

芝浦工業大学

博士学位論文

赤血球凝集能測定を用いた血液検査法の開発

Development of clinical blood tests using measurement of erythrocyte aggregation

芝浦工業大学大学院

理工学研究科 機能制御システム専攻

樋口 誠

指導教員 渡邊 宣夫 教授

## 要約

血液中には、生体組織への酸素輸送、血管損傷時の止血、炎症や免疫反応等を担う様々な細胞および血漿タンパクが存在する。従って、それらの情報を得る血液検査は、疾患の診断や治療において非常に重要である。赤血球は低せん断速度環境下において、血漿中の炎症性タンパクかつ血液凝固因子であるフィブリノゲンや、免疫グロブリン等との相互作用により、可逆的に集合し凝集する性質（赤血球凝集能）を有する。本研究では、この赤血球凝集能を測定する技術を応用して、炎症、止血および輸血の3つの分野における血液検査手法の開発を試みた。

赤血球沈降速度（Erythrocyte sedimentation rate: ESR）は、フィブリノゲンや免疫グロブリン等の炎症性タンパクの増加に伴って凝集が進んだ赤血球の沈降速度が増加することを利用した臨床検査であり、感染症から自己免疫疾患等、様々な炎症性疾患のスクリーニングに利用されてきた。ESRの参照法であるWestergren法では、1 mL以上を必要とする血液量の多さと、測定に1時間を要することが課題であった。しかし近年では光学的に短時間で簡便に赤血球凝集を測定する技術（Syllectometry）を用いることにより、赤血球凝集を測定した血液の透過光波形であるsyllectogramの解析パラメータ（凝集パラメータ）を用いて1分以下の測光時間でESRを推定する手法が広まってきている。しかしながら、凝集パラメータは、ヘマトクリットおよび測定時間の影響を受けることが報告されており、syllectometryにて推定したESRはWestergren法の値と乖離することが問題となっている。また、これまでESRの原理として、粒子の沈降速度が粒子径の二乗に比例するStokesの沈降速度式がよく用いられてきたが、syllectometryにて得た凝集パラメータと沈降速度との関係性は明確に示されていなかった。そこで本研究では、ESRを迅速かつ正確に計算する手法の開発を第一の目的とし、凝集パラメータに対するsyllectogram測定時間の影響およびヘマトクリットの影響を、フィブリノゲン濃度とヘマトクリットを複数条件にて調整したボランティア検体を用いて詳細に調査し、ESR計算に最適なsyllectogram測定時間の選定と凝集パラメータに対するヘマトクリット補正式の作製を試みた。その結果から、凝集パラメータの一つであるAggregation index (AI) は、測定時間5秒において、フィブリノゲン濃度によらずヘマトクリットの影響を補正することが可能であることを明らかにした。さらに、ヘマトクリットの影響を排除して求めた単一赤血球の沈降速度は、ヘマトクリット補正したAIの累乗関数とよく一致することを見出した。この結果と沈降速度式を元に計算したESRは、Westergren法のESR値とよく一致した。続いて、開発したESR測定手法に対して、203検体の臨床検体データを用いて妥当性検証を行い、Westergren法と優れた相関性を示すことを実証した。さらに、本手法に平均赤血球容積（Mean corpuscular volume: MCV）の補正を加えることにより、測定精度を向上させることに成功した。本手法はわずか5秒の測光時間と80  $\mu$ Lの血液でESR測定が可能であり、かつ臨床検査においてESRと同時に検査されることが多い全血算（Complete blood count: CBC）の測定装置に搭載可能であるため、臨床ワークフローにおける検査工数と検体量の削減に貢献が期待できる。

炎症性タンパクであるフィブリノゲンの増加は赤血球凝集とESRを著しく亢進させるが、一方でフィブリノゲンは血液凝固因子でもあり、出血時にフィブリンへと転換され強固な止血を行う重要な血漿タンパクである。従って、出血時におけるフィブリノゲン濃度の低下の検出は止血治療において重要となる。従来は検査室にて血液を遠心分離し、凝固試薬を用いてフィブリノゲン濃度を測定していたため、検査結果が判明するまでに時間を要し、止血・輸血治療の判断を早期

に行うことができないという課題があった。そこで、第二の目的として、重度外傷等で危機的な凝固障害を引き起こす要因となるフィブリノゲン低下を、*sylectometry* を用いて検出可能であるか基礎検討を行った。フィブリノゲン健常ボランティアの血液から得た血清と血漿を混合して作製した正常値から低濃度域のフィブリノゲン血液サンプルにおける凝集パラメータを調査した。その結果、赤血球凝集パラメータは低濃度域においてもフィブリノゲン濃度依存的に変化することが確認され、凝固障害となるフィブリノゲン濃度 150 mg/dL 以下の状態を検出することが可能であることが示唆された。血漿分離と試薬による凝固が不要である本手法であれば、短時間かつ低コストにフィブリノゲン濃度低下の確認が可能になり、重度外傷、危機的産科出血、心臓血管外科等における止血治療の一助となり得る。

重度外傷および凝固障害の治療においては、濃厚赤血球やフィブリノゲンを含んでいる新鮮凍結血漿等の輸血が行われるが、輸血の前には基本的に血液型判定を行う必要がある。しかし、従来の血液型判定においては、血漿タンパクとの相互作用による非特異的な赤血球凝集 (*aggregation*) と、血液型由来の抗原抗体反応による赤血球凝集 (*agglutination*) の混同を避けるため、血球の遠心分離、洗浄、十分な抗体試薬量が必要であり、検査の手間と時間がかかるものであった。そこで第三の目的として、*sylectometry* を用いた前処理不要かつ試薬量削減可能な血液型判定手法の開発を行った。その結果、20名の ABO 血液型由来の *aggregation* と *agglutination* を、従来の 1/5~1/20 の抗体試薬混合率で区別し、血液型を判別することに成功した。本手法は従来必要であった血液の希釈や洗浄等の前処理が不要で、かつ非常に少ない抗体試薬量で ABO 血液型を判定することが可能である。

多数の検査項目を処理する必要がある現代の検査室において、装置の測定時間と、血漿または血球を遠心分離する前処理の工数がかかることは、治療判断の遅れ、患者の待機時間に繋がる。また、検査試薬やカートリッジ等の消耗品は、医療費負担を増加させる。赤血球凝集能測定を利用して開発した3つの血液検査手法である、ESRの迅速かつ正確な測定、迅速かつ簡便な低濃度フィブリノゲンの検出、前処理不要かつ試薬量削減可能な血液型判定は、検査時間の短縮化、前処理の簡略化、試薬・消耗品の削減に寄与し、臨床のワークフローの改善と医療経済性の向上を期待できるものである。

## 目次

要約.....	i
目次.....	iii
<b>第1章 序論</b> .....	- 1 -
1-1. 血液の概要 .....	- 1 -
1-2. 赤血球 .....	- 2 -
1-3. 血漿タンパク .....	- 3 -
1-4. 流路内における流れ.....	- 4 -
1-5. 赤血球の凝集 .....	- 6 -
1-6. 血液の光学的特性.....	- 9 -
1-7. 赤血球凝集能の測定手法.....	- 10 -
1-7-1. 赤血球沈降速度 .....	- 10 -
1-7-2. レオスコープ法 .....	- 10 -
1-7-3. Sylllectometry.....	- 11 -
1-7-4. その他の測定手法 .....	- 14 -
1-8. 血液検査における一般的課題.....	- 15 -
1-9. 臨床検査における赤血球凝集能測定 of 課題.....	- 15 -
1-10. 本論文の目的および概要.....	- 15 -
<b>第2章 ヘマトクリット補正した凝集パラメータを用いた迅速赤血球沈降速度測定法の開発</b> - 17 -	
2-1. 序論 .....	- 17 -
2-1-1. 赤血球沈降曲線 .....	- 17 -
2-1-2. 赤血球沈降速度の迅速測定と諸問題 .....	- 21 -
2-1-3. 本章の目的および概要 .....	- 21 -
2-2. 実験方法 .....	- 23 -
2-2-1. 沈降曲線式 .....	- 23 -
2-2-2. 測定試料の作製 .....	- 25 -
2-2-3. Westergren 法による沈降曲線の測定と沈降パラメータの決定.....	- 26 -
2-2-4. Sylllectogram 測定装置と凝集パラメータの計算 .....	- 27 -
2-3. 結果および考察.....	- 29 -
2-3-1. 測定時間が沈降速度と Aggregation Index の関係に与える影響および最適な測定時間の決定.....	- 29 -
2-3-2. Aggregation Index に対する Ht の影響とその補正.....	- 31 -
2-3-3. 沈降パラメータとヘマトクリット補正した Aggregation Index の関係と回帰式の作製 .....	-
	33 -

2-3-4. Westergren 法にて得た沈降曲線と計算値の比較.....	37 -
2-4. 結論 .....	40 -
<b>第 3 章 迅速赤血球沈降速度測定法の臨床評価と MCV 補正による 精度向上.....</b>	<b>41 -</b>
3-1. 序論 .....	41 -
3-2. 実験方法 .....	42 -
3-2-1. 臨床検体の取得 .....	42 -
3-2-2. Westergren 法による ESR の測定 .....	42 -
3-2-3. Sylectogram 測定とヘマトクリットおよび MCV の測定 .....	42 -
3-2-4. ESR の計算.....	42 -
3-2-5. MCV を用いた沈降速度補正 .....	42 -
3-2-6. データ解析 .....	43 -
3-3. 結果および考察.....	45 -
3-3-1. 沈降パラメータと AI および HAI の比較 .....	45 -
3-3-2. 臨床検体における ESR 計算値と Westergren 法による ESR 値の比較 .....	47 -
3-4. 結論 .....	53 -
<b>第 4 章 赤血球凝集測定を用いた血液凝固障害の検出のための基礎検討 .....</b>	<b>55 -</b>
4-1. 序論 .....	55 -
4-1-1. 止血機序と凝固検査 .....	55 -
4-1-2. 大量出血時におけるフィブリノゲンの枯渇と凝固障害.....	57 -
4-1-3. フィブリノゲン検査における課題 .....	58 -
4-1-4. 本章における研究の目的 .....	58 -
4-2. 実験方法 .....	59 -
4-2-1. 試料作製.....	59 -
4-2-2. Sylectogram 測定方法 .....	61 -
4-2-3. 顕微鏡下での赤血球凝集の観察 .....	61 -
4-3. 結果および考察.....	61 -
4-3-1. フィブリノゲン濃度と Sylectogram および顕微鏡下における赤血球凝集の関係....	61 -
4-3-2. フィブリノゲン濃度と凝集パラメータの関係.....	63 -
4-3-3. ヘマトクリットおよび血液の個体差による影響.....	63 -
4-3-4. フィブリノゲン濃度の正常範囲と低値における凝集パラメータ間の比較.....	65 -
4-3-5. 測定の再現性 .....	67 -
4-4. 結論 .....	69 -
<b>第 5 章 赤血球凝集測定を用いた血液型判定法の開発 .....</b>	<b>71 -</b>
5-1. 序論 .....	71 -
5-1-1. ABO 血液型と輸血.....	71 -
5-1-2. 血液型判定手法 .....	71 -
5-1-3. 血液型判定手法における課題 .....	73 -
5-1-4. 本章における研究の目的 .....	73 -

5-2. 実験方法 .....	- 74 -
5-2-1. 試料作製 .....	- 74 -
5-2-2. 目視および顕微鏡による Agglutination の観察 .....	- 74 -
5-2-3. Syllectogram の測定 .....	- 75 -
5-3. 結果および考察 .....	- 77 -
5-3-1. Agglutination の観察 .....	- 77 -
5-3-2. 各試薬混合率における syllectogram と凝集パラメータ .....	- 79 -
5-3-3. 各血液型における, 抗 A および抗 B 試薬混合時の凝集パラメータの比較 .....	- 81 -
5-3-4. 測定値の二重測定再現性 .....	- 83 -
5-3-5. Positive と negative 間における AMP および AMP の相対値の比較 .....	- 85 -
5-4. 結論 .....	- 87 -
第 6 章 各章の総括および展望 .....	- 89 -
第 7 章 結論 .....	- 90 -
引用文献一覧 .....	- 91 -
研究業績 .....	- 99 -
謝辞 .....	- 100 -

## 図目次

Fig. 1. 1 Blood Components.....	- 1 -
Fig. 1. 2 Erythrocyte and Structure of Erythrocyte Membrane (7). .....	- 2 -
Fig. 1. 3 The Elements of Plasma Proteins.....	- 3 -
Fig. 1. 4 Schematic Representation of Plasma Proteins Separated by Electrophoresis.....	- 3 -
Fig. 1. 5 Flow and Shear Rate in a Cylindrical Tube.....	- 5 -
Fig. 1. 6 Viscosity of Blood and Plasma with Shear Rate (10). .....	- 5 -
Fig. 1. 7 Rouleaux in Plasma.....	- 6 -
Fig. 1. 8 Bridging between Erythrocytes with Fibrinogen. ....	- 7 -
Fig. 1. 9 Comparison of Erythrocyte Aggregate Formation by Fibrinogen, IgG and Related Molecule..-	
7 -	
Fig. 1. 10 Absorption Spectra for Whole Blood at Ht of 45% and Water.....	- 9 -
Fig. 1. 11 Erythrocyte Aggregation and Sedimentation. ....	- 10 -
Fig. 1. 12 Analyzers for Measuring Erythrocyte Aggregation (Syllectometry).....	- 12 -
Fig. 1. 13 Schematic Illustration of the Syllectogram and Erythrocyte Aggregation. ....	- 12 -
Fig. 1. 14 Syllectogram and Aggregation Parameters. ....	- 13 -
Fig. 1. 15 Outline of the Thesis. ....	- 16 -
Fig. 2. 1 Schematic Illustration of Erythrocyte Sedimentation Curve.....	- 18 -
Fig. 2. 2 Review of Formulae Describing ESR. ....	- 19 -
Fig. 2. 3 Illustration of Boycott Effect. ....	- 21 -
Fig. 2. 4 Outline of the Chapter 2.....	- 22 -
Fig. 2. 5 Sedimentation Formulae Used in the Experiment.....	- 24 -
Fig. 2. 6 Schematic Illustration of the Sample Preparation. ....	- 25 -
Fig. 2. 7 ESR Measurement by the Westergren Method. ....	- 26 -
Fig. 2. 8 Automated Hematology and ESR Analyzer MEK-1305 (Nihon Kohden Corporation). ...	- 28 -
Fig. 2. 9 Experimental Apparatus and Aggregation Parameters.....	- 28 -
Fig. 2. 10 Relationship between the Sedimentation Velocity ( $V_e$ ) and AI for Each Measurement Time at Each Ht.....	- 30 -
Fig. 2. 11 Analysis of the Dependence of the Ht on the AI for Each Measurement Time.....	- 32 -
Fig. 2. 12 Analysis of the Relationship Between the Sedimentation Parameters and the Aggregation Parameters. ....	- 34 -
Fig. 2. 13 Comparison between the Sedimentation Velocity Obtained from the Westergren Method and the Value Estimated by the Regression Equation. ....	- 34 -
Fig. 2. 14 Analysis and Estimation of the Time Constant of the Sedimentation Curve. ....	- 36 -
Fig. 2. 15 Comparison of Representative Sedimentation Curves for Each Sample. ....	- 38 -
Fig. 2. 16 Relationship between the ESR at 60 min Obtained by the Westergren Method and the Estimated Value.....	- 39 -

Fig. 3. 1 Relationship between the Aggregation Index and Sedimentation Velocities. .... - 46 -

Fig. 3. 2 Comparison of the ESR Calculated Using HAI and Ht with WG ESR. .... - 48 -

Fig. 3. 3 Mean difference in the ESR calculated using HAI and Ht from WG ESR for each MCV range.  
..... - 50 -

Fig. 3. 4 Comparison of the ESR calculated using HAI, Ht, and MCV with WG ESR. .... - 52 -

Fig. 3. 5 Mean difference in the ESR corrected for MCV from WG ESR for each MCV range. .... - 52 -

Fig. 4. 1 Mechanism of Hemostasis ..... - 56 -

Fig. 4. 2 Schematic Representation of the Coagulation Cascade. .... - 56 -

Fig. 4. 3 Fibrinolysis Pathway..... - 57 -

Fig. 4. 4 Preparation of Samples and Experimental Settings. .... - 60 -

Fig. 4. 5 Sylllectogram from a Representative Measurement of a Blood Sample at Each Fibrinogen  
Concentration. .... - 62 -

Fig. 4. 6 Representative Images of a Diluted Blood Sample at Fibrinogen Concentrations of (A) 32  
mg/dL, (B) 96 mg/dL, and (C) 255 mg/dL..... - 62 -

Fig. 4. 7 Relationship between Fibrinogen Concentration and the Aggregation Parameters. .... - 64 -

Fig. 4. 8 Reproducibility of the Aggregation Parameters. .... - 68 -

Fig. 5. 1 Blood Group Typing by Tube method..... - 72 -

Fig. 5. 2 Image of a Sylllectogram of Agglutination-negative and -positive Samples. .... - 76 -

Fig. 5. 3 Microscope Images of a Representative Sample Mixed with Antibody Reagent. .... - 78 -

Fig. 5. 4 Sylllectogram from a Representative Measurement of Agglutination-positive and -negative  
Samples. .... - 80 -

Fig. 5. 5 Relationship between the antibody reagent volume ratio and the aggregation parameters for  
each blood type..... - 82 -

Fig. 5. 6 Reproducibility of the AMP value. .... - 84 -

Fig. 5. 7 Comparison of the aggregation parameter AMP between the positive and negative conditions.  
..... - 86 -

表目次

Table 2. 1 Correlation Coefficients between the Sedimentation and AI..... - 30 -

Table 4. 1 Correlation Coefficients between Fibrinogen Concentration and the Aggregation Parameters  
in Each Subject..... - 64 -

Table 4. 2 Comparison of the Mean Values of the Aggregation Parameters between Fibrinogen Levels.  
..... - 66 -

Table 4. 3 Comparison of the CVs of the Aggregation Parameters between Fibrinogen Levels..... - 68 -



## 第1章 序論

本章では、本研究の基礎となる一般的背景について説明する。まずは最も基本となる血液の組成、赤血球と血漿タンパクについて述べる。次に、流路内の流れ、赤血球の凝集と変形、血液の光学的特性および赤血球凝集能の測定手法を説明する。本章の最後に、本研究における各章の位置づけを示す。

### 1-1. 血液の概要

血液量は、成人男性で約 5L と体重のおよそ 1/13 を占め、その内訳は約 40%の血球成分と、60%の血漿成分である(Fig. 1. 1)(1,2)。血液中に含まれる様々な血球細胞や血漿タンパクにより、人体の恒常性は保たれている。血液は、赤血球による生体組織への酸素供給、血小板および血漿中の凝固因子による止血、白血球および免疫グロブリンによる免疫反応等、様々な役割に参与するものである。従って、採取された血液検体にはヒトの疾患に関する膨大な情報を含むことから、医療における診断、治療のための検査対象として一般的、かつ重要なものである。血液を用いた検査は、血球細胞数を検査する全血算 (Complete Blood Count: CBC) や、各臓器の状態を示す血漿タンパク、血液凝固能に関するものなど多岐に渡る。一般的に、CBC 等の全血を使用する検査を除いては、抗凝固処理した血液を遠心分離にて血球と血漿 (抗凝固処理しない場合は血清) を分離し、血漿中に含まれる血漿タンパク等の測定を行うことが多い。

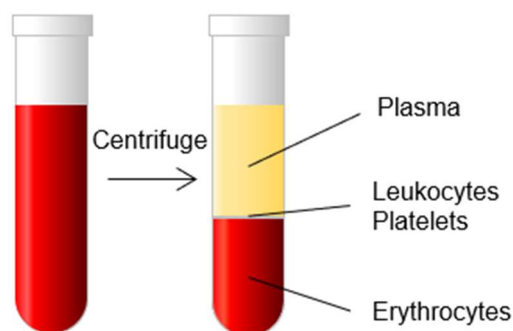


Fig. 1. 1 Blood Components.

