

レーザー誘起表面波法による血液粘性率センシングに関する研究 —マイクロリットル試料の測定—

Experimental Study of Technique for Blood Viscosity Measurement by Laser-induced Capillary Wave

—Measurement of Micro-liter Sample—

80716737 高橋 直広(Naohiro Takahashi) Supervisor: 長坂雄次(Yuji Nagasaka)

1. 緒論

血液は熱・物質輸送を通して生体内環境の恒常性の維持に大きく関わっており、血液の流動性の悪化は生理的変動を引き起こす原因となりえる。血液の流動性を決める因子はHt(赤血球体積分率)以外にも赤血球変形能や、赤血球凝集、血漿粘性率など多様で複雑な機構を持つが、粘性率の測定によって総合的に評価できると考えられる。血液粘性率(blood viscosity)の上昇によって引き起こされる循環障害は、さまざまな疾患の原因となることが多く、各種疾患と相関をもつという報告もある[1]。

このように、血液粘性率は生体の疾患の度合いや健康状態を示す指標となりえることから、その正確な測定が望まれている。血液粘性率の測定には主に以下の条件が求められる。

(1) 生体への負担軽減のためにサンプルが微量

(2) 血液が凝固作用を有することから短時間で測定可能

これまで血液粘性率の測定には、細管法や回転法といった従来の測定法が広く利用されてきたが、上記の測定要求を満たすことは困難である。そこで本研究では、 μl オーダーの微量かつ μs オーダーの短時間で粘性率を測定可能なレーザー誘起表面波法を新たな血液粘性率測定法として確立することを目的とし、血液からの信号波形の評価や非ニュートン性の問題に関して実験的な検討を行った。

2. 測定原理

液体試料の表面で加熱用レーザーを瞬間的に等しい強度で2光束干渉させると試料表面で干渉縞が形成される。試料のエネルギー吸収によって、この干渉縞パターンに応じた温度分布が表面近傍に形成され、熱膨張および圧力分布が生じ波長 μm オーダー、振幅 nm オーダーの表面波が熱的に誘起される。

表面波発生後、表面波が過渡的な回折格子の役割を果たすため、観察用レーザーを表面波へ入射することで得られる反射型の回折光を用いて減衰挙動を検知している。反射型1次回折光の強度 I_1 が(1)式のように表面波の振幅 u_z の2乗に比例することを利用し、1次回折光強度の時間変化を信号として検知することで表面波の挙動が測定できる。

一方で、表面波の理論的な振幅挙動は(2)式のようにさまざまなパラメータの関数となり、得られた信号とカーブフィッティングによる解析を行い、粘性率を算出する[2]。また本測定法では表面張力の同時測定も可能である。

レーザー誘起表面波法ではその原理上、微量サンプル(μl オーダー)の血液粘性率を短時間(μs オーダー)に測定する可能性をもっている。

$$I_1(t) \propto u_z^2(t) \quad (1)$$

$$u_z = f\left(\eta, \sigma, \frac{d\sigma}{dT}, \Lambda, \alpha, t, \dots\right) \quad (2)$$

η : 粘性率[Pa·s], σ : 表面張力[N/m], T : 温度[K],

Λ : 干渉縞間隔[m], α : 吸収係数[m⁻¹], t : 時間[s]

3. 測定装置

本研究で用いている測定装置をFig. 1に示す。加熱用レーザーには波長1064 nm, パルス幅6 ns, 可変出力1~200 mJであるパルスYAGレーザーを用いている。波長1064 nmの近赤外領域では水に対する吸収が小さく、水を主成分とする血液において小さな温度上昇下での測定が可能である。加熱用レーザーはビームスプリッター、およびミラーによって試料表面で干渉させる。観察用レーザーには波長658 nm, 出力130 mWのLDを用いている。LDは血液に対して吸収が小さいものの、連続発振であるため時間的な面から血液の温度上昇を招き諸問題の原因と考えられていた。そこで本研究ではビームシャッターにより強度ではなく時間的に温度上昇を抑制するシステムを構築した。加熱用YAGレーザーとビームシャッターはファンクションジェネレータにて同期をとっており、表面波発生を中心に10 msだけ照射するよう電圧制御を行っている。LDは散乱光を多く含むためレンズおよびピンホールから構成されるスペイシャルフィルタによって散乱光を除去し、ビームシャッターを通りミラーによって表面波発生部分へ照射される。このとき発生する1次回折光は光電子増倍管で検知され、デジタルオシロスコープを通してPCへ取り込まれる。

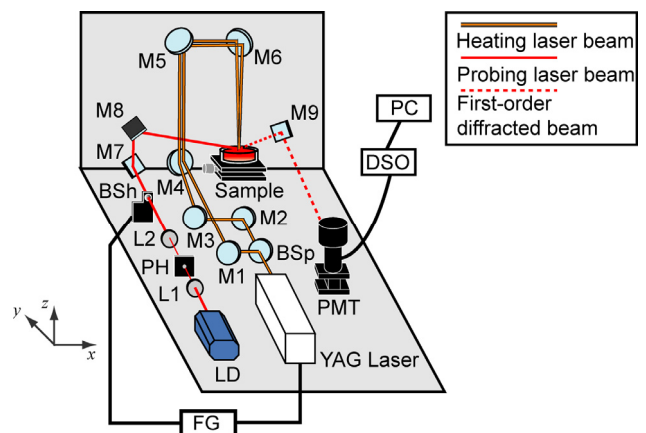


Fig. 1 Experimental apparatus.

