

研究方法としては主に以下のとおり実験的方法と計算的方法として分けられる。

#### (1) 実験的方法:

電気インピーダンス・スペクトルスコピー法(EIS法)(複数の周波数の電流による計測方法)を用いて実験を行なった。低周波数の電流は血漿のみに流れ、計測結果は血漿と赤血球の体積分率の割合に大きく依存する。高周波数の電流は赤血球の膜と内部にも流れるので、計測結果には赤血球の膜の構築と血漿成分の影響も大きくなる。したがって、低周波数帯と高周波数帯の複数の周波数での計測結果を解析すると、電気信号の変動は体積分率だけによるものか血漿成分と赤血球の膜の構築にもよるものかを区別できる。

本研究の実験に用いる血液はウシおよびブタ血液で、東京芝浦臓器株式会社より購入した。購入した血液にはクエン酸ナトリウム水溶液が添加されており、自然に凝固しない。血栓形成を促進させるためには塩化カ

ルシウム水溶液またはトロンピンを添加した。静止状態の血液の電気化学実験には電極ホルダ(幅20mm、長さ20mm、高さ20mm)、インピーダンスアナライザ(IM3570; HIOKI EE. K.K, Japan)、制御用PCで構成した実験装置を用いた(図1)。また、流動状態の実験のためには体外模擬流路を用いた。体外模擬流路は恒温槽、リザーバー、ローラーポンプで構成した(図2)。恒温槽の温度は37°Cで設定されており、リザーバー内の血液温度を一定に保っている。ローラーポンプは流量を0.26L/minから2.80L/minまで制御可能であった。

血液の血栓状況を調べるためには活性化凝固時間(ACT)およびフィブリノーゲン濃度を計測した。

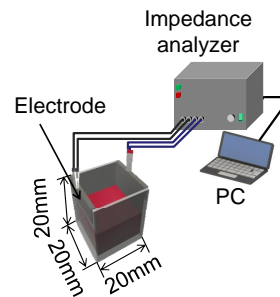


図1 静止状態実験装置

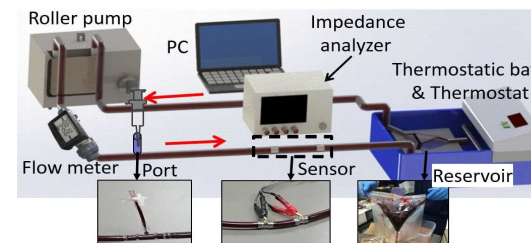


図2 流動状態実験装置

#### (2) 計算的方法:

複数の周波数の電流による計測されたインピーダンス値を高周波数特性外挿法(Cole-Cole法)を用いて解析し、電気的パラメータとして特性周波数、周波数ゼロの時の抵抗値、周波数無限大の時の抵抗値、形状係数の4つのパラメータを求めた。

実験結果の評価には混層流体の電気的モデル(Hanaiの式)を使用した。この式を使って、血漿中の凝固因子の化学変化により血漿の電気特性が変化する状況と赤血球が凝集して電気特性が変化する状況の、二つの状況のときの電気信号の変動を計算した。流動場では赤血球はせん断力によって配向するとことから赤血球の配向を配慮した電気化学シミュレーションを行った。

#### 4. 研究成果

(1) 複数の周波数の電流により血液の電気特性を計測し、血栓の体積と血栓の密度が血液の電気インピーダンス（抵抗率と比誘電率）に及ぼす影響を解析して、以下のことが明らかとなった。