## 1-2. 赤血球

ヒト赤血球 (以下, 赤血球) は, 血液 1 mL 中に約 45 億個存在し(2), 主に酸素運搬の役目を有する. 赤血球は Fig. 1.2 に示すように直径約  $8\ \mu\text{m}$ , 厚み約  $2\ \mu\text{m}$ , 容積約 90 fL の両凹円板形状である(1). この形状の表面積は, 同じ容積の球体と比べ 30-40%大きく, 酸素供給に優れるとされる(3). さらに, 赤血球は優れた変形能を有するため赤血球と同等以下の直径の毛細血管を通過可能であり, 毛細血管において酸素を各組織中の細胞に供給する(1,4). 赤血球は骨髄内で生成された前駆細胞が成熟する過程で脱核し, 核やミトコンドリア等の細胞小器官を持たない. 血液中における赤血球の寿命は約 120 日とされる. 赤血球の主たる役割である組織への酸素供給は, 赤血球内に内包されたヘモグロビンにより行われる. ヘモグロビンは酸素分圧が高い環境下では酸素と結合しやすく, 酸素分圧が低い, または二酸化炭素が多い環境では酸素と解離しやすい (ボーア効果) ことから, 酸素分圧が高い肺でヘモグロビンが酸素と結合し, 酸素分圧の低い抹消にてヘモグロビンが酸素を放出することにより, 効率的に組織への酸素供給を行っている(5). 赤血球は, 脂質二重層からなる膜の内側にスペクトリン等からなる細胞骨格を有し, 赤血球特有の形状と変形能を示す(6). 脂質二重層には band3 等の膜輸送タンパクを有し, 膜の外側には糖脂質と糖タンパクからなる glycocalyx を有する(7).

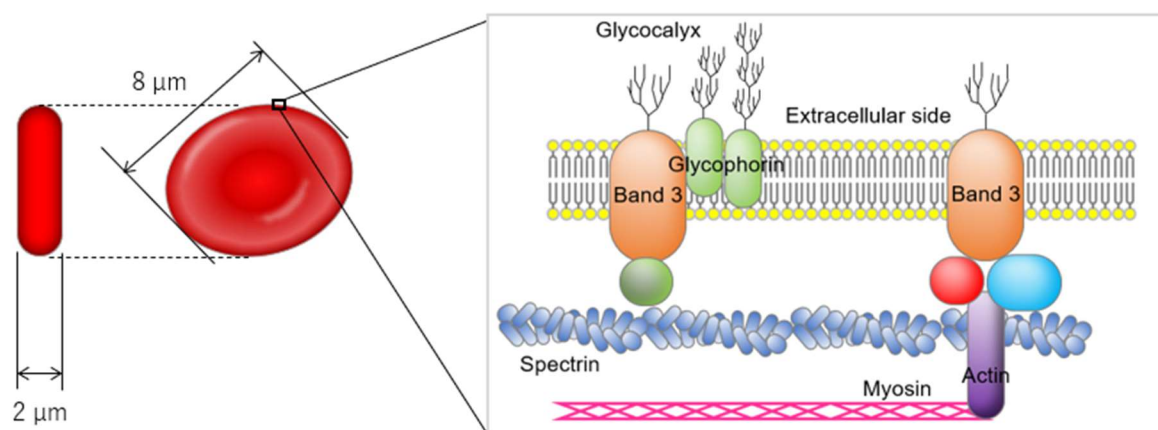


Fig. 1.2 Erythrocyte and Structure of Erythrocyte Membrane (7).

### 1-3. 血漿タンパク

血漿は、その 92%が水であり、血漿タンパクが 7% (65-85 g/L) を占める。血漿タンパクの構成を Fig. 1. 3 に示す。血漿タンパクにおいて最も多いアルブミンは (35-55 g/dL) (8), 膠質浸透圧を決定する主要因子であり、血管内の水分の保持を担う他、様々な元素、脂肪酸、脂溶性薬物と結合し、物質の運搬を行う。次いでグロブリンが多く、リポタンパク、ビタミン、ホルモンを運搬する  $\alpha$  グロブリン、鉄や銅を運搬する  $\beta$  グロブリン、抗体として免疫反応を担う  $\gamma$  グロブリン (免疫グロブリン) を含む。免疫グロブリンには、分子量の順に IgM, IgA, IgG, IgD, IgE が存在し、最も多いのは IgG である (800-1800 mg/dL) (8)。さらに、炎症性タンパクかつ止血の要となる凝固第 I 因子であるフィブリノゲンを多く含む (200-450 mg/dL) (8)。フィブリノゲンの詳細は第 4 章にて述べる。これらの血漿タンパクはわずかに帯電しており、電気泳動下では荷電状態に応じて Fig. 1. 4 のように分離できる。アルブミンは負に帯電しており、IgG, IgM, IgA, フィブリノゲン等は正に帯電している。

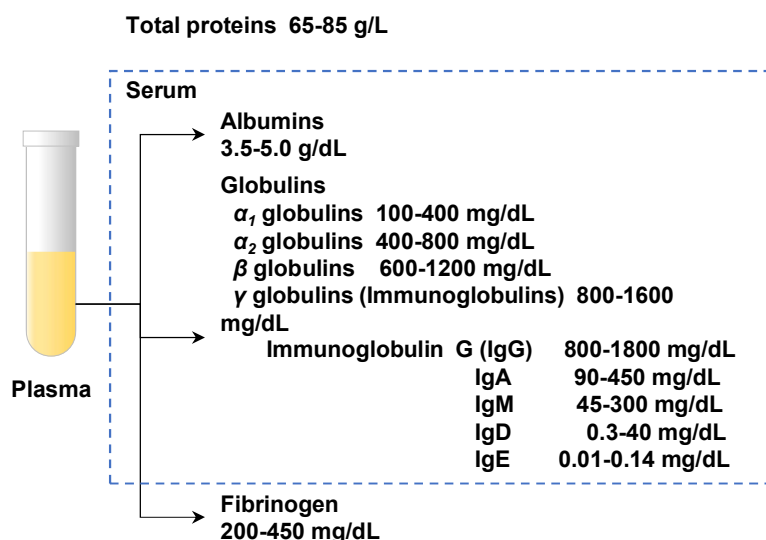


Fig. 1. 3 The Elements of Plasma Proteins.

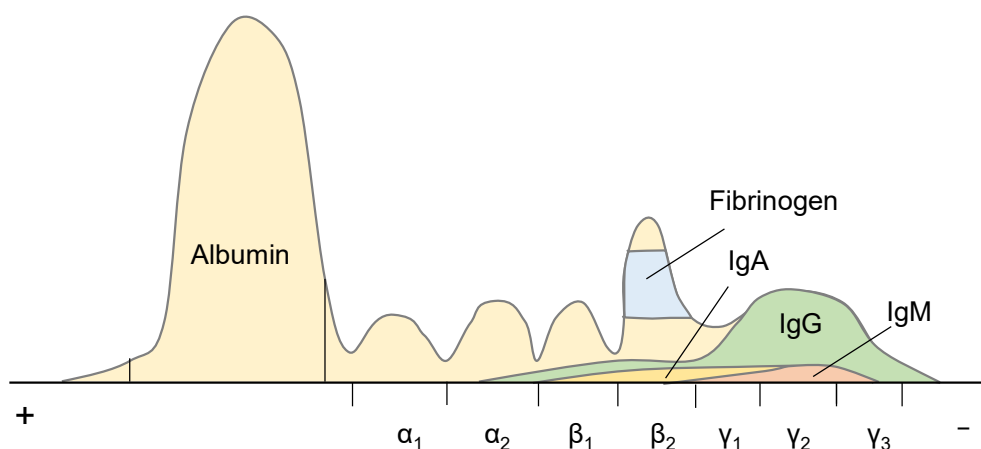


Fig. 1. 4 Schematic Representation of Plasma Proteins Separated by Electrophoresis.

## 1-4. 流路内における流れ

生体内における血液の循環，流路内における流れを考える上で，流体の粘度およびせん断速度の基礎的な理解が必要である．平行に間隔 $h$  [m]で置かれた十分に大きい面積 $A$  [m<sup>2</sup>]の2枚の平板の間が流体満たされている場合を考える．片方の平板は静止させ，もう片方の平板を力 $F$ にて水平方向に速度 $U$  [m/s]にて移動させるクエット流れを考えた時，流れの速度勾配，せん断速度 (Shear rate)  $\dot{\gamma}$  [s<sup>-1</sup>]は，以下の式で表される．

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dy} = \frac{U}{h} \quad Eq.(1.1)$$

ここで， $\tau$ はせん断応力であり，上式では $\tau=F/A$ で定義される．水等のNewton流体，すなわち，せん断速度によらず粘度が一定である場合に，流体の粘度 $\mu$  [Pa s]は次の式で定義される．

$$\mu = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad Eq.(1.2)$$

次に，血管等の円管内における流れについて考える．流体の流れの特性は，粘性力に対する慣性力の比であるレイノルズ数 $Re$ にて決定される．

$$Re = \frac{\rho Ul}{\nu} \quad Eq.(1.4)$$

ここで， $\rho$ は流体の密度 [kg/m<sup>3</sup>]， $U$ は平均流速 [m/s]， $l$ は流れの代表長さ [m]， $\nu$ は動粘性係数 [m<sup>2</sup>/s]である．レイノルズ数は約2000以下では層流であり，それ以上では乱流となる．血管においては，上行大動脈ではレイノルズ数は高く乱流となるが，細動脈や毛細血管，静脈においてはレイノルズ数が低く層流となる(9)．層流で流れる場合の流速分布は，ハーゲン・ポアズイユの式から次の式で表される ( $0 \leq r \leq r_0$ )．

$$u = -\frac{1}{4\mu} \left( \frac{dp}{dx} \right) (r_0^2 - r^2) \quad Eq.(1.3)$$

$r$ は円管半径， $dp/dx$ は流れ方向の圧力勾配である．この式から，流速はFig. 1.5に示すように円管中心 ( $r=0$ )で最大値を取り，壁面 ( $r=r_0$ )では0となる放物線を描くことがわかる．また，断面のせん断速度分布は上式を $r$ で微分して以下の式で得られ，壁面で最大となり，円管中心では0となる．

$$\dot{\gamma}(r) = \frac{r}{2\mu} \left( \frac{dp}{dx} \right) \quad Eq.(1.4)$$

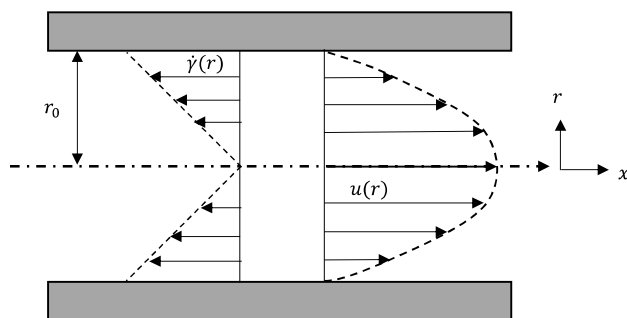


Fig. 1. 5 Flow and Shear Rate in a Cylindrical Tube

しかし、血液は非 Newton 流体であり、せん断速度の増加に対して見かけの粘度が低下する shear thinning の特性を有する (Fig. 1. 6) (10). このような特性は、赤血球の変形および 1-5 に詳細を述べる赤血球の凝集と相互に依存している. 低せん断速度領域では、赤血球は凝集し見かけの粘度を増加させる. 一方でせん断速度が増加すると、凝集した赤血球の解離、流れ方向への配向、せん断応力に応じた変形を生じる結果、shear thinning の特性を示す(11). このように、血液特有の流体特性から血液の粘度やせん断速度を正確に求めることは難しく、数値流体解析法を利用して血液の流体現象を見積もるための様々な計算モデルが提唱されており(12,13), Carreau-Gambaruto モデルで計算した血液の流体解析結果が実験値と比較的良く一致するとされる(14,15).

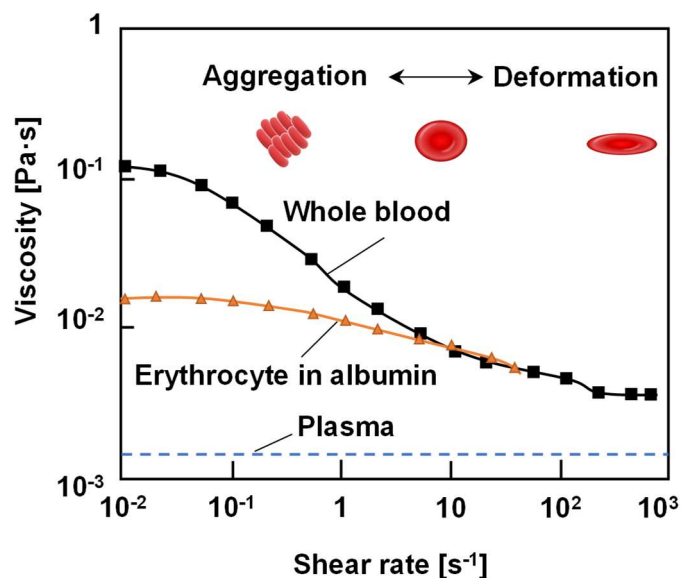


Fig. 1. 6 Viscosity of Blood and Plasma with Shear Rate (10).

### 1-5. 赤血球の凝集

赤血球は、低せん断速度領域においては、赤血球同士が高分子の存在化において可逆的に集合し接着する(16)。これは凝固反応により生成される血栓とは異なる。赤血球は直線的に連なる連鎖(Fig. 1.7)を形成し、それらはやがて三次元的に成長した凝集塊となる。この赤血球凝集の機序は未だ明確ではなく、高分子架橋説 (Bridging theory) (17)と高分子排除説 (Depletion theory) (18)が提唱されている。高分子架橋説においては、赤血球表面の陰性荷電による赤血球間に働く反発力に対して、高分子が赤血球間を架橋する力が勝ることにより起こるとされ、高分子排除説においては、赤血球表面近傍から高分子が排除されることにより生じる浸透圧勾配が、赤血球間の溶媒を排除することによって集合が形成されるとしている。赤血球凝集は、1. せん断速度、2. 赤血球の性質(形態、変形能、表面の陰性電荷)、3. 血漿中の高分子、4. 赤血球濃度(ヘマトクリット)、5. 温度の影響を受ける。



Fig. 1.7 Rouleaux in Plasma.

#### 1. せん断速度の影響

赤血球の凝集現象を安定して観察するためには、 $3\text{ s}^{-1}$ 以下のせん断速度が必要とされる(19)。凝集を解離させるために必要なせん断速度は、凝集能の強度に依存するため様々であるが、通常であれば約  $200\text{ s}^{-1}$ 以上であれば凝集が解離されるとされる(20)。また、 $1000\text{ s}^{-1}$ を超える場合には変形の影響が顕著になる(20)。完全な流動停止よりも、わずかな流れの存在下の方が、赤血球の衝突確率が高まり凝集が促進される。

#### 2. 赤血球の性質

赤血凝集に対する影響は血漿タンパクによるものが大きいですが、赤血球の性質も影響する。形状が異常であったり、変形能が低下した赤血球は、接着しにくいいため凝集しにくい(21)。赤血球表面には糖衣であるグリコカリックスが存在し、シアル酸が豊富で負に帯電しているために、赤血球同士は静電的に反発する。心筋梗塞やサラセミア等の疾患においては、シアリダーゼ活性が増加し、赤血球表面のシアル酸量が減少することで凝集を起こしやすいとの報告もある(22,23)。赤血球表面のタンパクによっても凝集能は影響され、老化赤血球は凝集しやすいことや、動物種によって全く異なる凝集能を示すことが知られている。ウマ赤血球は凝集しやすく、ラット赤血球は凝集が弱く、ウシ赤血球は凝集しない(24,25)。

## 3. 血漿中の高分子

血漿タンパクのうち、凝集能に非常に大きな影響を与えるのはフィブリノゲン、免疫グロブリン (IgG, IgM) である(26,27). 高分子架橋説では, Fig. 1.8 に示すように, 赤血球膜の外側は, 糖鎖が持つシアル酸により負に帯電し, 赤血球間に反発力が発生しているが, 分子量が大きくかつ正電荷を帯びているフィブリノゲンや IgG などが赤血球間を架橋し, 反発力に打ち勝つために赤血球の接着が起こるとされる. 分子量の大きいフィブリノゲンおよび免疫グロブリン IgG, IgA, IgM は凝集速度が比較的大きいが, 分子量の大きさに対する凝集速度の大きさはフィブリノゲンが最も高い (Fig. 1.9 (28)). このようなフィブリノゲン依存的な赤血球凝集能は, 弱いながらもフィブリノゲン特異的に結合するサイトが赤血球膜上に存在するためであるとされる(26,29). 糖尿病患者においても赤血球凝集能が亢進しており, その要因は赤血球膜上のシアル酸低下だけでなく, 血中グルコース濃度が高いことも報告されている(30,31). また, 輸液および止血治療の際に代用血漿として用いられるゼラチンや Hydroxyethyl starch (HES) 等も赤血球凝集能を増加させることが示唆されている(32). 同じく代用血漿の低分子デキストランは凝集を解離させるが(33,34), 70 kDa 以上の高分子デキストランは凝集を増加させる(34). しかし, その凝集形態はフィブリノゲンにより起こる連鎖とは異なるとされる(35).

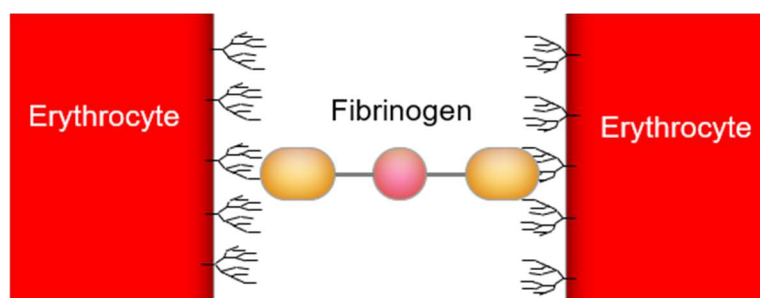


Fig. 1.8 Bridging between Erythrocytes with Fibrinogen.