4. マイクロリットル試料での測定

これまで本研究では、原理的な確認のため血液サンプルには 10 ml 程度の量を用いてきた。臨床応用を考えた場合には採血量が生体への大きな負担となるため、サンプル量は少ないほど望ましい。しかし、本測定法においてサンプル量を少なくした場合、試料表面を水平に保てず信号検知が行えないことや、理論通りの挙動を示す深さを保障しなければならないなどの問題が生じる。そこで本研究では、実験的検討を踏まえてこれらの問題を解決するサンプルセルを設計し、270 μ l および 90 μ l という微量のサンプルからの信号検知を可能とし、大幅なサンプル量の低減を達成した。Table 1 に示す結果より、90 μ l においてもこれまでと同様の測定が行えているといえる。

5. 血液粘性率の個人差の測定

異なる 2 人の健常者から採血した血液サンプルの測定を行った。測定はセルに注入後 10 s 以内には終了し、サンプル量 270 μ l, 35.9 \pm 0.1 $^{\circ}$ Cで行い、サンプルには血液凝固阻止剤を注入している。得られた信号波形を 1 つ目のピークで正規化したグラフを Fig. 2 に示す。また、それぞれのヘマトクリット(Ht)値および解析値を Table 2 に示す。Fig. 2 の信号波形では donor 1 の方が 2 つ目のピークが低く減衰時定数が小さい、つまり粘性の高いことが確認できる。これは donor 1 の方が Ht 値が高値を示していることと一致する。さらに解析値を比較すると donor 1 の方が粘性率において、およそ 7.2%高い値を示しており、有意な差が測定できていると考えられる。一方、表面張力では J. Rosina らの報告[3]($\sigma=53.1$ mN/m)とほぼ一致するものの、2 人の健常者の間には有意な差は確認されなかった。

このような個人の粘性率の差が検知できたことは、本研究の臨床応用への可能性を示唆する結果であると考えられる。

6. セン断速度変化に対応する実験条件での検討

血液は非ニュートン性を示し、せん断速度の減少に対して粘性は増大する。本測定法において、せん断速度を減少させることは加熱用レーザーの強度を低下させることに相当する。そこで、加熱用レーザーの強度を 122 mJ, 61 mJ と変化させて測定した血液の信号波形を Fig. 3(a)に、また粘性率のみを様々に変化した血液の理論波形を(b)に示す。理論波形は信号波形において 1 番目のピークが $t=0$ となるよう記述される。加熱強度が 122 mJ と 61 mJ では S/N は低下するものの信号の概形が変化し、明らかな粘性の増加を捉えることができた。これは血液のもつ非ニュートン性と一致する傾向である。

せん断速度を低下させた場合、つまり加熱光強度を低下させた場合でもより高い S/N で検知できるよう改善すれば、同一サンプルから 1 点につき 100 μ s 程度でせん断速度-粘性率曲線が記述できる可能性がある。今回はその第一歩として半定量的な信号波形変化を検知することに成功した。

Table 1 Obtained values under different sample volume.

Sample Volume	Viscosity [mPa·s]	Surface tension [mN/m]
30 ml	4.14	49.0
90 μ l	4.26	49.4

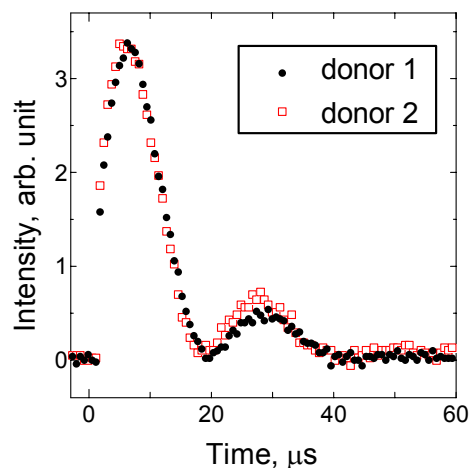


Fig. 2 Detected signals of blood samples for two individuals at 36.0 \pm 0.2 $^{\circ}$ C with 270 μ l sample volume.

Table 2 Viscosity and surface tension of two individuals.

	Hematocrit [%]	Viscosity [mPa·s]	Surface tension [mN/m]
donor 1	50.3	4.63 \pm 0.26	52.1 \pm 2.1
donor 2	46.7	4.32 \pm 0.59	51.4 \pm 1.3

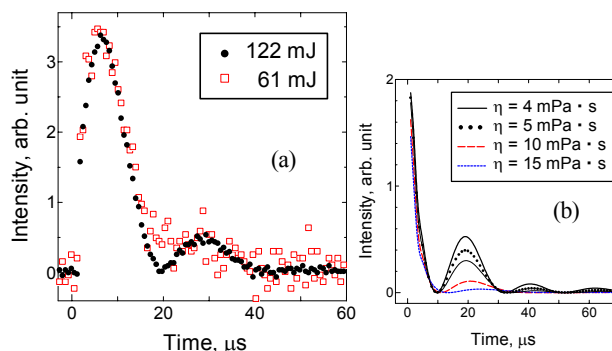


Fig. 3 (a) Detected signals on dependence of hearing laser power. (b) Theoretical curves for different viscosities.

7. 結論

- ◆ サンプルセルによるサンプル量の大きな低減に成功し、マイクロリットルオーダーの微量な血液においても測定が可能となった。
- ◆ 本測定装置を用いて異なる健常者から採血した血液サンプルにおいて、Ht 値の違いに伴う粘性率の違いを検知することに成功した。
- ◆ 同一サンプルのせん断速度変化に対応する測定を行い半定量的な波形変化の検知に成功した。
- ◆ 今回の検討により本研究の臨床応用への可能性を示した。

参考文献

- [1] L. Dintenfass, "Blood Microrheology", Butterworth & Co. Ltd., (1971).
- [2] Iwashima H., Yabui K., and Nagasaka Y., , *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series B*, **73**-733(2007), pp.1892-1898.
- [3] J. Rosina et al., *Physiol. Res.*, **56**-1(2007), S93-S98.