血栓体積および血栓の密度が増加すると血液の比誘電率が線形的に増加する（図3）。

特定の周波数帯において線形性に強い相関がある（図4）。

抵抗率に関してはどの周波数帯においても線形性に相関がない（図5）。

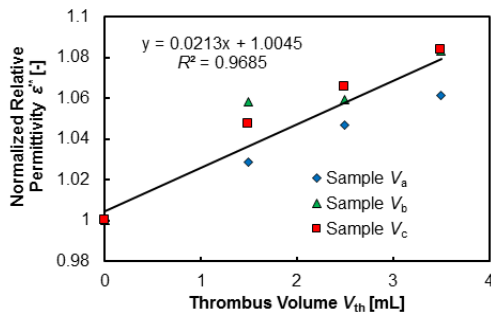


図3 血栓の体積と誘電率の関係

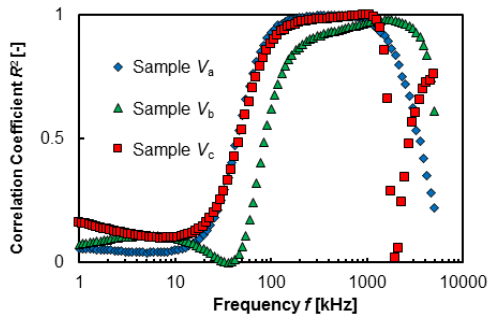


図4 血栓体積と誘電率の関係の周波数依存性

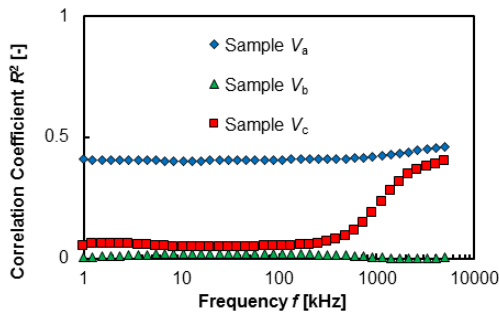


図5 血栓体積と低効率の関係の周波数依存性

これらの結果から、100kHz から 1MHz の周波数帯で赤血球の特性を表していることがわかる。したがって、この周波数帯での電気インピーダンスを計測（特に誘電率を計測）することによって、血栓を正確に検出できる

ことが明らかとなった。

(2) 上述の周波数帯の計測で凝固因子の変動により変化は確認できないため、5MHz 周波数帯までの実験データを用いて高周波数特性外挿法(Cole-Cole 法)による解析を行い「特性周波数」、「周波数ゼロの時の抵抗値」、「周波数無限大の時の抵抗値」、「形状係数」の4つのパラメータを求めた結果、以下のことが明らかとなった。

血栓形成過程において、「特性周波数」は時間的に増加し、ピークが現れ、その後減少した（図6）。しかしながら、無血栓状態では「特性周波数」は減少しつづけ、ピークが現れなかった（図7）。