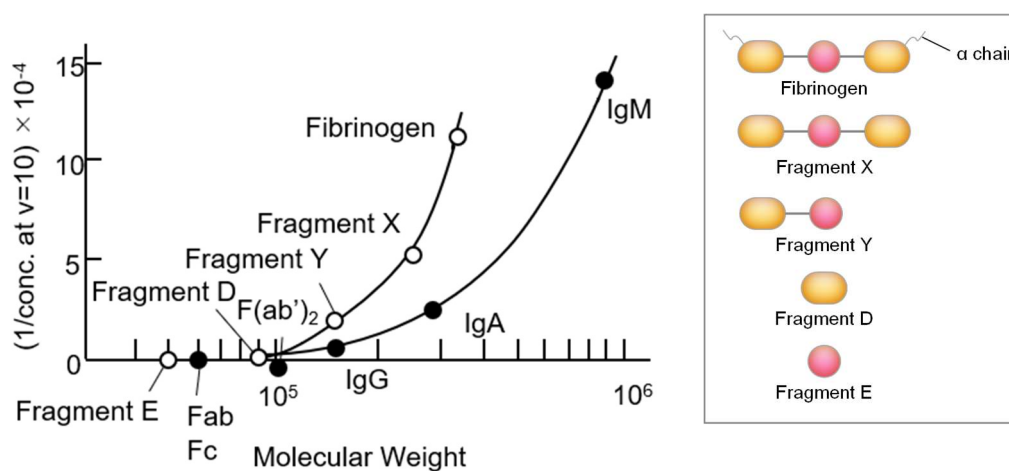


Fig. 1.9 Comparison of Erythrocyte Aggregate Formation by Fibrinogen, IgG and Related Molecules (28)

#### 4. 赤血球濃度（ヘマトクリット）

赤血球凝集は血液中に占める赤血球の体積の割合，すなわちヘマトクリットの影響を大きく受ける．ヘマトクリットは男女の差，年齢差があり，様々な疾患に付随した貧血から多血症に至るまで非常に幅広い範囲を取り得る(2,36,37)．ヘマトクリットが増加すると，最終的な凝集塊の径は低下することが報告されている(38)．また，1-7-3 に示す光学的な赤血球凝集測定手法で得られた凝集パラメータも，ヘマトクリットにより影響を受ける(39,40)．

#### 5. 温度

赤血球凝集は温度の影響を大きく受け，温度の増加と共に凝集速度は増加する(41)．また，赤血球凝集の解離に必要なせん断速度は温度が高いほど低下する傾向にあり，37°C付近で最小となる(42)．多くの先行研究，および測定器において 37°Cの温度環境下での測定が行われており，赤血球凝集能測定のガイドラインにおいても推奨されている(19)．

上記で述べたように，赤血球凝集は，血漿タンパクにおける異常または赤血球の形態や膜の異常を反映したものである．感染症，肺炎，血管炎，リウマチ，潰瘍性大腸炎，自己免疫疾患等では，炎症反応によって炎症性タンパクであるフィブリノゲン，IgG および IgM 等の免疫グロブリンが血中に増加し，赤血球凝集が亢進する(16,43,44)．また，脳梗塞，心筋梗塞等の虚血性疾患においても増加することが報告されている(44,45)．赤血球は凝集すると粘性が増加し，粘性が増加すると血流量が減りさらに凝集しやすくなり，血液循環が悪化しやすい．凝集した赤血球は血管中心を流れる性質があり，血管壁との間隙が増加するため，生体組織への酸素輸送においては不利である(46)．



## 1-6. 血液の光学的特性

赤血球凝集を光学的に測定する手法においては、血液の光学的特性、すなわち光吸収特性と光散乱特性を考慮する必要がある。Fig. 1. 10 に示すように、赤色光から近赤外光領域は、生体の窓（第一の窓）と呼ばれ、生体中に大量に存在する水と、ヘモグロビンの吸収係数が共に低い波長帯域であるため、透過しやすく情報を得やすい(47)。ヘモグロビンは、酸素化時には赤色の吸収係数が低く、近赤外の吸収係数が高い。また、脱酸素化時の吸収特性はその逆であることから、酸素化されている状態では赤血球は赤色を示し、脱酸素化すると暗褐色となる。このような赤色と近赤外光に対する吸収特性を利用し、血中酸素飽和度を測定するパルスオキシメータや頭蓋内の血流状態をモニタリングする NIRS (Near-infrared spectroscopy) 等の医療機器が開発されてきた(48,49)。散乱が無く、均一な光吸収体に強度  $I_0$  の光が入射し、厚み  $d$  だけ入射方向に進んだ光の光強度  $I$  は、Lamber-Beer 則(50)により以下の式で表される。

$$I = I_0 10^{-\varepsilon C} \quad \text{Eq. (1.5)}$$

ここで、 $\varepsilon$  はモル吸収係数、 $C$  はモル濃度である。この式から、光路長さの増加や、吸収体の濃度増加によって指数関数的に透過光強度が低下することがわかる。血液は赤血球が高濃度に分散する媒質であるため、吸収特性に加えて散乱特性を考慮する必要がある。上記の生体の窓における波長 (650-900 nm) と赤血球のサイズ (8  $\mu\text{m}$ ) の場合、散乱体粒子が入射光の波長と同等かそれ以上の大きさの時に起こるとされる Mie 散乱が主に生じる(51)。Mie 散乱において、粒子サイズが増加すると、前方散乱光が強まり側方および後方散乱光は弱まるため、透過光が増加する。濃厚な赤血球の分散溶液である血液を透過する光は、上記のように、赤血球の濃度とサイズに応じて多重散乱し、かつヘモグロビンによる吸収を受けることとなる。

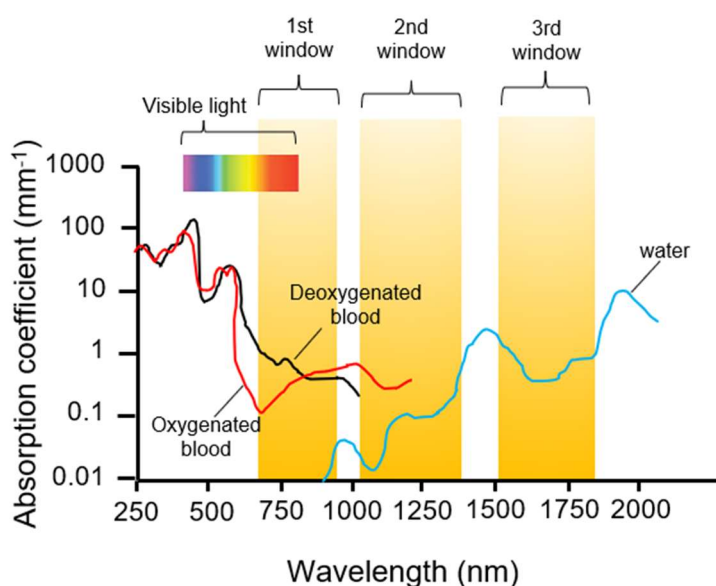


Fig. 1. 10 Absorption Spectra for Whole Blood at Ht of 45% and Water (47).

## 1-7. 赤血球凝集能の測定手法

### 1-7-1. 赤血球沈降速度

これまでに様々な赤血球凝集能測定手法が開発され、それらで得た値と疾患との関連性が報告されてきた。最も古典的な手法は赤血球沈降速度 (Erythrocyte Sedimentation Rate: ESR) の測定であり、赤血球凝集能測定手法の中では、臨床検査として唯一確立している手法である(52,53)。1918年に、Fahraeus が妊婦の血液では赤血球が凝集し沈降する速度が増加することを発見して以来、ESR は感染症、肺炎および血管炎や関節リウマチなどの自己免疫疾患等の様々な疾患において亢進することが知られている(52,54,55)。ESR の古典的かつ現在においても国際的な参照法である Westergren 法は、クエン酸ナトリウムと血液を 4:1 で混合して抗凝固処理した血液を、垂直に立てたチューブ (Westergren 管) 内に満たして静置し、1 時間後の赤血球が沈降する距離を測定するものである (Fig. 1. 11) (56,57)。様々な疾患で炎症性タンパクの増加等により赤血球凝集塊が成長すると、管内の血球が沈降する速度が増大する。ESR の正常範囲は 15-20 mm/h 以下とされる。ESR は C-reactive protein (CRP) やプロカルシトニン等の炎症マーカーよりも感度は劣るが、安価であるため、非特異的な炎症性疾患のスクリーニング検査として世界中で使用されている。

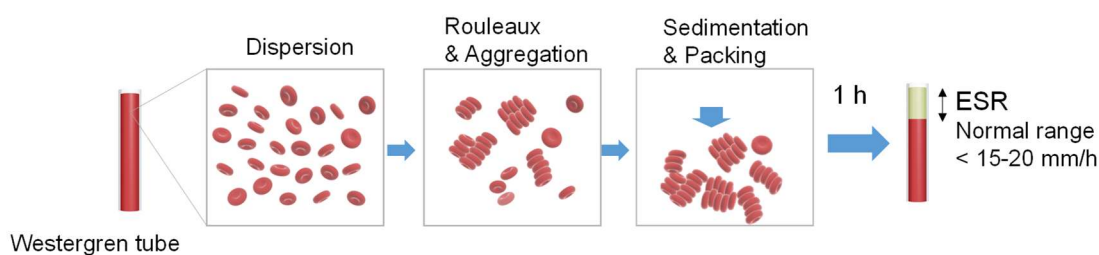


Fig. 1. 11 Erythrocyte Aggregation and Sedimentation.

### 1-7-2. レオスコープ法

顕微鏡による直接観察や、コーンプレート内でわずかなせん断速度を与え、凝集速度を増加させた状態で顕微鏡観察を行い、凝集した赤血球の割合を算出するレオスコープ法(58)がある。これらは直接観察可能であるメリットを有するが、希釈が必要なことから実際の血液状態と異なることや、個々の凝集塊の凝集度のばらつきが大きく、限られた視野から得た値の再現性や定量性に課題が残る。

### 1-7-3. Syllectometry

これまでの赤血球凝集測定手法の中で、複数の製品が商品化され、短時間で簡便かつ低コストに赤血球凝集測定が可能であるのは、syllectometry (59)または aggregometer (60,61)と呼ばれるものである。これらの手法では、血液に対してせん断速度を加えて赤血球凝集を解離させた後、瞬時にせん断速度を0にする。そして、その直後に生じる赤血球の連鎖形成に応じた血液の透過光強度または反射光強度の経時変化波形である syllectogram を計測するものである。初期の Syllectometry の装置は、Fig. 1. 12A のように回転式のシリンダの空隙に血液を入れ、カップを回転させて血液にせん断応力を加えた後、回転を瞬時に停止させ、その際に血液に照射したレーザー光の後方散乱光の経時変化を syllectogram として測定するものであった(62)。その後、Fig. 1. 12B のように、サンプルの入れ替えが容易な流路と安価な LED 光源を使用し、血液の透過光を測定する方式や(63,64)、スターラを用いた方式(40)等が開発され、小型化、低コスト化が進んできた。本研究で使用する透過光型の syllectogram の模式図を Fig. 1. 13 に示す。せん断速度下において、赤血球の凝集は解離し、流れ方向に配向して流れ、かつ流れ方向に変形した形をとる。せん断速度負荷を停止させると、赤血球の配向性が解除されランダムな配置になると同時に変形した形状が回復するため、光の散乱が増加し、透過光強度は低下する。透過光強度が極小値  $I_{\min}$  となる時間を  $0\text{ s}$  とし、所定の時間  $t$  までの透過光強度を測定する。せん断速度解除後の赤血球は、すみやかに連鎖を形成し、凝集サイズの増加とともに散乱強度が低下し、透過光強度が増加する。直線的な連鎖形成時には透過光強度の増加は急峻であるが、3次元的な凝集塊に成長するにつれ透過光強度の増加速度は低下する。syllectogram は連鎖形成に関与する時定数  $T_{fast}$  と、3次元的な凝集塊形成に関与する時定数  $T_{slow}$  を用いた指数関数として近似できるとされる(61)。

$$I(t) = I_{const} - I_f e^{-\frac{t}{T_{fast}}} - I_s e^{-\frac{t}{T_{slow}}} \quad Eq. (1.6)$$

$I_{const}$ ,  $I_f$ ,  $I_s$  はそれぞれ定数、および連鎖形成と凝集塊形成に関する係数である。しかしこれらの時定数の取得は煩雑であるため、Fig. 1. 14 に示すように簡易的な解析パラメータである aggregation parameter (以下、凝集パラメータと呼ぶ) がよく用いられている。凝集パラメータとしては、以下のようなものがある。

- AMP (Amplitude): Syllectogram の最小値  $I_{\min}$  と最大値  $I_{\max}$  (測定最終点) の差分
- SA (Surface Area): Syllectogram と  $I_{\min}$  の間の面積
- AI (Aggregation Index): Syllectogram と  $I_{\min}$  の間の面積 A と、syllectogram と  $I_{\max}$  の間の面積 B を用いて、 $AI = B / (A+B) \times 100 [\%]$ にて計算される値
- $t_{1/2}$  (Aggregation Half Time): AMP がその 1/2 の値となる時間
- $t_0$  (Relaxation Time): 解離した赤血球が凝集を開始するまでの時間

なお、syllectometry の装置は方式の違いによって、せん断速度、測光方式 (透過, 反射)、測定波長、測定温度、解析パラメータにおいて違いがあり、異なる測定系での測定値を直接比較する

ことはできない。また、それぞれのパラメータはヘマトクリットの影響を受けるため(39,40), *syllectometry* を用いた赤血球凝集能の評価においてヘマトクリットの条件を揃える、または考慮することが必須である。

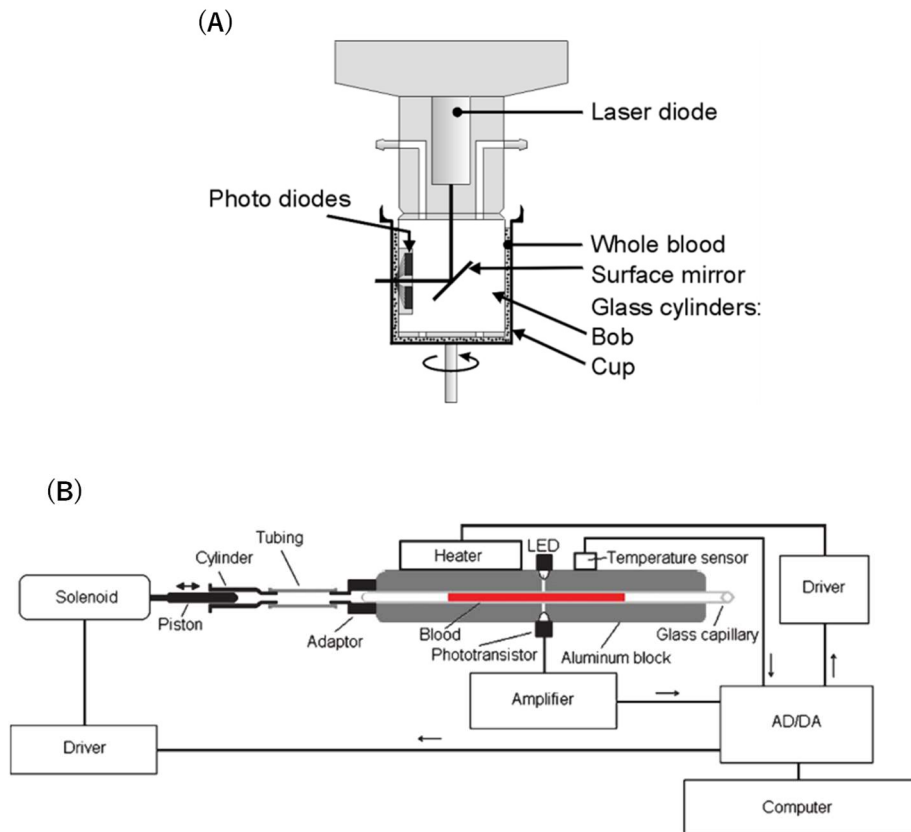


Fig. 1. 12 Analyzers for Measuring Erythrocyte Aggregation (*Syllectometry*). (A) A cylinder type (62). (B) A capillary flow type (64).

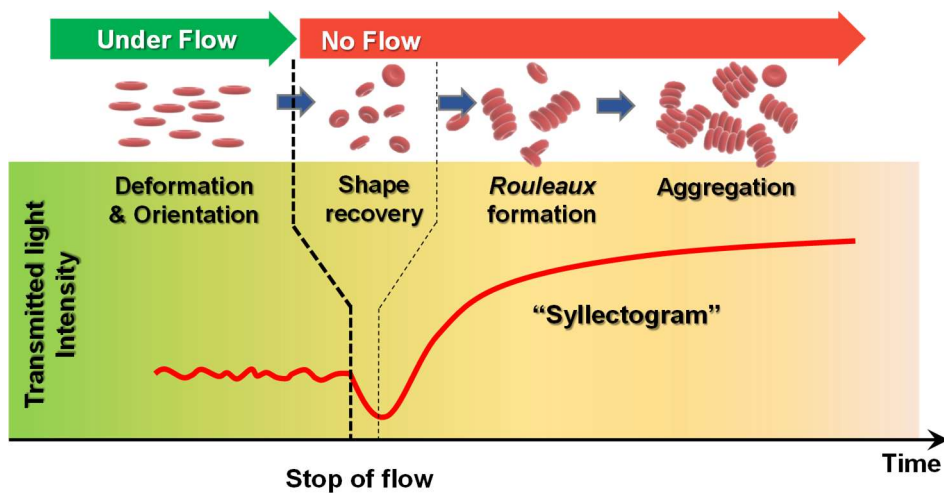


Fig. 1. 13 Schematic Illustration of the Syllactogram and Erythrocyte Aggregation.

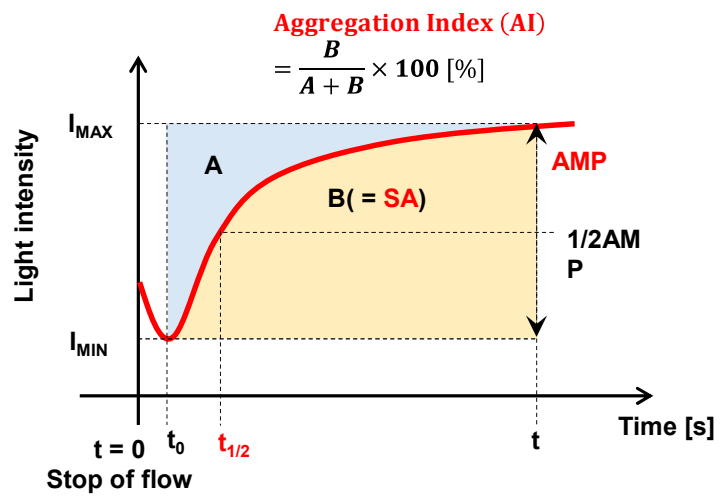


Fig. 1. 14 Syllectogram and Aggregation Parameters.

#### 1-7-4. その他の測定手法

超音波による後方散乱強度や周波数シフトを解析する手法(65,66)は、凝集の位置情報とサイズを得ることができ、非侵襲測定に応用可能な優れた手法であるが、凝集サイズを検出可能な高周波数帯域の超音波測定機器は非常に高価である。また、血液の電気伝導度や静電容量を測定する手法があるが、静電容量は他の手法により得た赤血球凝集パラメータ変化と概ね一致するが(67)、電気伝導度は一致せず、凝集以外の影響を受けやすいとされる(68)。個々の赤血球間における接着力を、光ピンセット (Optical Tweezer) (69)や原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscopy: AFM) (29)を用いて評価する手法も報告されている。

### 1-8. 血液検査における一般的課題

血液は生体組織への酸素輸送、血管損傷時の止血、異物に対する免疫反応等を担う様々な細胞および血漿タンパクを有することから、血液からそれらの情報を得ることは疾患の診断および治療のために非常に重要である。これまでに疾患や病態に特異的な様々な検査項目が開発されてきた。しかしながら、そのような多くの検査項目を処理する必要がある現代の検査室において、装置の測定時間と、血漿または血球を遠心分離する前処理の時間がかかることは、医師の治療判断を遅らせ、患者の予後不良に繋がるだけでなく、患者自身が検査結果を待つ時間の不安とストレスにも繋がる。また、高価な検査試薬やディスプレイ品等の消耗品は、医療費負担を増加させる。さらに、日本の診療報酬制度においては、検査毎に病院側が診療報酬として請求できる回数や価格が決まっているため、消耗品コストが高い検査は測定回数が増えた分だけ病院経営が圧迫される。現代の日本においては、65歳以上の人口が3621万人と全人口の28.9%を占め(70)、高齢化が著しく進んでいると同時に、国内総生産(GDP)に占める国民医療費の比率は7.93%(44兆3895億円)にまで膨らんでいる(71)。このような医療経済的な問題は、国内に限らず、医療資源が潤沢でない新興国においても同様である。従って、現代の血液検査において、検査時間の短縮化、前処理の簡略化、試薬・消耗品の削減は、医療の質および医療経済において大きな課題である。

### 1-9. 臨床検査における赤血球凝集能測定の問題

赤血球凝集能に関する研究は、これまで精力的に研究された時期もあった。しかし、疾患に対する特異性が低く、測定に影響する因子も多いことから、ESR等の一部のスクリーニング検査以外に臨床的有用性を見出すことは難しかった。また、世界的に普及しているESRに関しても、測定時間が長く、検体量が多いこと等が課題となっていた。

### 1-10. 本論文の目的および概要

本研究の目的は、前述の血液検査および赤血球凝集測定における課題を解決可能な、赤血球凝集測定用いた血液検査手法を開発するものである。開発を試みた対象は以下の3つである。

1. 迅速かつ正確な赤血球沈降速度(ESR)測定法の開発と検証
2. 赤血球凝集測定を用いた血液凝固障害の検出のための基礎検討
3. 赤血球凝集測定を用いたABO血液型判定法の開発

第2章では、赤血球凝集測定とヘマトクリット補正を用いた、迅速かつ正確なESR測定手法の開発に関して述べる。第3章では、第2章にて開発した手法の妥当性検証を、十分なサンプルサイズの臨床検体を用いて実施すると共に、さらにMCVの影響を補正することにより、正確度を向上させることを試みた。第4章では、重度外傷時の血液凝固障害の要因となるフィブリノゲンの濃度低下を、血液凝固試薬を用いずに検出するための基礎検討を行った。第5章では、血液型由来の抗原抗体反応による赤血球凝集(agglutination)の検出に応用し、血液の洗浄希釈操作が不要で、かつ微量な試薬量で判定可能な新しい血液型判定手法の開発を行った。第6章では各章の総括および今後の展望を述べ、最後に第7章にて結論を述べる。

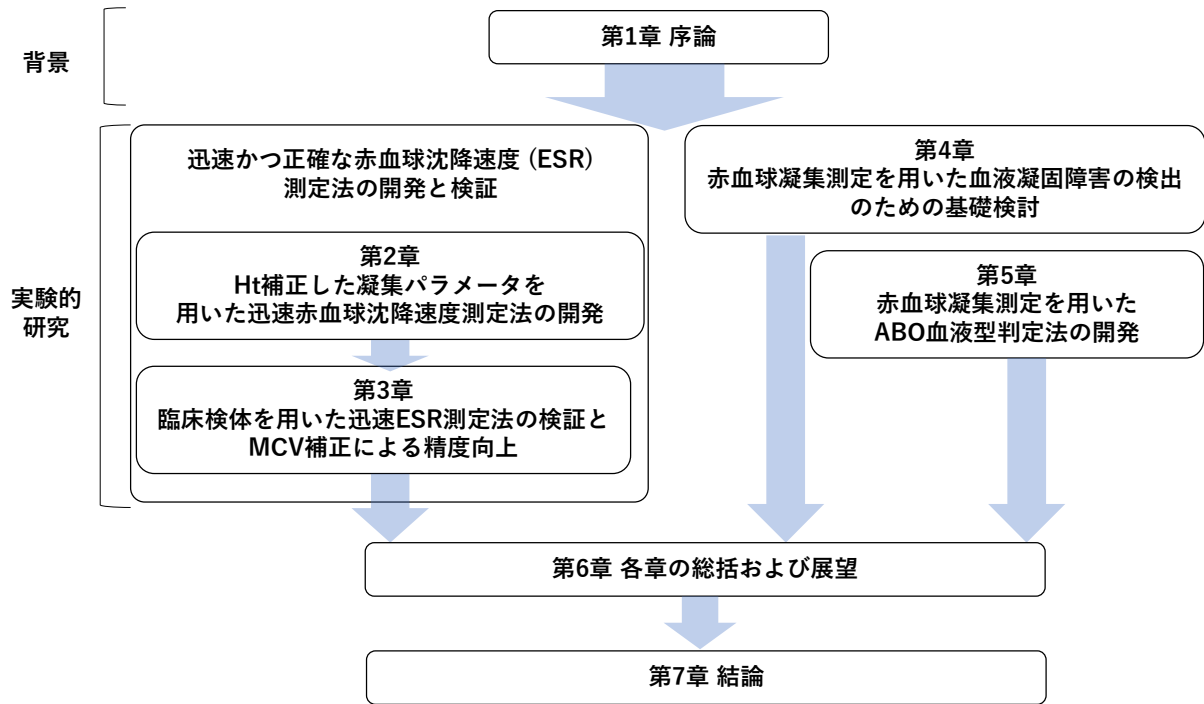


Fig. 1. 15 Outline of the Thesis.



## 第2章 ヘマトクリット補正した凝集パラメータを用いた迅速赤血球沈降速度測定法の開発

本章は、赤血球凝集測定手法の中で、臨床検項目として確立されている赤血球沈降速度 (ESR) の迅速測定における問題であった計算式の不透明さと、ヘマトクリットを要因とする参照法との乖離を解決し、迅速かつ正確な ESR 測定法の開発を目的とした。なお、本研究成果に関して、以下の論文発表を行っている。

Higuchi M, Watanabe N. A rapid and accurate method for estimating the erythrocyte sedimentation rate using a hematocrit-corrected optical aggregation index. PLoS One. 2022 Jul 12;17(7):e0270977.

利益相反 (Conflict of interest: COI) 等に関して：

本章における研究は、筆者が本学博士課程に入学後の 2020 年に本研究室と日本光電工業株式会社との共同研究を締結した後に実施し、筆者が日本光電工業株式会社にて開発に携わった全自動血球計数・赤血球沈降速度測定器 MEK-1305 を用いて、日本光電工業株式会社の社員として社内にて測定データを取得し、本研究室の学生としてデータ解析を行ったものである。本研究に関わる特許 (特許 7037324) は、発明者：筆者、出願人：日本光電工業株式会社として日本国内にて登録されている。日本光電工業株式会社から本研究室への資金および装置類の提供は無く、また、本研究に関する計画立案、および評価には関与していない。

### 2-1. 序論

#### 2-1-1. 赤血球沈降曲線

赤血球の沈降曲線は、Fig. 2.1 に示すように 3つのフェーズに分けて記述される(72)。沈降曲線の第一のフェーズ (連銭形成期) においては、ずり応力下では血漿中に分散していた赤血球が、ずり応力から解放と同時に集合し、直線的に連なる連銭 (*rouleaux*) を形成する。時間と共に連銭は 3次元的に集合した凝集塊に成長し、ある程度の遅延時間後に赤血球と血漿界面の沈降が観測される。ESR の主要なフェーズは第二のフェーズ (等速沈降期) であり、沈降速度が最大となり、ほぼ一定となる。この等速沈降速度の記述には、単一粒子の沈降速度式である Stokes 式(73)が検討されてきた(72,74,75)。Stokes 式によれば、沈降速度は凝集塊径の二乗に比例する。また、沈降速度は、Fig. 2.1 に示すようにヘマトクリットの増加に伴い減少する。これは、沈降する赤血球体積相当分の血漿が、赤血球と入れ替わるように上昇流 (置換流) を形成し、赤血球と置換流が干渉し沈降速度が減速を受ける現象である干渉沈降 (*hindered settling*) (74,75)が発生するためである。

第三のフェーズ (堆積期) においては、血沈管の底部に堆積した赤血球によって沈降速度は減少していく。時間と共に赤血球の堆積層は密度を増し、最終的に沈降距離はヘマトクリットに応じた収束する(76)。このように、赤血球沈降曲線は各フェーズにおいてヘマトクリットの影響を大き

く受ける。Fabry は ESR に対するヘマトクリットの影響を補正する簡易式( $ESR \times 15 / (55 - Ht)$ )を提案している(38).

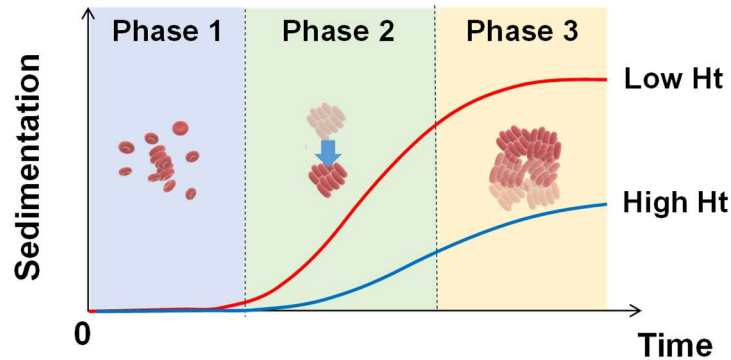


Fig. 2. 1 Schematic Illustration of Erythrocyte Sedimentation Curve.

これまでの先行研究において、いくつかの赤血球の沈降曲線が提案されてきた。Puccini らは赤血球沈降曲線を記述する式として、時間  $t$  における沈降距離  $h_p(t)$  を Eq.(2.1) で表している(77).

$$h_p(t) = h_\infty \left[ 1 - \frac{1}{\left( \frac{t}{t_{50}} \right)^\beta + 1} \right] \quad Eq. (2.1)$$

ここで  $h_\infty$  は十分長い時間が経過した後の沈降距離の最大値であり、 $t_{50}$  は沈降距離が  $h_\infty$  の半分となる時間、 $\beta$  は係数である。Puccini らの沈降曲線式は、フィッティング式としては優れているが、式中のパラメータに物理的な意味は無く、 $h_\infty$  を求めるために沈降曲線を長時間観測する必要があるため、短時間での ESR 推定には適用できない。

赤血球の沈降速度の説明に用いられる最も基本的な沈降速度式は、単一粒子の沈降速度  $V_s$  を表す Stokes の式であり、Eq.(2.2) で示される(73).

$$V_s = \frac{2(\rho_e - \rho_p)g}{9\mu_p} R_{ef}^2 \quad Eq. (2.2)$$

$\rho_e$  は赤血球密度 [ $\text{kg/m}^3$ ]、 $\rho_p$  は血漿密度 [ $\text{kg/m}^3$ ]、 $g$  は重力加速度 [ $\text{m/s}^2$ ]、 $R_{ef}$  は赤血球の有効径 [ $\text{m}$ ]、 $\mu_p$  は血漿粘度 [ $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ] である。しかし、Stokes の式は単一粒子に対する式であり、ESR を正確に記述するためには、様々なヘマトクリットや赤血球凝集を考慮する必要がある。これまでに提唱されてきた Stokes の式を修正した沈降モデルを Fig. 2. 2 に示す。

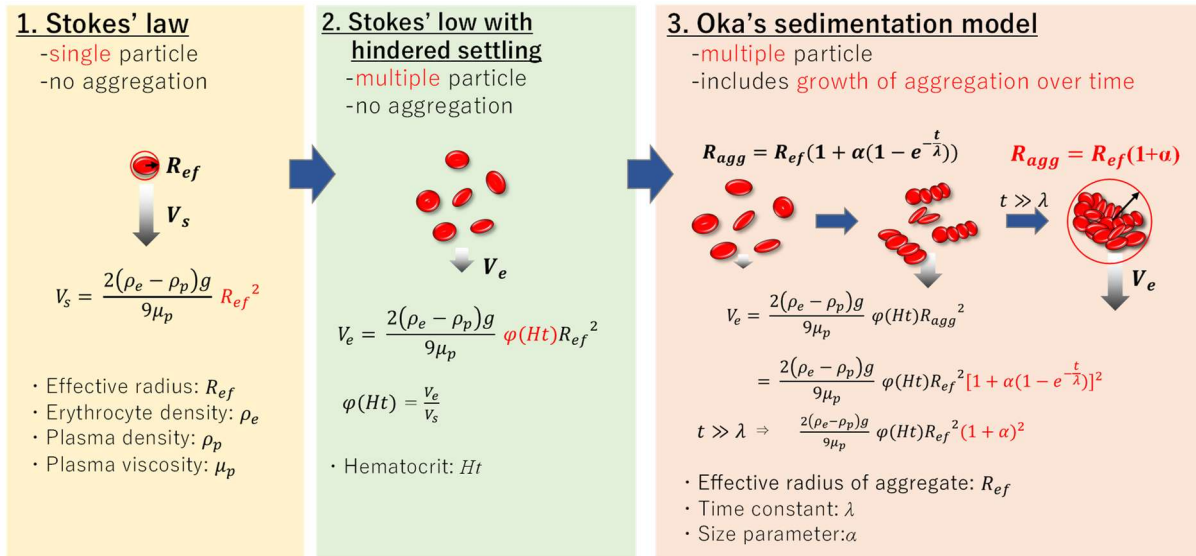


Fig. 2. 2 Review of Formulae Describing ESR.

血液等の濃厚な粒子群における沈降速度  $V_e$  においては、先に述べた干渉沈降効果のため減速される。この減速効果の係数  $\varphi$  は Eq.(2.3) で定義され、コロイド系における種々の関数が報告されているが(78,79)、現在最も有名なものは Richardson と Zaki により報告されている Eq.(2.4) である(79)。ESR のような低レイノルズ数の条件においては  $n = 4.65$  とされている。

$$\varphi(Ht) = \frac{V_e}{V_s} \quad \text{Eq. (2.3)}$$

$$\varphi(Ht) = (1 - Ht)^n \quad \text{Eq. (2.4)}$$

$$V_e = \frac{2(\rho_e - \rho_p)g}{9\mu_p} \varphi(Ht) R_{ef}^2 \quad \text{Eq. (2.5)}$$

この干渉沈降効果を含むように修正された Stokes 式は Eq.(2.4) となるが、この式では赤血球凝集は考慮されておらず、かつ ESR で見られる時間経過に対するシグモイド状の沈降曲線とはならない。Oka は、赤血球凝集があるときの粒子の有効径  $R_{agg}$  [m] を用いて  $V_e$  を Eq.(2.6) および Eq.(2.7) で記述した(74)。

$$V_e = \frac{2(\rho_e - \rho_p)g}{9\mu_p} \varphi(Ht) R_{agg}^2 \quad \text{Eq. (2.6)}$$

$$R_{agg} = R_{ef}(1 + \alpha(1 - e^{-\frac{t}{\lambda}})) \quad \text{Eq. (2.7)}$$

ここで  $\alpha$  は赤血球凝集のサイズパラメータ、 $\lambda$  は時定数[s]である。時間  $t = 0$  では凝集が発生して

いないため、有効径は単一赤血球の有効径  $R_{ef}$  に一致し、時間  $t$  が小さい時には連鎖・凝集が急峻に進み、凝集塊の有効径の増加速度が大きい状態を表し、その後は時間と共に凝集塊の成長速度が低下する様子を表している。以上より、沈降の初期フェーズにおいて、時間  $t$  における沈降速度は Eq.(2.8) で表される。

$$V_e = \frac{2(\rho_e - \rho_p)g}{9\mu_p} \varphi(Ht) \left[ R_{ef} \left\{ 1 + \alpha(1 - e^{-\frac{t}{\lambda}}) \right\} \right]^2 \quad Eq.(2.8)$$

赤血球凝集サイズの増加は時間の経過とともに収束し、ある時間後には等速沈降状態となる。凝集した状態における有効径は  $R_{ef} (1+\alpha)$  であり、この時の等速沈降速度は、Eq.(2.9) と記述できる。

$$V_e = \frac{2(\rho_e - \rho_p)g}{9\mu_p} \varphi(Ht) [R_{ef}(1 + \alpha)]^2 \quad Eq.(2.9)$$

Mayer は Eq.(2.8) を積分し、連鎖形成期(第一のフェーズ)から等速沈降期(第二のフェーズ)における沈降距離  $h_{1,2}$  [m] を Eq.(2.10) にて得ている。

$$h_{1,2} = \int_0^t V_e dt = \frac{2(\rho_e - \rho_p)g}{9\mu_p} \varphi(Ht) R_{ef}^2 \alpha g \left[ (1 + \alpha)^2 t + \alpha \lambda \left\{ (2\alpha + 2)e^{-\frac{t}{\lambda}} - \frac{\alpha}{2} e^{-\frac{2t}{\lambda}} - \frac{3}{2}\alpha - 2 \right\} \right]^2 \quad Eq.(2.10)$$

ただし、上式における  $t$  の最大値は、等速沈降期(第二のフェーズ)から堆積期(第三のフェーズ)に切り替わる遷移時間  $\tau$  である。Mayer は、この遷移時間  $\tau$  と等速沈降速度  $V_e$  の関係を実験にて求め、Eq.(2.11) で表されることを報告した(75)。

$$\tau = 10.317V_e^{-0.57} \quad Eq.(2.11)$$

Mayer は堆積期における沈降速度の減速と最大沈降距離  $h_\infty$  を反映した沈降距離  $h_3$  [m] を Eq.(2.12) にて記述し、 $h_\infty$  はヘマトクリットおよび  $\alpha$  と Eq.(2.13) の関係があるとした(75)。

$$h_3(t) = h_\infty - [h_\infty - h(\tau)] \exp \left[ \frac{V_e(\tau)}{h_\infty - h(\tau)} (\tau - t) \right] \quad Eq.(2.12)$$

$$h_\infty = 102(1 - 0.8Ht)\alpha^{0.2} \quad Eq.(2.13)$$

以上のように先行研究の積み重ねによって、3つのフェーズにおける赤血球の沈降速度とシグモイド状の沈降曲線の計算式が構築されてきた。

### 2-1-2. 赤血球沈降速度の迅速測定と諸問題

Westergren 法による ESR 測定の最大の課題は, 1 時間という測定時間の長さにあった(74). 現在, 臨床検査室に普及している ESR 測定装置では, チューブに傾斜をつけ沈降速度を加速させる Boycott 効果(80,81)を用いたものが多くを占める. これは, Fig. 2. 3 に示すように赤血球が沈降する際に生じる血漿の上昇流が傾斜させたチューブの上側面を流れる層が形成されることにより, 干渉沈降が抑制され, 沈降速度が増加するものである. この測定技術は modified Westergren 法に分類され(57), 測定時間は 20~30 分程度である. さらに近年では, syllectometry (1-7-3 参照)(59)を利用し, 赤血球凝集を測定することで, ESR を 1 分以下で推定する製品も使用されている(63,64).

しかしながら, syllectometry を利用した ESR の迅速測定手法は, Westergren 法に基づく測定法で得た値 (WG ESR) と比較して十分な一致を得られているとは言い難い(82,83). 国際標準化団体である International Clinical Standardization for Hematology (ICSH)は, syllectometry による測定法を alternate method と分類し, ESR 測定手法間の差異について注意喚起を行っている(57). このような syllectometry と Westergren 法による ESR 値の乖離の理由としては 2 つの要因が考えられる. 第一の要因は, 1-5 および 2-1-1 で述べたように, ヘマトクリットが 3 つの沈降フェーズに影響を与える(38,72)と同時に, syllectogram に対しても異なるメカニズムと大ききで影響を与える(39,40,84)ことである. つまり, syllectogram だけでは, 赤血球の凝集, 干渉沈降, 堆積の影響を区別することができない. ゆえに, syllectogram, 干渉沈降, 最大沈降距離それぞれに対してヘマトクリットによる補正が必要である. 2 つ目の理由は, 凝集パラメータはヘマトクリットだけでなく測定時間によっても ESR との関係性が大きく変化することである(40,63). したがって, syllectogram に対するヘマトクリットの影響と, 測定時間の影響を同時に調査し, 最適な測定時間の決定およびヘマトクリットの影響の補正を行い, ESR を計算する必要がある.

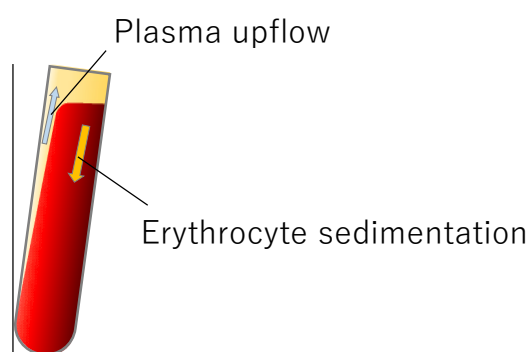


Fig. 2. 3 Illustration of Boycott Effect.