「周波数ゼロの時の抵抗値」、「周波数無限大の時の抵抗値」、「形状係数」に関しては、血栓形成過程において特徴的な変化がない。

流動状態でも同様の結果が得られた（図8）。

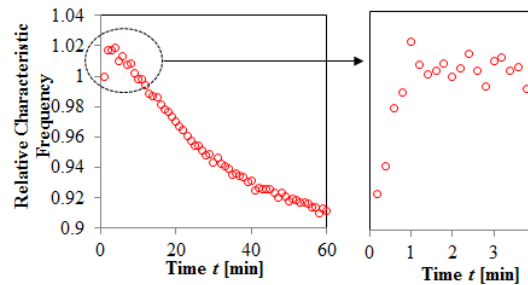


図6 静止状態で血栓形成時の特性周波数の時間的変化

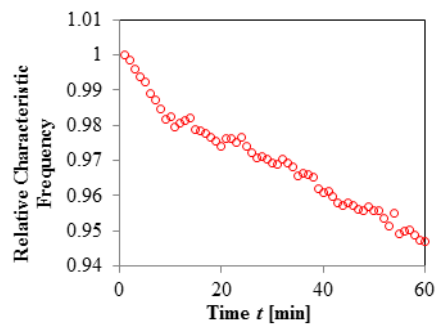


図7 静止状態で無血栓の場合の特性周波数の時間的変化

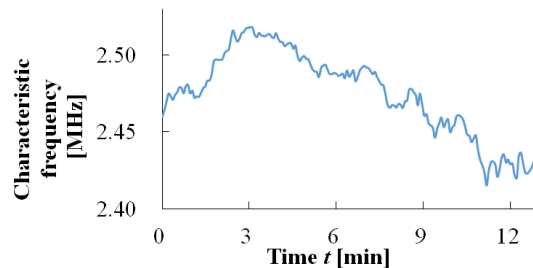


図8 流動状態で血栓形成時の特性周波数の時間的変化

これらの結果から「特性周波数」は血栓検出に最も適切なパラメータであることが明らかとなった。混層流体の電気的モデル(Hanaiの式)を使用して評価を行った結果、図9に示すように血液は最初、塩化カルシウムの添加により血漿成分が変化して特性周波数が増加し、続く血栓の形成により特性周波数が減少することがわかった。また、ピークが現れた時間で血栓の材料となるフィブリノーゲンが急激に減少していることも確認できた。当時の活性化凝固時間(ACT)も血栓を形成すると思われる値であったためピーク時間は血栓を形成する時間であることが明らかとなった。したがって、「特性周波数」が増加する段階は「凝固因子の活性化によるフェーズ」で、ピークの後減少する段階は「赤血球の凝集フェーズ」であると考えられる。

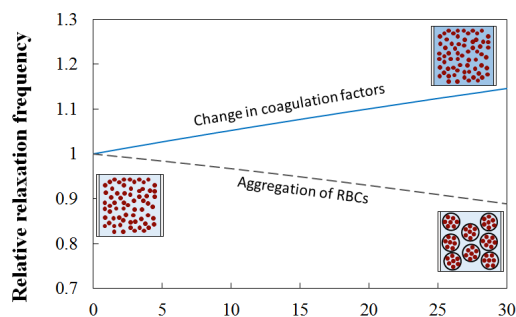


図9 混層流体の電気的モデル(Hanaiの式)を使用した評価

これらの成果から血液の状況をリアルタイムで観測し、血液体外循環装置を利用する患者の自宅から病室および手術室まで様々な医療現場で抗凝固処置を最適に行うことが可能であると考えられる。したがって、将来的には、患者(対象者)の命を守るだけでなく、患者の生活の質(QOL)の向上および医療費削減にも結びつくことが予想される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

- (1) D. N. Huu, D. Kikuchi, O. Maruyama, A. Sapkota, M. Takei, Cole-Cole analysis of thrombus formation in an extracorporeal blood flow circulation using electrical measurement, *Flow Measurement and Instrumentation*, DOI: 10.1016/j.flowmeasinst.2016.06.025(2016) (査読有、掲載決定2016.06.28)
- (2) A. Sapkota, T. Fuse, M. Seki, O. Maruyama, M.

Sugawara and M. Takei, Application of electrical resistance tomography for thrombus visualization in blood, *Flow Measurement and Instrumentation*, Vol. 46, pp. 334-340 (2015年12月) (査読有)

- (3) Y. Asakura, A. Sapkota, O. Maruyama, R. Kosaka, T. Yamane and M. Takei, Relative permittivity measurement during thrombus formation process by using dielectric relaxation method in various hematocrit values, *Journal of Artificial Organs*, Vol. 18, pp. 346-353 (2015年12月) (査読有)
- (4) T. Fuse, A. Sapkota, O. Maruyama, R. Kosaka, T. Yamane and M. Takei, Analysis of the influence of volume and red blood cell concentration of a thrombus on the permittivity of blood, *Journal of Biorheology*, Vol. 29, pp. 15-18 (2015年9月) (査読有)
- (5) 朝倉悠太, サブコタ・アチュタ, 丸山修, 小阪亮, 山根隆志, 武居昌宏, 誘電緩和法によるヘマトクリットをパラメータとした赤血球の特性周波数と血栓形成過程の計測, *日本機械学会論文集*, Vol. 80, No. 816, pp. BMS0245.1-13 (2014年8月) (査読有)
- (6) A. Sapkota, T. Fuse, O. Maruyama and M. Takei, プロセス・トモグラフィ法による血液循環流路内の血栓検出の可能性, *流れ: 特集テーマ: 年次大会* (2), pp. 6.1-6.4 (2014年12月) (査読無)