### 2-1-3. 本章の目的および概要

本章では, syllectometry を用いた迅速 ESR 測定法の課題である, ヘマトクリットと解析時間の凝集パラメータへの影響の調査およびその補正と, これまでに未知であった syllectometry で得た凝集パラメータと沈降速度との関連性の解明を実施し, 迅速かつ正確な ESR 測定手法の開発を目的とした. まず, 粒子の沈降理論と実験式に基づいた沈降曲線式を示し, その沈降曲線式中において ESR 計算に必要な変数 (沈降パラメータとする) を示す. 次に, ヘマトクリットを固定した

条件において, syllectogram から得た凝集パラメータと, Westergren 法にて得た沈降パラメータの相関性が強くなる syllectogram の測定時間を調査した. さらに, 凝集パラメータに対するヘマトクリットの影響を調査し, 幅広い沈降速度で適用可能な syllectogram のヘマトクリット補正式を定義した. そして, ヘマトクリット補正した凝集パラメータを用いて沈降パラメータを回帰式にて求め, 粒子の沈降速度論に基づき ESR の沈降曲線を計算し, Westergren 法の結果と比較を行った.

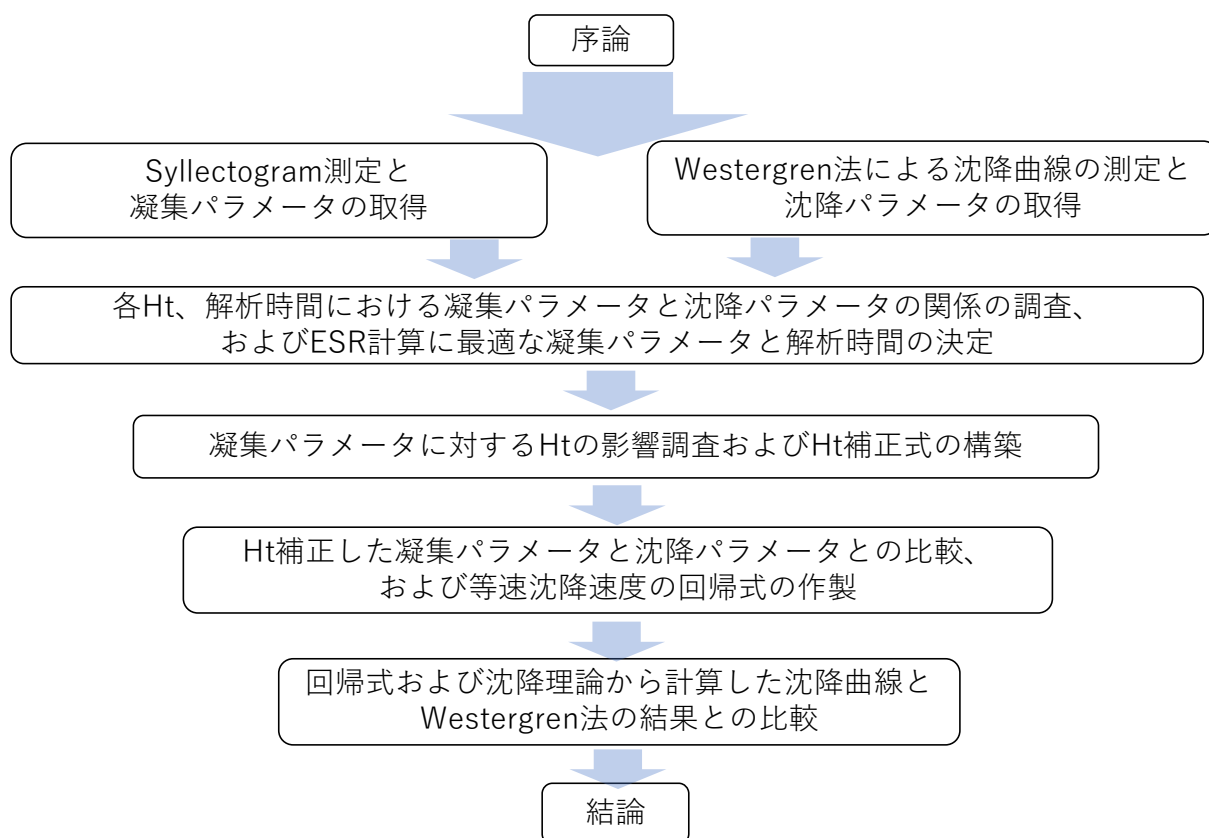


Fig. 2. 4 Outline of the Chapter 2.

## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 沈降曲線式

本実験では, syllectogram で得た凝集パラメータから赤血球の沈降曲線を計算するため, 2-1-1 に示したように凝集期から等速沈降期における沈降曲線 $h_{1,2}$  ( $t \leq \tau$ )と, 堆積期における沈降曲線 $h_3$  ( $\tau < t$ )の計算に以下の式を用いた (Fig. 2.5).

$$h_{1,2} = \int_0^t V_e dt = \frac{2(\rho_e - \rho_p)g}{9\mu_p} \varphi(Ht) R_{agg}^2 \left[ (1 + \alpha)^2 t + \alpha \lambda \left\{ (2\alpha + 2)e^{-\frac{t}{\lambda}} - \frac{\alpha}{2} e^{-\frac{2t}{\lambda}} - \frac{3}{2}\alpha - 2 \right\} \right]^2 \quad Eq. (2.10)$$

$$\tau = 10.317V_e^{-0.57} \quad Eq. (2.11)$$

$$h_3 = h_\infty - [h_\infty - h(\tau)] \exp \left[ \frac{V_e(\tau)}{h_\infty - h(\tau)} (\tau - t) \right] \quad Eq. (2.12)$$

$$h_\infty = 102(1 - 0.8Ht)\alpha^{0.2} \quad Eq. (2.13)$$

$$\varphi(Ht) = (1 - Ht)^n \quad Eq. (2.4)$$

上式のパラメータについて, 成人健常者における文献値を参考にし,  $\rho_e = 1100$  [kg/m<sup>3</sup>] (85),  $\rho_p = 1025$  [kg/m<sup>3</sup>] (86),  $R_{ef} = 3.084 \times 10^{-6}$  [m] (75),  $\mu_p = 1.67 \times 10^{-3}$  [Pa·s] (87)とした.  $n$ は低レイノルズ数で使用される 4.65を用いた (79).

以上より, 等速沈降速度  $V_e$ , サイズパラメータ  $\alpha$ , 時定数  $\lambda$  (これらに ESR および  $V_s$  を含め沈降パラメータとする) およびヘマトクリットを用いて, シグモイド状の沈降曲線と ESR を計算することができる. なお, 本実験にて用いるサイズパラメータ  $\alpha$  は, Eq. (2.9) から求めた Eq. (2.14) を用いて計算することとした. すなわち, あるヘマトクリット条件下にて, 沈降曲線または syllectometry から等速沈降速度  $V_e$  が得られれば, Eq. (2.14) にてサイズパラメータ  $\alpha$  の実測値または推定値を計算できる.

$$\alpha = \sqrt{\frac{9\mu_p V_e}{2gR_{oef}^2 (\rho_e - \rho_p)(1 - Ht)^n}} - 1 \quad Eq. (2.14)$$

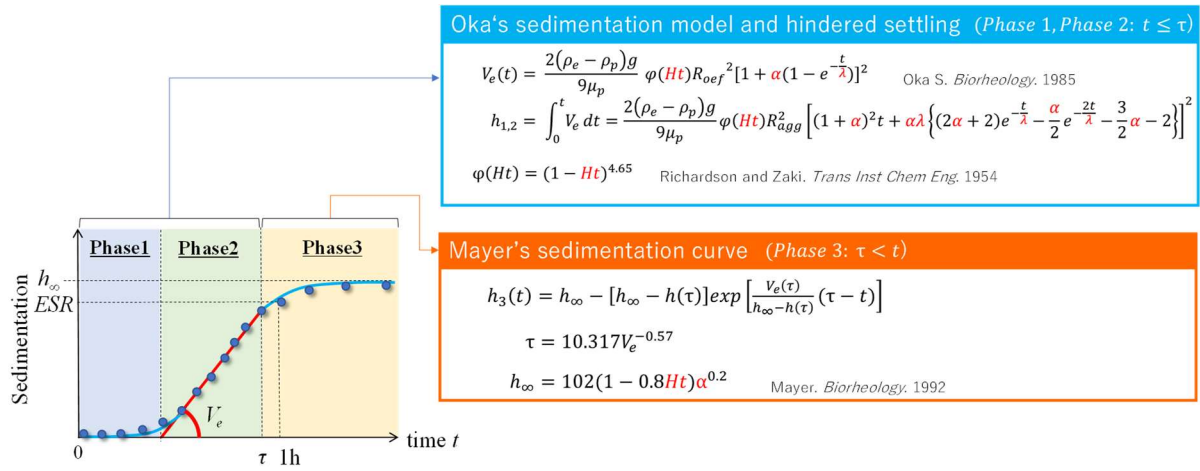


Fig. 2. 5 Sedimentation Formulae Used in the Experiment.



## 2-2-2. 測定試料の作製

実験は日本光電工業株式会社の倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に基づいて行われた(承認番号 ER67-09)。健康なボランティア 2 名(成人男性)から書面にて同意を得た後、21G の採血針 (Terumo Corp., Tokyo, Japan) とシリンジを使用して静脈血を抗凝固剤として K2-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 入りの採血管 (Sekisui Medical Corporation, Tokyo, Japan) に採取した。赤血球凝集能は個人差が大きく、被験者数を増やすとヘマトクリットとフィブリノゲン濃度以外の因子による影響が大きくなり、本実験で目的とするヘマトクリットの影響を補正した ESR 計算式の構築が難しくなるため、被験者数は限定した。Fig. 2.6 に試料作成の概略図を示す。採取した血液を  $1,697\times g$  で 10 分間遠心分離し、血球と血漿を分離した。沈降速度を幅広く促進させた検体を得るため、血漿にそれぞれ 0.4, 0.8, 1.2 g/dL のウシフィブリノゲン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を加えおだやかに混和し、十分溶解させてフィブリノゲンスパイク試料 (Fib+, Fib++, Fib+++) を調製した。血漿またはスパイクした血漿試料と分離した血球を混合し、フィブリノゲンスパイク条件毎に 4 種類のヘマトクリット (25%, 30%, 35%, 40%) の血液試料を調製した。調整した試料を血球計数器(MEK-1305: Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan) にて測定し、ヘマトクリットの測定値とターゲット値の差分が $\pm 1\%$ 以内であることを確認した。採血したサンプルは室温で保管し、採血後 6 時間以内に実験に供した。

## Sample preparation

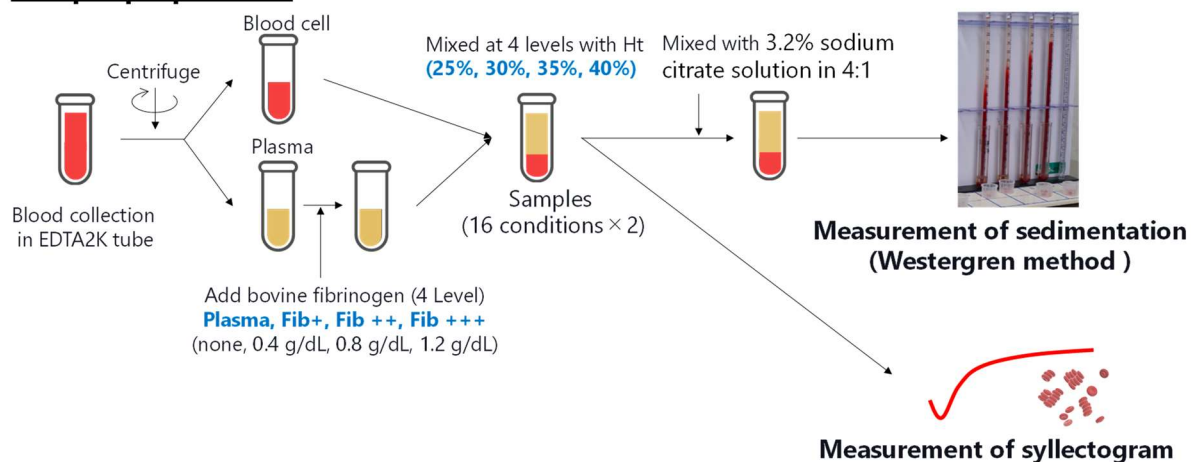


Fig. 2. 6 Schematic Illustration of the Sample Preparation.

### 2-2-3. Westergren 法による沈降曲線の測定と沈降パラメータの決定

Westergren 法による ESR 測定に際して、血液試料の調整と測定を、CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) Guideline H02-A5 (88) に則り、以下に示す通り実施した。採血した血液と 3.2% クエン酸ナトリウム水溶液を 4:1 にて混合し、試料容器を 12 回転倒混和した後、Fig. 2.7 に示すように ESR 測定用の台 (AS ONE Corporation, Osaka, Japan) に垂直に設置したプラスチック製の Westergren 管 (内径 2.55 mm, 最大スケール 200 mm, Terumo Corporation, Tokyo, Japan) に血液試料を吸引し静置した。沈降曲線の観測に関しては、沈降が観測されるまでは 1 分毎に、沈降開始後は 1 分または 10 分毎に血球の沈降距離を目視およびカメラ (ILCE-6400: Sony Corporation, Tokyo, Japan) で撮影した画像から 0.5 mm 単位で読み取った。環境温度は  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  にて実施した。60 分後における沈降量を Westergren 法による ESR 測定値 (WG ESR<sub>1h</sub>) [mm/h] とした。測定時間  $t = 15$  min から 60 min における沈降距離に対して、最小二乗法による回帰直線から沈降速度  $V_e$  [m/s] を求めた。ただし、沈降速度が非常に遅く、遅延時間が 15 分以上である場合や、沈降速度が非常に速く堆積期の影響により 60 min 未満で直線から外れる場合には、直線関係になる範囲内 (決定係数  $r^2 > 0.9$ ) で解析データ点を選択した。また、赤血球凝集のサイズパラメータ  $\alpha$  の実測値に関しては、沈降曲線から求めた  $V_e$  と Eq.(2.14) を用いて計算した。実験にて得た沈降距離のプロットに対し、Eq.(2.9) の沈降曲線をフィッティングし、時定数  $\lambda$  を求めた。ただし、 $V_e$  が 0.1 mm/min 以下のデータは、目盛りの読み取り誤差が大きくなり、 $\lambda$  を正確に求めることができないため解析からは除外した。また、Eq.(2.3) と Eq.(2.4) より、単独の赤血球凝集塊の沈降速度  $V_s$  を Eq.(2.15) にて求めた。

$$V_s = \frac{V_e}{(1 - Ht)^n} \quad \text{Eq. (2.15)}$$

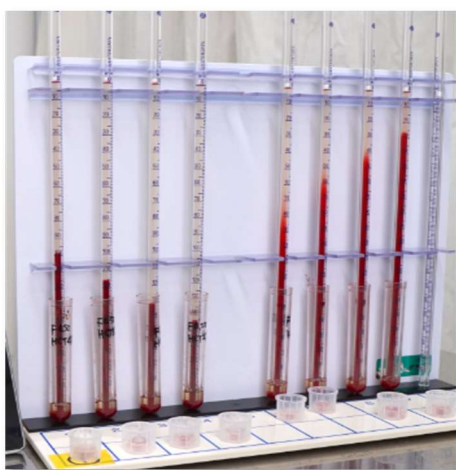


Fig. 2. 7 ESR Measurement by the Westergren Method.

#### 2-2-4. Sylllectogram 測定装置と凝集パラメータの計算

Sylllectogram 測定に使用した分析装置(全自動血球計数・赤血球沈降速度測定器 MEK-1305: Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan) の外観図を Fig. 2.8 に, 測定部の概略図を Fig. 2.9 に示す. 本装置は sylllectometry に基づく ESR 測定と CBC 測定を同時に行うことができる製品である. 測定を開始すると, 装置のノズルにて 80  $\mu\text{L}$  の血液が吸引され, そのうちの 60  $\mu\text{L}$  が sylllectogram 測定ユニットに接続されたリザーバーに分注される. サンプルはポンプで測定用のガラスセル(流路内断面寸法 0.83  $\times$  0.83 mm) に吸引される. 波長 870 nm の LED とシリコンフォトダイオードがガラスセルを挟んで水平方向に向かい合うように 2 組配置されている. 2ch の検出器の間隔は約 9 mm, 測光穴径は 0.5 mm である. この二重の検出器の差分を確認することにより, 片方の測光経路に偶発的にまぎれる気泡の影響を除去することができる. ガラスセルは 37°C に温度調整されたアルミブロック内にあり, ガラスセル内の血液試料は赤血球凝集測定に最適な 37°C に加温される. 赤血球の凝集を解離させるため, ポンプを用いてガラスセル内を流速 29.7  $\mu\text{L}/\text{s}$  で往復させたのち, バルブにより瞬時に流速が遮断される. 本条件におけるガラスセル内の流れのレイノルズ数は約 24 であり, 層流とみなせる. 赤血球凝集測定のためには, 十分なせん断速度が負荷されている必要があるが, 平均流速  $v_m$  と流路径  $d$  で簡易的に計算される壁面せん断速度  $\gamma_w = 6 v_m/d$  [ $\text{s}^{-1}$ ] では, 赤血球の乖離に必要なせん断速度は 200  $\text{s}^{-1}$  程度とされている(20). また, 赤血球の変形が顕著となるせん断速度は 1000  $\text{s}^{-1}$  以上とされる(20). 本装置における壁面せん断速度 335  $\text{s}^{-1}$  は, 赤血球の解離が行われ, かつ変形の影響が無いものである. これは, 過去の類似の実験系(89)で用いられている条件と比較しても十分に大きい. 血液サンプルを透過した LED 光は, 流速停止から 120 s の間, サンプリング周期 10 ms で 12 bit の AD 変換により記録した. 2ch の検出器において気泡による影響が無いことを確認し, それぞれの凝集パラメータの平均値を 1 つの測定値として求めた. 同時に, 残りの 20  $\mu\text{L}$  のサンプルは CBC 測定用のチャンバに分注され, ヘマトクリットを含む CBC を測定し, ヘマトクリットのターゲット値に対して差分が  $\pm 0.01$  以内であることを確認した. CBC 測定ユニットは一般的な電気抵抗法に基づくものであり, 市販製品にてすでに性能評価済みである(90). サンプル吸引からの測定はすべて 3 重に行い, 3 回の平均値を使用した.

Sylllectogram を解析して得られる凝集パラメータは 1-7-3 に述べたように複数あるが, 本研究ではロバスト性のある技術開発を目的とし, 過去の報告例が多く, かつ無次元数で装置の測光感度の影響を受けないメリットを有する Aggregation Index (AI) を用いることとした (Fig. 1. 14 および Fig. 2. 9). 測定時間が 5, 10, 30, 60, 120 秒の sylllectogram から算出した AI をそれぞれ,  $\text{AI}_5$ ,  $\text{AI}_{10}$ ,  $\text{AI}_{30}$ ,  $\text{AI}_{60}$ ,  $\text{AI}_{120}$  とした.



Fig. 2. 8 Automated Hematology and ESR Analyzer MEK-1305 (Nihon Kohden Corporation).