[学会発表](計12件)

- (1) A. Sapkota, D. N. Huu, O. Maruyama and M. Takei, Blood coagulation detection by analyzing multifrequency impedance data, *Proc. Annual International Conference of the IEEE International Conference on Biomedical and Health Informatics*, Las Vegas, USA (2016年2月24日) (査読有)
- (2) D. N. Huu, 大輔 菊地, A. Sapkota, 丸山

- 修, 山根 隆志, 武居 昌宏, 「電気計測を用いた体外循環装置における血栓のモニタリング」, 第 53 回日本人工臓器学会大会, 東京都文京区東京ドームホテル (2015 年 11 月 19 日) (査読無)
- (3) D. N. Huu, 大輔 菊地, A. Sapkota, 丸山修, 武居 昌宏, 「体外循環流路における血液の誘電特性による血栓検出」, 第 63 回レオロジー討論会, 神戸市神戸大学工学部 (2015 年 9 月 24 日) (査読無)
- (4) D. N. Huu, A. Sapkota, T. Fuse, M. Seki, O. Maruyama and M. Takei, Cole-Cole analysis of thrombosis visualization method using electrical impedance tomography, *Proc. 7th International Symposium on Process Tomography*, Dresden, Germany, (2015 年 9 月 2 日) (査読有)
- (5) A. Sapkota, D. N. Huu, O. Maruyama and M. Takei, Online detection of thrombosis in blood by capacitance measurement, *Proc. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Milan, Italy (2015 年 9 月 28 日) (査読有)
- (6) D. N. Huu, A. Sapkota, 丸山 修, 武居昌宏, 「体外循環装置における血栓形成の検出～電気計測と ACT の比較検討」, 第 38 回バイオレオロジー学会年会, 東京都千代田区国立情報学研究所学術総合センター (2015 年 6 月 7 日) (査読無)
- (7) A. Sapkota, T. Fuse and M. Takei, Electrical properties of blood and their applicability in thrombosis sensing, *Proc. 15th International Congress of Biorheology and 8th International Conference on Clinical Hemorheology*, Seoul, Korea (2015 年 5 月 26 日) (査読無)
- (8) 布施拓, 関雅俊, A. Sapkota, 丸山修, 山根隆志, 「血栓体積および血栓ヘマトクリットによる比誘電率の変化」, 第 27 回バイオエンジニアリング講演会, 新潟市朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (2015 年 1 月 9 日) (査読無)
- (9) D. N. Huu, 布施拓, A. Sapkota, 武居昌宏, 丸山修, 山根隆志, 「電気計測による血栓形成過程の Cole-Cole 解析」, 第 62 回レオロジー討論会, 福井市交流プラザ (2014 年 10 月 16 日) (査読無)
- (10) A. Sapkota, M. Seki, T. Fuse, O. Maruyama and M. Takei, Electrical impedance tomography of blood clots, *Proc. 5th International Workshop on Process Tomography*, Jeju, Korea (2014 年 9 月 17 日) (査読有)
- (11) A. Sapkota, T. Fuse, O. Maruyama, R. Kosaka, T. Yamane and M. Takei, Analysis of electrical properties of thrombogenic blood using electrical impedance spectroscopy, *Proc. 53<sup>rd</sup> Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering*, Sendai International Convention Center, Japan (2014 年 6 月 26 日) (査読無)
- (12) 布施拓, A. Sapkota, 丸山修, 小坂亮山根隆志, 武居昌宏, 「電気計測を用いた血栓の定量的解析」, 第 37 回バイオレオロジー学会年会, 埼玉大宮ソニックシティビル (2014 年 6 月 5 日) (査読無)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

サブコタ アチュタ (SAPKOTA ACHYUT)  
木更津工業高等専門学校・情報工学科・助教  
研究者番号: 70724706

### (2) 研究分担者

( )

該当なし

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

該当なし

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )

該当なし