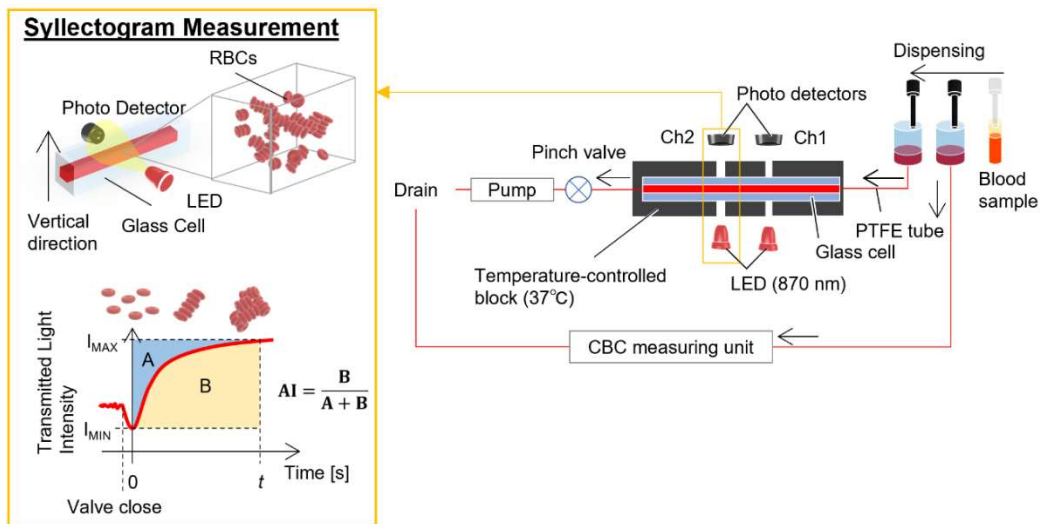


Fig. 2. 9 Experimental Apparatus and Aggregation Parameters.

## 2-3. 結果および考察

### 2-3-1. 測定時間が沈降速度と Aggregation Index の関係に与える影響および最適な測定時間の決定

AI を用いた ESR の計算のためには、測定時間が AI に及ぼす影響を明らかにし、最適な測定時間を決定する必要がある。Fig. 2. 10 に4条件の測定時間 (5, 10, 30, 60 s) おける等速沈降速度  $V_e$  と AI の関係を示す。なお、測定時間 120 s では、赤血球沈降による透過光強度の著しい増加により syllectogram が正しく得られなかったため、データ解析からは除外した。測定時間 5 s と 10 s においては、全てのヘマトクリットにおいて、沈降速度に対して AI は増加傾向であり、過去に報告されている AI とも同様の傾向であった(63)。この結果は、AI 赤血球凝集速度を反映するパラメータであることから、赤血球凝集サイズの増加とともに  $V_e$  が増加したことを示している。測定時間が長いほど AI は増加する傾向にあり、測定時間 30 s および 60 s では、いずれのヘマトクリット条件においても、おおよそ沈降速度が 1 mm/min までは AI が増加したが、それ以上ではほぼ一定となった。この測定時間が AI に与える影響の考察を次に述べる。5 s 以下においては、連鎖形成が急速に進み透過光強度変化への寄与が大きい(39,61)、時間が経過すると共に凝集反応は収束し、透過光強度の変化は小さくなる。そのため、測定時間が 30 s 以上で AI を算出した場合、syllectogram の下側の面積が占める割合が多くなり、AI が増加すると同時に、5 s 以下に含まれる連鎖形成による情報量が相対的に減衰し、凝集速度に対する感度が低下してしまったと考えられる。次に、Table 2. 1 に各測定時間における WG ESR<sub>1h</sub> および沈降パラメータ ( $V_e$ ,  $\alpha$ ,  $\lambda$ ) と AI との相関係数を示す。各ヘマトクリットにおける WG ESR<sub>1h</sub> と AI の相関係数は、測定時間が短いほど増加する傾向にあったが、測定時間 5 s においてもそれほど高くはなかった ( $r = 0.697$ )。これは、ヘマトクリットが AI と  $V_e$  に大きく影響しているためである。各ヘマトクリットにおける AI と沈降速度  $V_e$  およびサイズパラメータ  $\alpha$  との相関係数は、測定時間が短いほど高く、5 s と 10 s において非常に強い正の相関を示した。同様に、時定数  $\lambda$  に関しても、ヘマトクリット 25% と 30% において、測定時間 5 s および 10 s において強い負の相関を示す傾向であったが、ヘマトクリット 35% と 40% では相関が弱かった。この結果より、沈降パラメータと強い相関を示した測定時間 5 s または 10 s が、AI を用いた ESR の計算に適した測定時間であると考えられる。

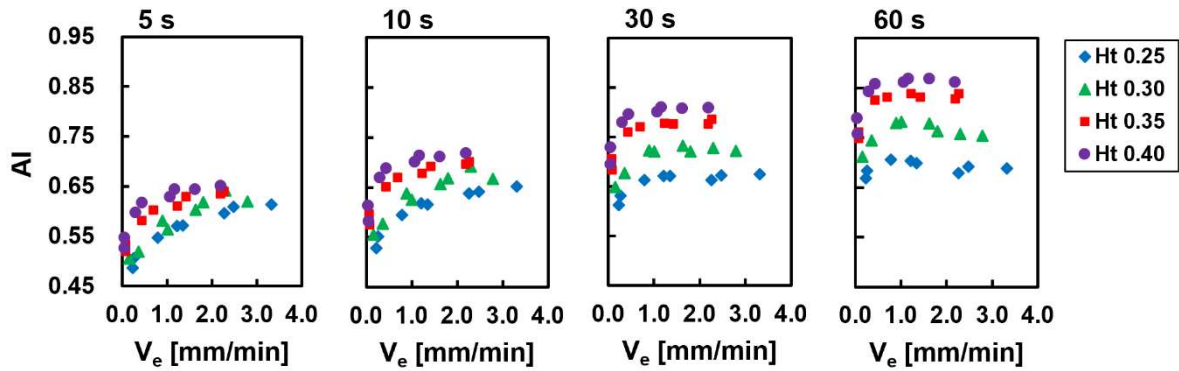


Fig. 2.10 Relationship between the Sedimentation Velocity ( $V_e$ ) and AI for Each Measurement Time at Each Ht.

Table 2.1 Correlation Coefficients between the Sedimentation and AI.

		$AI_5$	$AI_{10}$	$AI_{30}$	$AI_{60}$
<b>WG ESR<sub>1h</sub></b>		0.697	0.551	0.119	-0.081
<b>Sedimentation velocity <math>V_e</math></b>	<b>Ht 0.25</b>	0.934	0.909	0.729	0.081
	<b>Ht 0.30</b>	0.924	0.902	0.739	0.349
	<b>Ht 0.35</b>	0.905	0.875	0.781	0.711
	<b>Ht 0.40</b>	0.844	0.812	0.748	0.709
<b>Size parameter <math>\alpha</math></b>	<b>Ht 0.25</b>	0.979	0.964	0.823	0.207
	<b>Ht 0.30</b>	0.962	0.954	0.844	0.504
	<b>Ht 0.35</b>	0.967	0.948	0.880	0.829
	<b>Ht 0.40</b>	0.933	0.909	0.860	0.832
<b>Time constant <math>\lambda</math></b>	<b>Ht 0.25</b>	-0.972	-0.979	-0.899	-0.357
	<b>Ht 0.30</b>	-0.753	-0.717	-0.551	-0.236
	<b>Ht 0.35</b>	-0.351	-0.300	-0.160	-0.073
	<b>Ht 0.40</b>	-0.426	-0.377	-0.331	-0.319

### 2-3-2. Aggregation Index に対する Ht の影響とその補正

前項の結果はヘマトクリットが固定された条件であるため、AIを用いてのESRの計算には、ヘマトクリットがAIに与える影響の調査と、その補正が必要となる。Fig. 2.11(a)に示すように、全ての測定条件においてヘマトクリットの増加に対してAIは増加した。このようなAIのヘマトクリット依存性は、過去の報告と同様の傾向であった(39)。すでに示したように、Fig. 2.10 および Table 2.1 に示す結果から、AIが赤血球凝集サイズを反映しているのは明らかである。しかし、同一のフィブリノゲン添加濃度において、ヘマトクリットの増加に伴いAIが増加するのは、ヘマトクリットの増加が実際の凝集サイズを減少させる事実(38,72)と矛盾する。従って、ヘマトクリットの増加に伴うAIの増加は、実際の赤血球凝集サイズの増加を示しているのではなく、最終的な凝集サイズが減少することにより、凝集の成長が早期に収束し、見かけのAIが増加していると考えられる。そして、このヘマトクリットの増加による見かけのAIの増加を、幅広い沈降速度の範囲、すなわち、本実験条件における全てのフィブリノゲン添加濃度において補正することができれば、正確なESRの計算が可能になると考えられる。各測定時間における、ヘマトクリットの増分に対するAIの増分を、 $\Delta AI/\Delta Ht$ としてFig. 2.11(b)に示す。フィブリノゲン添加濃度が $\Delta AI/\Delta Ht$ に与える影響は、測定時間5s、10sにおいて小さく、30sと60sにおいて大きい結果となった。また、各測定時間におけるAIとヘマトクリットの相関係数は、Fig. 2.11(c)に示すように、いずれの測定時間においても非常に高い値を示していたことから、AIはヘマトクリットに対してほぼ線形増加することがわかる。これら結果と、2-3-1で示したように、沈降パラメータとAIの相関係数が5sにて最も良好であったことを考慮し、測定時間5sのAIに対してヘマトクリットによる影響を補正し、ヘマトクリット40%の条件に補正したAIとして、Hematocrit compensated aggregation index (HAI)をEq.(2.15)にて定義することとする。

$$HAI = AI_5 - k(Ht - 0.40) \quad Eq.(2.15)$$

ここで、 $k$ は補正係数であり、 $\Delta AI/\Delta Ht$ の平均値として得た $k = 0.284$ を用いることとする。従来のAIでは血漿タンパクの影響とヘマトクリットによる影響を含み、それらを区別することができなかったが、HAIを用いることにより、様々なヘマトクリットにおいても血漿タンパク由来の赤血球凝集能を比較することができると考えられる。

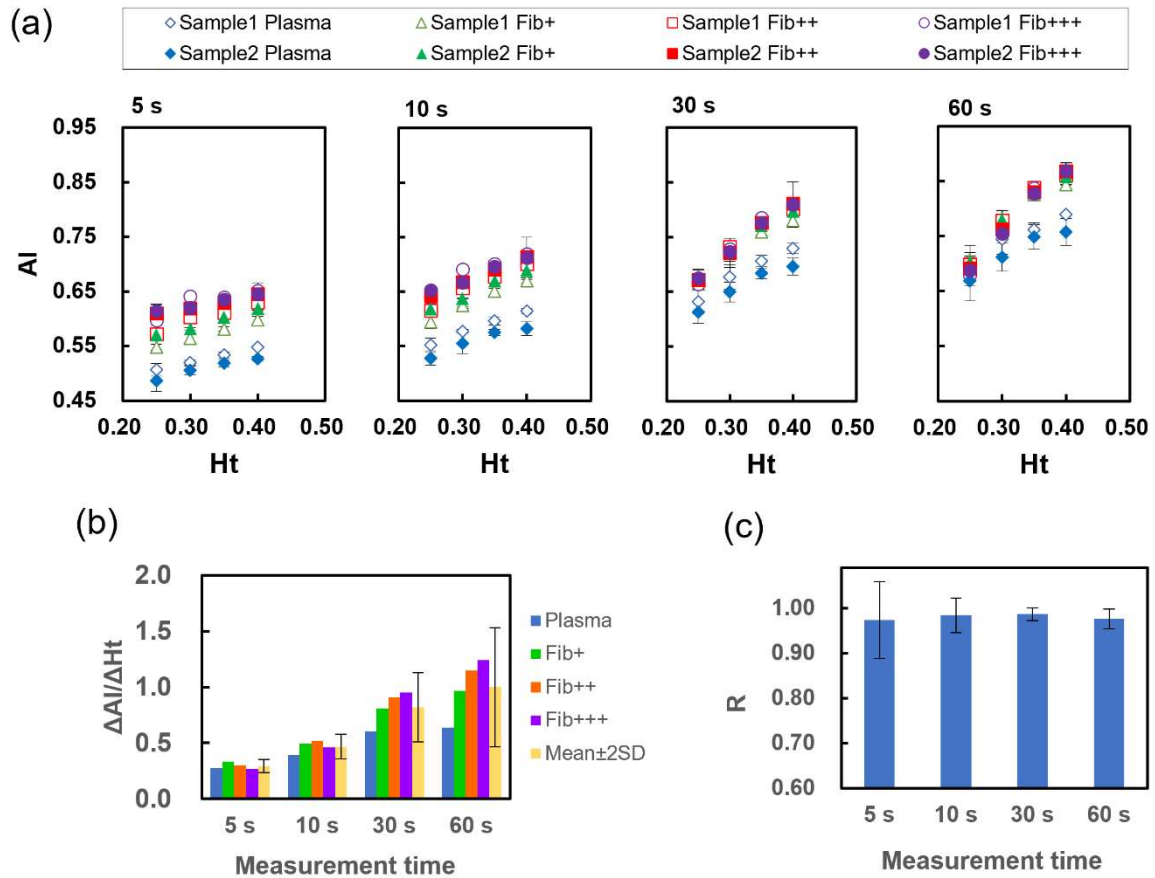


Fig. 2. 11 Analysis of the Dependence of the Ht on the AI for Each Measurement Time.

**(a)** Relationship between the AI and Ht for each sample at each measurement time. Error bars indicate 2SD ( $n = 3$ ). **(b)** The slope of the increase in the AI with the increase in the Ht ( $\Delta AI/\Delta Ht$ ) for each fibrinogen concentration at each measurement time. Error bars indicate 2SD among fibrinogen concentrations. **(c)** Average of the correlation coefficient between the AI and Ht for each sample. Error bars indicate SD ( $n = 4$ ).



### 2-3-3. 沈降パラメータとヘマトクリット補正した Aggregation Index の関係と回帰式の作製

Fig. 2. 12(a)に各ヘマトクリットにおける  $AI_5$  に対する  $V_e$  の関係を示す。各ヘマトクリットにおいて、 $V_e$  は  $AI_5$  の累乗関数的に増加しており、また、 $V_e$  はヘマトクリットの増加と共に干渉沈降の影響を受けて減少傾向を示している。2-3-2 示したように、 $AI_5$  はヘマトクリットの増加と共に見かけの AI が増加することにより、x 軸正方向にシフトしている。一方で、Fig. 2. 12(b)に示すように、ヘマトクリット補正された AI である  $HAI_5$  に対する  $V_e$  の関係は、ヘマトクリットによる AI の見かけの増加が補正され、x 軸方向のシフトがキャンセルされていることが確認できた。さらに、Fig. 2. 12(c)に示すように、 $V_e$  を干渉沈降係数  $\phi$  にて除して求めた単一凝集塊の沈降速度  $V_s$  は、ヘマトクリットによらず  $HAI_5$  を変数とする累乗関数に一致していた。また、Fig. 2. 12(d)に示すように、凝集塊のサイズパラメータ  $\alpha$  は、 $HAI_5$  の二次関数によく一致していた ( $r^2 = 0.911$ )。ここで、 $V_s$  は  $\alpha$  の二乗に比例することから、 $V_s$  を  $HAI_5$  の 4 次関数 (Eq.(2.16)) の回帰式で求めることとした。

$$V_s = a(HAI_5 - b)^4 + c \quad Eq.(2.16)$$

ここで、 $a$  は定数、 $b$  は  $HAI_5$  の最低値である。 $c$  は凝集のない時の沈降速度、すなわち Eq.(2.2)で求める沈降速度である。データフィッティングにて  $a$  と  $b$  を決定し、 $a=0.0541$ 、 $b=0.426$  とした。この回帰式を用いて  $V_s$  を計算し  $V_e$  を求め、Westergren 法で測定した沈降曲線から求めた  $V_e$  と比較した結果を Fig. 2. 13 に示す。構築した回帰式にて求めた  $V_e$  は、実測値と非常に高い相関を示した ( $r=0.940$ ,  $p<0.001$ )。

以上より、これまで未知であった *sylllectometry* によって得た凝集パラメータと沈降速度の関係性を明らかにすることに成功し、また、ヘマトクリット補正した AI は、Stokes 式に基づく沈降理論に組み込むことが可能であり、 $V_e$  を高い精度で計算するのに有効であると言える。なお、今回は詳細な沈降曲線から等速沈降速度を精密に算出したが、WG ESR<sub>1h</sub> を測定時間で除し、 $V_e$  と単位を揃えたものは、沈降曲線から算出した  $V_e$  とほぼ直線関係 ( $r = 0.990$ ) であり、かつその傾きは 0.778 であった。従って、今後の評価においては WG ESR<sub>1h</sub> から簡易的に  $V_e$  を取得することも可能である。

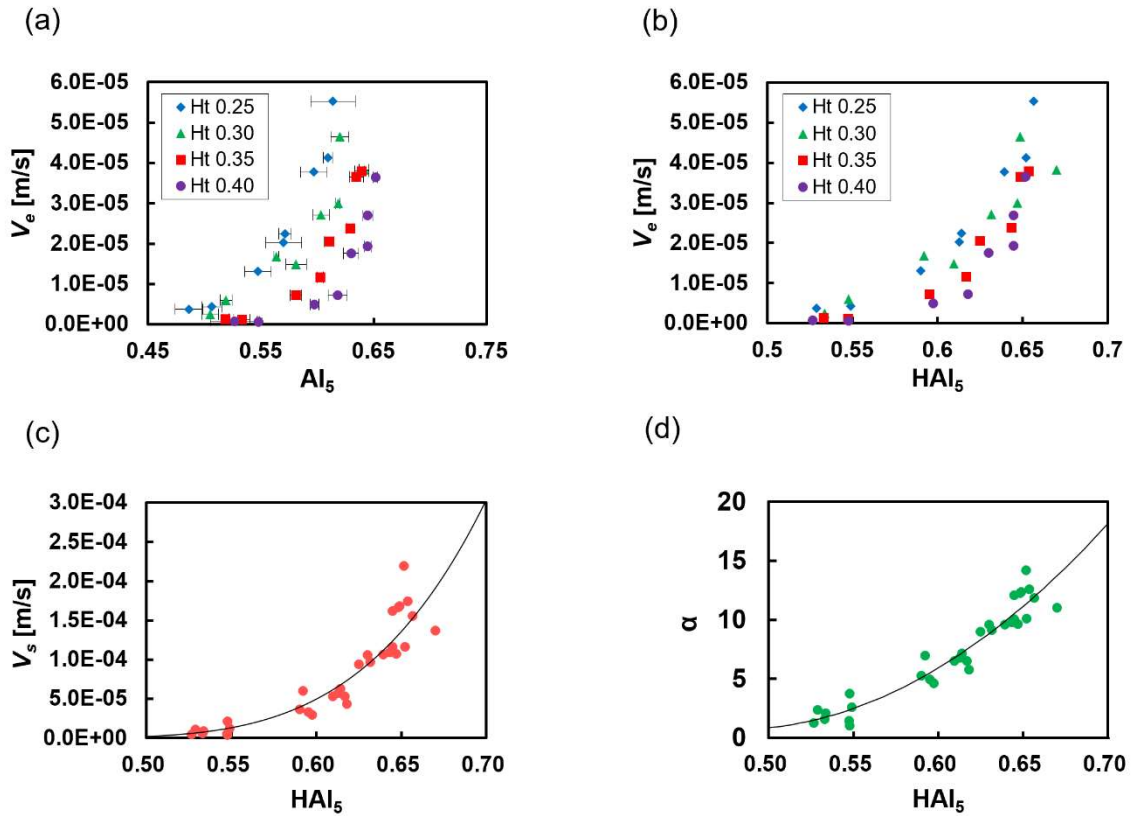


Fig. 2. 12 Analysis of the Relationship Between the Sedimentation Parameters and the Aggregation Parameters.

(a) Relationship between the AI obtained from a 5-s measurement and the erythrocyte sedimentation; the solid line shows the guide. Error bars indicate 2SD ( $n = 3$ ). (b) Relationship between the HAI obtained from a 5-s measurement and the erythrocyte sedimentation velocity. (c) Relationship between the HAI obtained from a 5-s measurement and the sedimentation velocity of an erythrocyte aggregate divided by the hindered settling effect. The solid line indicates the regression line. (d) Relationship between the HAI obtained from a 5-s measurement and the size parameter  $\alpha$ . The solid line indicates the regression line.

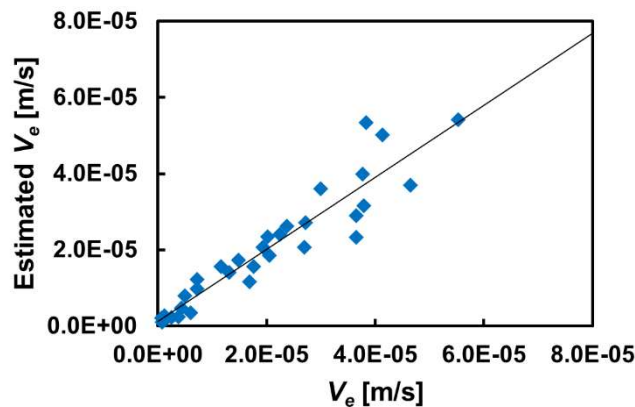


Fig. 2. 13 Comparison between the Sedimentation Velocity Obtained from the Westergren Method and the Value Estimated by the Regression Equation. Correlation coefficient,  $r = 0.940$  ( $n = 32$ ). The solid line indicates the regression line.

次に、 $HAI_5$ に対する、沈降曲線から求めた時定数 $\lambda$ の関係を Fig. 2. 14(a)に示す。各ヘマトクリットにおいて、 $HAI$ の増加とともに $\lambda$ が減少傾向にあり、ヘマトクリットの増加と共に $\lambda$ が増加する傾向が見られた。ただし、ヘマトクリット 25%と30%においてはおよそ線形減少とみられるが、ヘマトクリット 35%と40%においては沈降速度が非常に遅いため、フィッティングによる誤差が大きく、 $\lambda$ を正確に求めることは困難であった。 $HAI_5$ の増加とともに $\lambda$ が減少するのは、赤血球凝集速度が高いほど、沈降が開始する時間が早いことが考えられる。Fig. 2. 14(a)の関係性から、 $\lambda$ の回帰式を $\lambda = dHAI_5 + eHt + f$ で求めることとした。係数 $d$ は、ヘマトクリット 25%と30%の $HAI_5$ に対する $\lambda$ の傾きの平均値-0.816とし、係数 $e$ と $f$ に関してはデータフィッティングによりそれぞれ $e = 0.887$ 、 $f = 0.357$ とした。Fig. 2. 14(b)に回帰式にて求めた $\lambda$ と、測定した沈降曲線から求めた $\lambda$ の比較を示す。回帰式にて求めた $\lambda$ は、実測値と高い相関( $r = 0.850$ ,  $p < 0.001$ )を示しており、本手法にて $\lambda$ をある程度推定することが可能であることが示された。以上により、ヘマトクリットとAIの2つのパラメータを回帰式に代入することにより、等速沈降速度 $V_e$ 、サイズパラメータ $\alpha$ 、時定数 $\lambda$ を求め、沈降曲線およびWG ESR<sub>1h</sub>を計算することが可能となった。

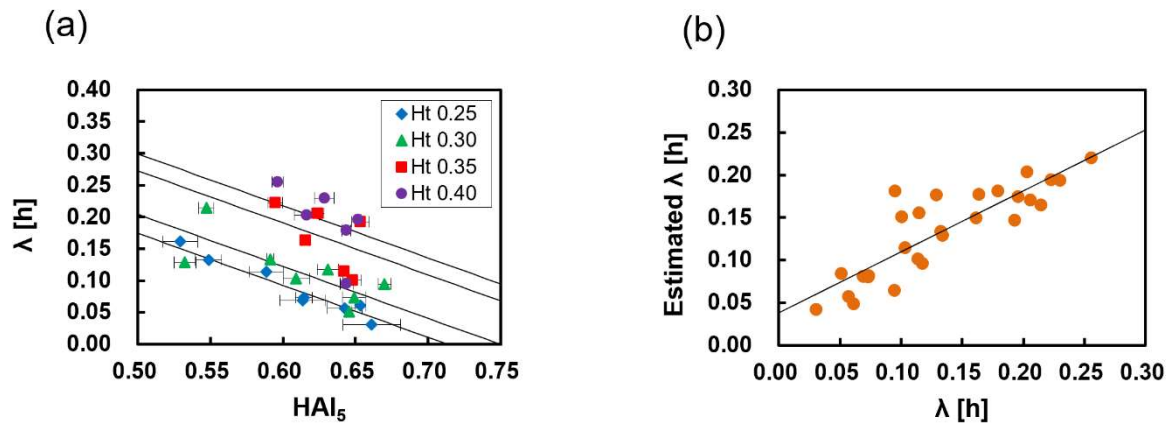


Fig. 2. 14 Analysis and Estimation of the Time Constant of the Sedimentation Curve.

(a) Relationship between the HAI obtained from a 5-s measurement and the time constant  $\lambda$ ; the solid line shows the guide. Error bars indicate 2SD ( $n = 3$ ). (b) Comparison between the time constant obtained from the sedimentation curve and the value estimated by the regression equation. The solid line indicates the regression line. Correlation coefficient,  $r = 0.851$  ( $n = 28$ ).

#### 2-3-4. Westergren 法にて得た沈降曲線と計算値の比較

Westergren 法で観測した沈降曲線と、本手法にて計算した沈降曲線、および Puccini らのフィッティングカーブの比較を Fig. 2. 15 に示す。ヘマトクリット 25%において、Puccini らの式で求めた値は等速沈降期から堆積期への移行付近において実測値よりもやや低くなったが、本手法による沈降曲線は、約 60 分までは実測値に近い形となった。一方で、ヘマトクリット 35%および 40%においては、60 分以降において本手法の値は実測値よりもやや高い結果となった。この結果は、Mayer が報告した遷移時間  $\tau$  の推定式の係数が、今回の条件では最適ではなかったことに起因している可能性がある。実際に、係数を調整すると精度が改善されることを確認している。しかし、臨床検査で必要となる 60 分後の沈降距離に限れば、本手法で十分に高い精度で計算可能であると言える。本手法にて 1 時間後における ESR ( $WG\ ESR_{1h}$ ) を求め、実測値と比較した結果を Fig. 2. 16 に示す。 $WG\ ESR_{1h}$  の計算値と実測値の間には非常に高い相関 ( $r=0.966$ ,  $p<0.001$ ) が認められた。これらの結果より、本手法は、これまでに報告されている手法(89,91)よりも短い、わずか 5 秒間の赤血球凝集測定を用いて、最低でも 60 分程度までの沈降曲線を精度高く推定可能であることが示された。また、幅広いヘマトクリットとフィブリノゲン濃度において適用可能である。本手法では *sylectogram* と同時にヘマトクリットの情報が必要となるが、今回使用した装置は、*sylectogram* の測定とヘマトクリットを含む CBC 測定の同時測定が可能であり、短い時間で ESR と CBC を同時測定することが可能である。実際に、使用した装置は類似の手法で ESR を計算しており、筆者と順天堂大学のグループは装置の臨床性能評価を報告しているが(92)、本研究は、基礎的かつ詳細な測定原理を実証するものである。しかしながら、ESR は様々な血漿タンパク、赤血球の形態の影響を受けるものであり、限られた血液サンプルのみでは、臨床的有用性を確認することはできない。よって、次のステップとして、様々な背景を有する臨床の血液検体を十分なサンプル数を用いて、本測定原理の妥当性評価を実施する必要がある。

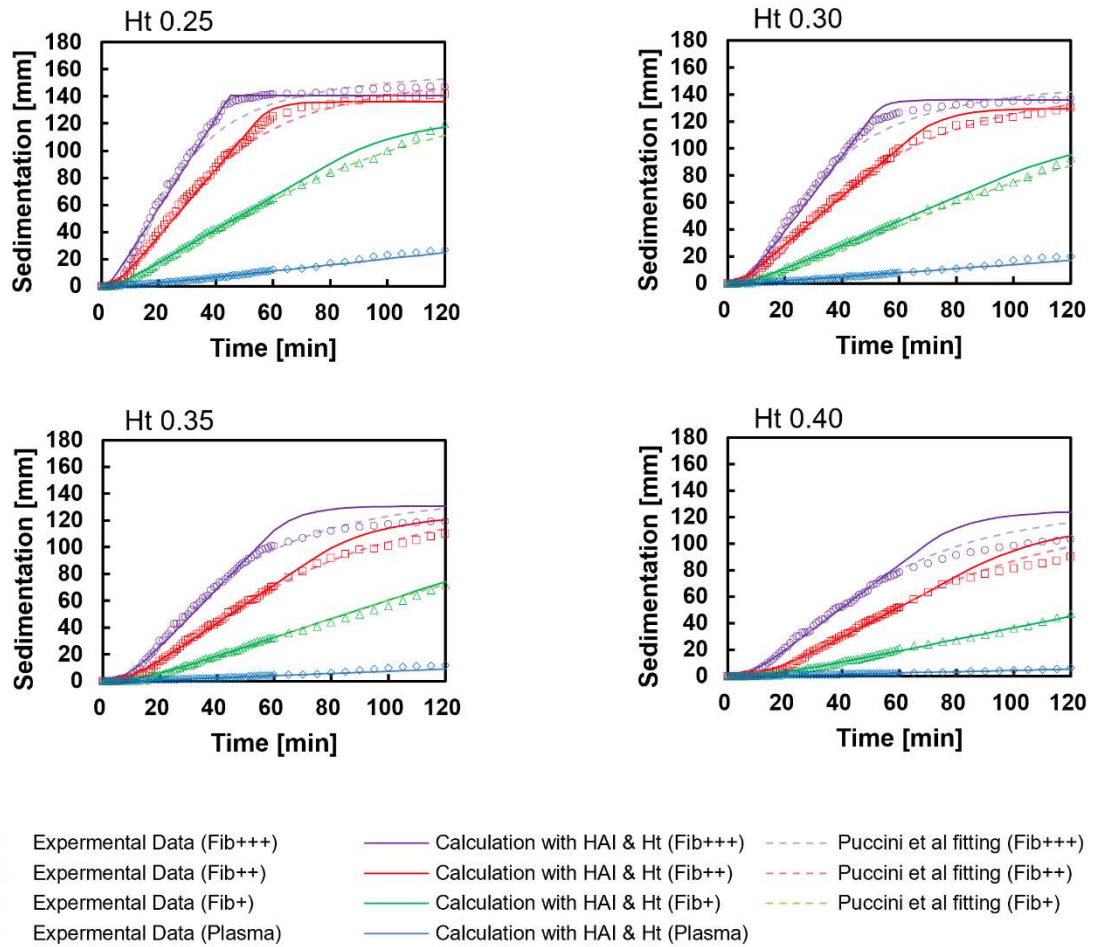


Fig. 2. 15 Comparison of Representative Sedimentation Curves for Each Sample. The plots indicate experimental data. The solid lines indicate the sedimentation curves calculated with the HAI and Ht. The dotted lines indicate Puccini's fitting curve.

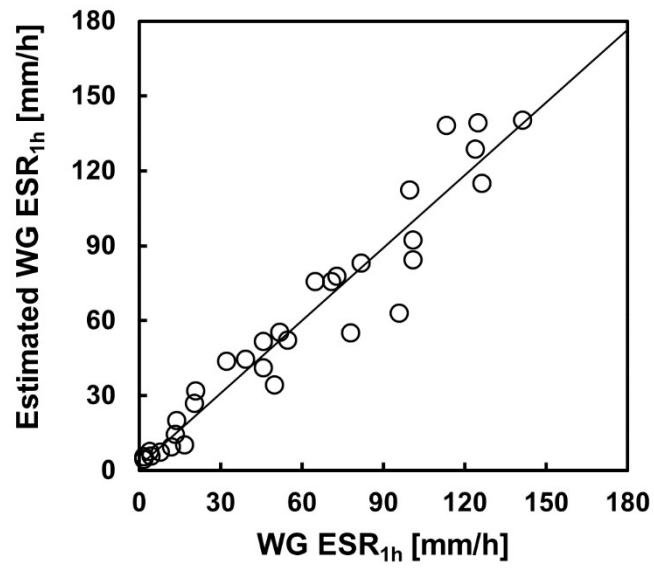


Fig. 2. 16 Relationship between the ESR at 60 min Obtained by the Westergren Method and the Estimated Value. Correlation coefficient,  $r = 0.966$  ( $n = 32$ ). The solid line indicates the regression line.

#### 2-4. 結論

本章では、短時間かつ正確な ESR の計算を行うため、光学的に測定した赤血球の Aggregation index (AI) に対する測定時間とヘマトクリットの影響を調査した。AI と沈降曲線における等速沈降速度および時定数の間の相関は、測定時間 5 s と 10 s で非常に高くなった。また、それらの測定時間において、ヘマトクリットの増加に対する AI の増加率がフィブリノゲン濃度に影響を受けなかったことから、測定時間 5 s の AI に対してヘマトクリットの影響を補正した AI である HAI を定義した。干渉沈降効果を除いて求めた単一凝集塊の沈降速度は、HAI の累乗関数によく一致しており、沈降曲線の時定数も HAI とヘマトクリットの線形回帰式で記述することができた。以上の結果をもとに、AI とヘマトクリットから計算された沈降曲線および 60 分後の ESR 値は、Westergren 法の値とよく一致した。



## 第3章 迅速赤血球沈降速度測定法の臨床評価と MCV 補正による 精度向上

本章では、第2章にて開発した、ヘマトクリット補正した赤血球凝集パラメータを用いた ESR の計算手法について、臨床検体による妥当性検証を行う。さらに、正確度を向上させるため MCV を用いた補正を行い、その効果を検証した。

利益相反 (Conflict of interest: COI) 等に関して：

本章で用いた臨床データは、2019年に日本光電工業株式会社が順天堂大学医学部臨床検査部に委託研究として依頼して得たものである。本章における解析は、筆者が本学博士課程に入学後に本研究室と日本光電工業株式会社との共同研究を締結した後に本学学生として実施したものである。本研究に関わる特許(特許7037324)は、発明者：筆者、出願人：日本光電工業株式会社として日本国内にて登録されている。日本光電工業株式会社から本研究室への資金および装置類の提供は無く、また、本研究に関する計画立案、および評価には関与していない。

### 3-1. 序論

第2章における実験は、限られた健常者の血液検体を用いて、ヘマトクリットとフィブリノゲン濃度を調整した実験を行うことによって、赤血球凝集に対するヘマトクリットとフィブリノゲン以外の影響因子を極力除き、ヘマトクリットの影響を補正する方法を確立するものであった。従って、ESR に影響を与える様々な血漿タンパク、赤血球形態、赤血球の膜電荷等を有する臨床検体に対する本手法の有効性は未知である。特に MCV は、Stokes の沈降速度式(73)における有効径に關与するパラメータであると推察される。MCV は主に赤血球に内包するヘモグロビン量に依存して変化し、正常範囲においても 80-100 fL のばらつきがある(93)。さらに、MCV は、鉄欠乏性貧血等においては 80 fL 以下を示し、巨赤芽球性貧血等においては 100 fL 以上を示すなど、幅広い値となる(93)。Stokes 式にて、沈降速度が粒子径の二乗に比例するため、赤血球を単純な球体として考えた場合には、沈降速度は体積の 2/3 乗に比例することになる。実際に、過去の研究において、同一の血漿成分を用いたサンプルにおいて、ESR が MCV の 2/3 乗に比例することが報告されている(94)。しかし、ヘマトクリットも血漿成分も異なる個々の血液検体において、MCV が ESR の計算値に与える影響とその補正を報告した研究はない。

そこで本章では、第2章にて開発したヘマトクリット補正した凝集パラメータを用いた ESR の計算手法の妥当性検証として、十分なサンプルサイズの臨床検体の *syllactogram* とヘマトクリットを測定し、第2章と同様の計算手法によって ESR を求め、Westergren 法との比較を行うことで本手法の妥当性を検証した。さらに、本手法の正確度向上を目的とし、MCV の影響を調査するとともに、Stokes の沈降速度式の有効径を MCV から求め、その改善効果を検証した。

### 3-2. 実験方法

#### 3-2-1. 臨床検体の取得

本実験の解析で用いた臨床データは、2019年に日本光電工業株式会社が順天堂大学医学部臨床検査部に委託研究として依頼して得たものである。臨床データの取得はヘルシンキ宣言に基づき、順天堂大学医学部附属順天堂医院の倫理審査委員会の承認（承認番号 17-085）を得て行った。順天堂医院にて、臨床検査後の患者の残余血（ $n = 203$ ）をオプトアウト方式で取得した。本研究のサンプルサイズは、CLSIで推奨されているESRの新規技術の妥当性評価に必要な2-120 mm/hを含むものである。K2-EDTA採血管に採取された静脈血の一部を用いて、3-2-2から3-2-3に示す方法にて *syllectogram*、ヘマトクリット、MCVを取得している。

#### 3-2-2. Westergren 法による ESR の測定

Westergren 法による ESR 測定を、2-2-3 に示した方法にて行った。ただし、検体数が多いため、沈降曲線の詳細な測定はせず、1時間後の ESR 値のみ(WG ESR<sub>1h</sub>)を記録した。なお、室温に関しては日間差があったため、環境温度の影響を補正する Manley 曲線(95)を用いて WG ESR<sub>1h</sub>を、ESR 測定業界のデファクトスタンダードである 18°C環境の値に補正して用いた。

#### 3-2-3. *Syllectogram* 測定とヘマトクリットおよび MCV の測定

*Syllectogram* の測定と、ヘマトクリットおよび MCV の測定は、第2章で使用した測定装置(MEK-1305; Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan) を用いて行った。

#### 3-2-4. ESR の計算

ESR の計算には、2-2-1 および 2-3-3 にて述べた方法を用いた。なお、Eq.(2.16)における係数  $a$  および  $b$  は、臨床検体 203 サンプルの  $V_s$ , HAI を用いたデータフィッティングにより、 $a=0.0102$ ,  $b=0.380$  とした。等速沈降速度  $V_e$  は、2-3-3 で述べた簡易式( $V_e=0.778 \times \text{WG ESR}_{1h}/3600/1000$  [m/s])にて得た値を用いた。時定数  $\lambda$  は 2-3-3 で述べたものと同じ回帰式にて求めた。

#### 3-2-5. MCV を用いた沈降速度補正

MCV を用いた沈降速度の補正式について述べる。MCV は、以下の式により計算できるとした。

$$MCV = \frac{4\pi C_e}{3} R_L^3 \quad \text{Eq. (3.1)}$$

ここで、 $R_L$  は赤血球の長軸半径、 $C_e$  は球体に対する赤血球モデルの体積比率であり、文献値から

計算された値から  $C_e=0.295$  とした(96). Oka によれば, 赤血球のような両凹平板形状の場合, 沈降する粒子の有効径は長軸半径に係数を乗じて  $R_{ef}=0.71R_L$  として計算できるため(74), 赤血球の有効径  $R_{ef}$  は Eq.(3.2)となる.

$$R_{ef} = 0.71 \times \sqrt[3]{\frac{3MCV}{4\pi C_e}} \quad Eq.(3.2)$$

Stokes 式は有効径の二乗に比例することから, 下記の式で MCV を考慮した沈降速度  $V_m$  を求めることができる.

$$V_m = V_e \left( \frac{R_{ef}}{R_{oef}} \right)^2 \quad Eq.(3.3)$$

### 3-2-6. データ解析

沈降曲線の線形回帰, 相関係数の算出, カーブフィッティングは, Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA) を用いて行った. ESR の臨床評価において, CLSI より求められている Passing-Bablok 法による Westergren 法の値との線形回帰分析および Bland-Altman 解析を, XLSTAT (Addinsoft Inc. New York, NY)を使用して実施した.



### 3-3. 結果および考察

#### 3-3-1. 沈降パラメータと AI および HAI の比較

本研究における臨床データのヘマトクリット範囲は 21.4%–52.3%, MCV 範囲は 66–115 fL であった。ヘマトクリットを 5 つの範囲( $Ht < 25\%$ ,  $25\% < Ht \leq 30\%$ ,  $30\% < Ht \leq 35\%$ ,  $35\% < Ht \leq 40\%$ ,  $Ht \geq 40\%$ )に分けた際の, AI に対する沈降速度  $V_e$  の関係を Fig. 3. 1A に示す。各ヘマトクリット範囲における  $V_e$  は, AI に対し指数関数的に増加しており, さらに, ヘマトクリットが高い群において AI が高く, かつ  $V_e$  が小さい傾向が見られた。この結果は, フィブリノゲンを健常ボランティアの血液に添加した時の結果と同様である(2-3-3 参照)。  $V_e$  と AI の相関係数は  $r=0.645$  であり, 凝集パラメータである AI 単独では  $V_e$  を計算することは難しい。一方で, Fig. 3. 1B に示すように, ヘマトクリット補正した AI (HAI) と  $V_e$  の相関図では, 水平方向の分布が狭まっていることがわかる。さらに, Fig. 3. 1C に示すように,  $V_e$  を干渉沈降式で除して求めた単一の凝集塊の赤血球沈降速度  $V_s$  と HAI の相関図においては, 垂直方向の分布が狭まっていることが確認できた。これらの結果はいずれも第 1 章で示したフィブリノゲンを添加した血液での結果と同様であり, AI のヘマトクリット補正および干渉沈降の影響を除去する手法は, 様々な背景を有する臨床検体においても有効であることが示された。

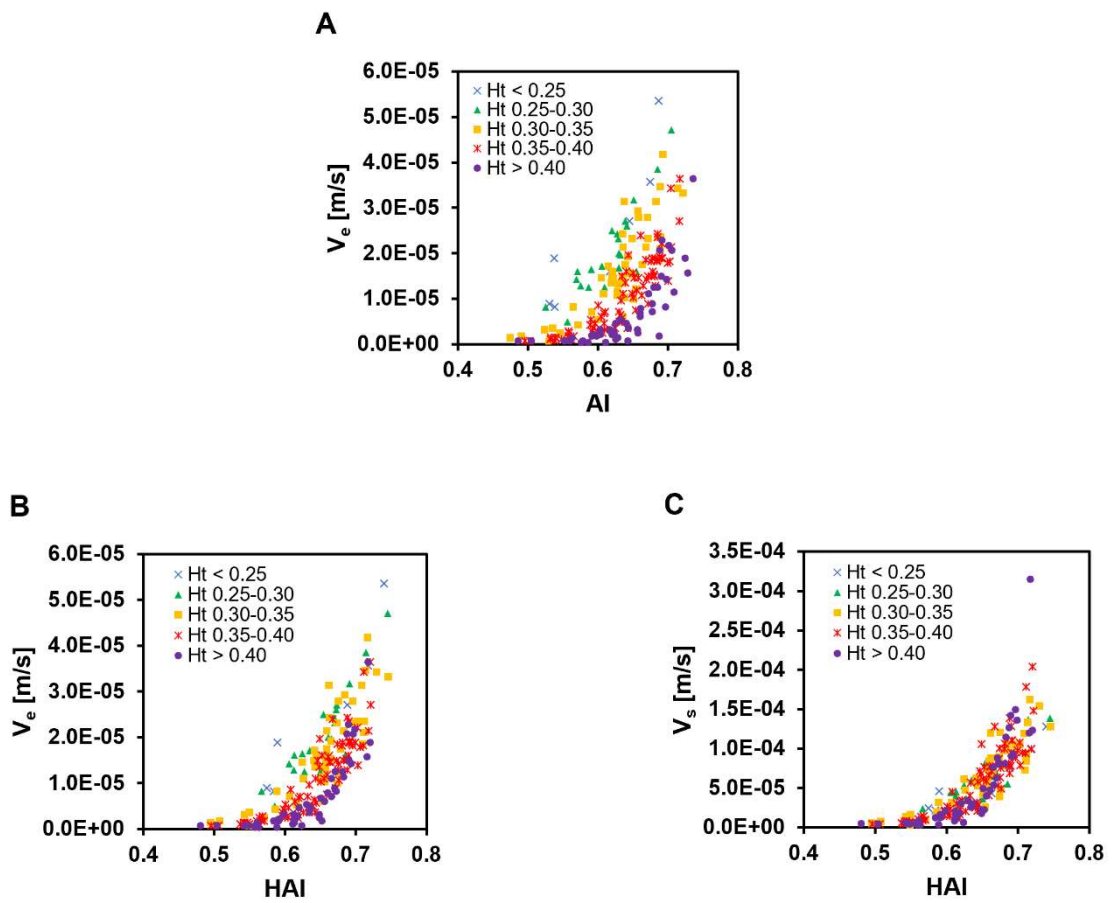


Fig. 3. 1 Relationship between the Aggregation Index and Sedimentation Velocities. (A) Relationship between the AI measured over a 5-s interval and erythrocyte sedimentation. (B) Relationship between the HAI measured over a 5-s interval and erythrocyte sedimentation velocity. (C) Relationship between the HAI measured over a 5-s interval and the sedimentation velocity of an erythrocyte aggregate divided by the hindered settling effect.

### 3-3-2. 臨床検体における ESR 計算値と Westergren 法による ESR 値の比較

赤血球の有効径を一定とし、MCV の値を考慮せずに求めた ESR と WG ESR<sub>1h</sub> の相関は非常に高かった( $r = 0.899$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 3. 2A). また, Passing-Bablok 法にて求めた回帰直線の傾きは 1.068 (95%信頼区間 0.998–1.127), 切片は 0.559 (95%信頼区間-0.433–1.538)であった. Fig. 3. 2B に Bland-Altman plot を示す. Westergren 法に対する本手法のバイアスは 2.76, limits of agreement (LOA = 1.96SD)は -24.5 から 30.0 であり, 良好な結果であった. しかし, ESR が 30 - 120 mm/h の範囲では, その他の範囲と比較して計算値と実測値の差分が大きい結果となった.

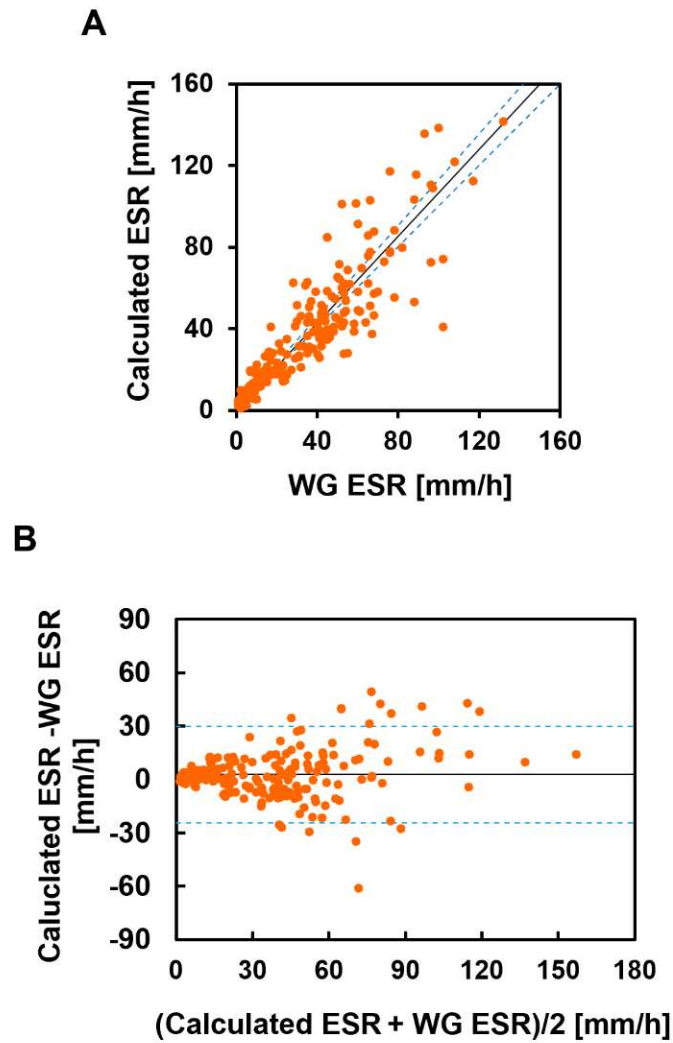


Fig. 3. 2 Comparison of the ESR Calculated Using HAI and Ht with WG ESR. (A) Scatter plot of the calculated ESR for WG ESR. Correlation coefficient,  $r = 0.899$ . The regression line calculated by the Passing–Bablok method is shown as a solid line, and the regression lines at the upper and lower limits of the 95% confidence interval are shown as dotted lines. (B) Bland–Altman plot for the calculated ESR and WG ESR. The solid line represents the bias (2.76). The dotted line indicates 1.96 SD.



次に、MCVを4つの範囲 (62–75 fL [n = 8], 75–85 fL [n = 18], 85–95 fL [n = 109], 95–115 fL [n = 68])に分け、ESR 推定値と実測値の差分の平均値を計算した結果を Fig. 3.3 に示す。MCVが低いほど、計算値が実測値よりも大きい結果となったが、この理由は、計算に用いた凝集していない時の赤血球の有効径が固定であるために、MCVが小さい、すなわち有効径が小さいサンプルの沈降速度を過大に計算してしまったためと考えられる。

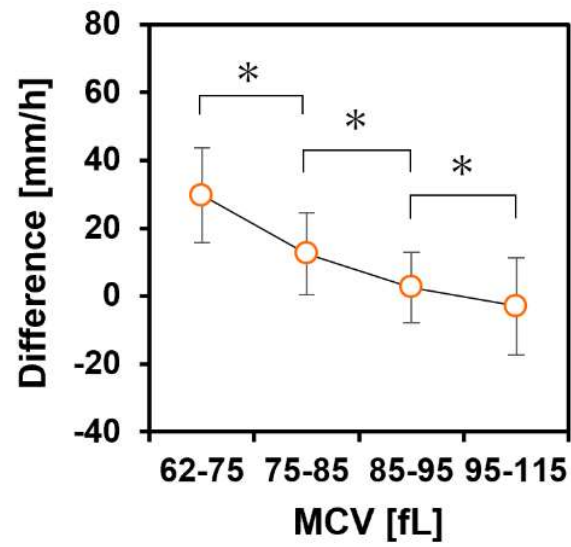


Fig. 3. 3 Mean difference in the ESR calculated using HAI and Ht from WG ESR for each MCV range. Error bars indicate SD. \* $p < 0.05$  (Student's  $t$ -test).

次に、MCVの補正を行ったESRとWG ESRの比較をFig. 3. 4(A)に、Bland-Altman plotをFig. 3. 4(B)に示す。MCV補正を行った結果、計算値とWG ESRの相関係数は $r = 0.920$  ( $p < 0.001$ )と向上し、Westergren法に対する本手法のバイアスは $-2.17$ 、LOAは $-24.6$ から $20.3$ であり、LOAはMCV補正の結果改善した。ESRが $90$  mm以下における計算値と実測値の差分は、MCV補正を行っていない結果と比較して減少していた。また、Fig. 3. 5に示すように、推定値と実測値の差分のMCV依存性が解消されていた。これらの結果は、過去に報告されている迅速測定装置の臨床評価結果よりも優れていた(82,83)。しかし、今回測定した検体の中には、計算値がWestergren法と一致しない検体もあった。特にESRが $60 - 100$  mmにおける検体の多くでは、MCV補正を行っても計算値と実測値の差分が改善されなかった。この要因としては、本手法の計算では固定値とした血球密度、血漿粘度および血漿密度が、実際には検体によって異なることが考えられる。特に計算値の方が低いデータに関しては、総蛋白が非常に低いものが含まれていたことから、計算で用いた血漿粘度が実際よりも高く、ESRが低く計算されていた可能性がある。今後、装置内で血漿の屈折率を計測することが可能になれば、屈折率から血漿粘度を推定し、計算に組み込むことによってさらに精度が向上する可能性がある。今回の報告により、わずか5秒間の赤血球凝集測定と、CBCの同時測定により得たヘマトクリットとMCVを用いて迅速かつ正確にESRを推定できることが多くの臨床検体で実証された。本手法の臨床性能は、過去に報告されている迅速ESR測定器の臨床性能よりも優れており、また、他の報告では考慮されていなかったヘマトクリットとMCVと沈降理論の関連を詳細に説明し、実際に臨床検体でその証明を行った。本手法は、短時間で正確にESRを推定できるだけでなく、ESRとCBCの両方を検査する機会が多い臨床での血液検査において、ESRとCBCを同時測定可能であるという大きなメリットがある。医療従事者がESRとCBCを測定する場合、通常は数mLの血液を専用チューブに採取して別々に測定する必要があるが、日本光電工業株式会社の装置と本計算手法を用いることにより、1本のEDTAチューブから $80 \mu\text{L}$ の血液を1回測定するだけESRとCBCを測定可能であり、患者の負担が軽減されると同時に、臨床ワークフローの効率化とスループットの向上が期待できる。

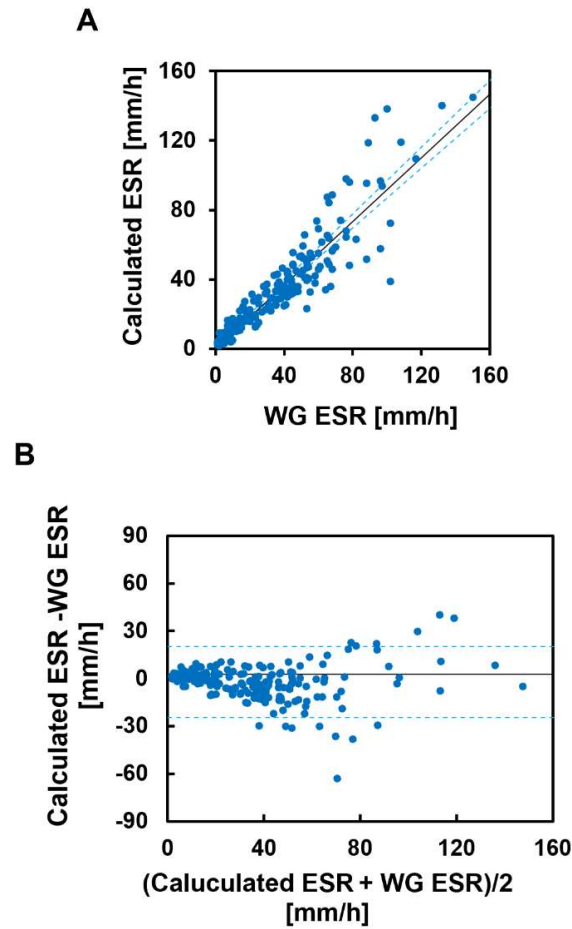


Fig. 3. 4 Comparison of the ESR calculated using HAI, Ht, and MCV with WG ESR. (A) Scatter plot of the calculated ESR for WG ESR. Correlation coefficient,  $r = 0.920$ . The regression line calculated by the Passing-Bablok method is shown as a solid line, and the regression lines at the upper and lower limits of the 95% confidence interval are shown as dotted lines. (B) Bland–Altman plot for the calculated ESR and WG ESR. The solid line represents the bias ( $-2.17$ ). The dotted line indicates  $1.96$  SD.

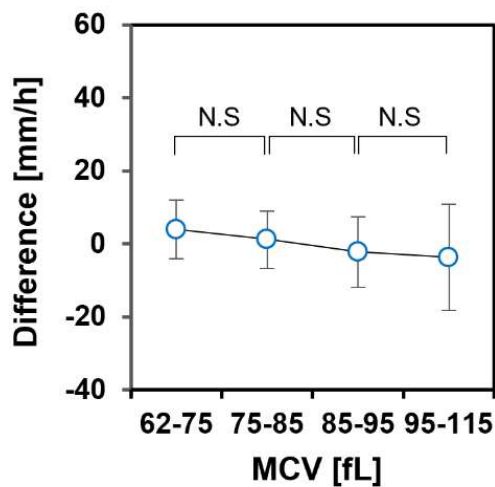


Fig. 3. 5 Mean difference in the ESR corrected for MCV from WG ESR for each MCV range. Error bars indicate SD. N.S: Not significant.

### 3-4. 結論

203 の臨床の血液検体において、5 秒間の Syllectogram から得た Aggregation Index(AI)をヘマトクリットで補正し、沈降理論に基づく式にて得た ESR は、Westergren 法で得た ESR 値と非常に高い相関を示した( $r=0.899$ )が、計算値と実測値の差には MCV 依存性が見られた。沈降速度を MCV を用いて修正することにより、ESR の計算値と実測値の差分の MCV 依存性は解消され、相関が向上した ( $r=0.920$ )。これらの結果より、本手法は多くの臨床検体に適用可能であり、手法の有効性、妥当性が証明された。

#### 備考

本章における成果は、以下に示す雑誌にて査読中である。

**Higuchi M**, Watanabe N. Determination of erythrocyte sedimentation rate using hematocrit-corrected aggregation index and mean corpuscular volume. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 第3章の内容)



## 第4章 赤血球凝集測定を用いた血液凝固障害の検出のための基礎検討

大量出血による死者は、世界で年間190万人とも言われ、さらに、その10~20%は何らかの血液凝固障害によるものであるとされる(97)。これまでの赤血球凝集に関する研究は、ESRをはじめ、そのほとんどが凝集能の亢進に関するものであった。本章は、これまでの研究報告がほとんど無かった、赤血球凝集能が極めて低い範囲について焦点を当てたものである。主に大量出血時に起きやすいフィブリノゲン低下による凝固障害の検出を目的とした基礎検討について述べる。

利益相反 (Conflict of interest: COI) 等に関して：

本章における研究は、筆者が本学博士課程に入学後の2021年に本研究室と日本光電工業株式会社との共同研究を締結し、本学学生として実施したものである。本研究に関わる特許(特許7037324)は、発明者：筆者、出願人：日本光電工業株式会社として日本国内にて登録されている。日本光電工業株式会社から本研究室への資金の提供は無く、測定装置の貸与のみが行われた。また、日本光電工業株式会社は本研究に関する計画立案、および評価には関与していない。

### 4-1. 序論

#### 4-1-1. 止血機序と凝固検査

血液には、血管の損傷時に複数の凝固因子が連鎖反動的に活性化し、最終的に止血を行う機能が備わっている。凝固因子は現在までに発見された順に第I~XIII因子と名付けられている(98,99)。Fig. 4.1に示すように、血管が損傷しコラーゲンが血管内に露出すると、フォンウィルブランド因子(VWF)を介して血小板がコラーゲンに粘着し、さらに活性化した血小板同士がフィブリノゲン(Fbg, 第I因子)を介して凝集する(一次止血)。さらに血小板凝集や、損傷した血管内皮から放出される組織因子(第III因子)によって、下流の凝固因子が次々と活性化され、最終的にトロンビン(第IIa因子)がフィブリノゲンをフィブリンに転化させ、このフィブリンが糊の役目をし、強固に止血を行う(二次止血)。血液が凝固する経路は、血管の損傷時に放出される組織因子から始まり、第VII, V, II, I因子が関与する外因系と、採血した血液を抗凝固処理せずに試験管に入れた時など、異物に対して反応を開始し、第VII, IX, VIII, X, V, II, I因子が関与する内因系の凝固反応がある(Fig. 4.2)(99)。血液凝固検査として一般的であるのは、外因系の凝固時間を見るプロトロンビン時間(Prothrombin time: PT)と、内因系の凝固時間を見る活性化部分トロンボプラスチン時間(Activated prothrombin time: APTT)、そして最終的な止血の糊の役割を果たすフィブリノゲン等がある(100)。これらの検査は、採血時に血液凝固に必要なカルシウムイオン(第IV因子)をキレートする作用を持つクエン酸ナトリウムにて抗凝固処理した血漿に対し、検査時にカルシウムイオンや活性化剤を含む試薬を添加し凝固カスケードを再開させて凝固するまでの時間を見るものである。近年では、術中における全血での凝固能を見る血液粘弾性検査の有用性も報告されている(101)。

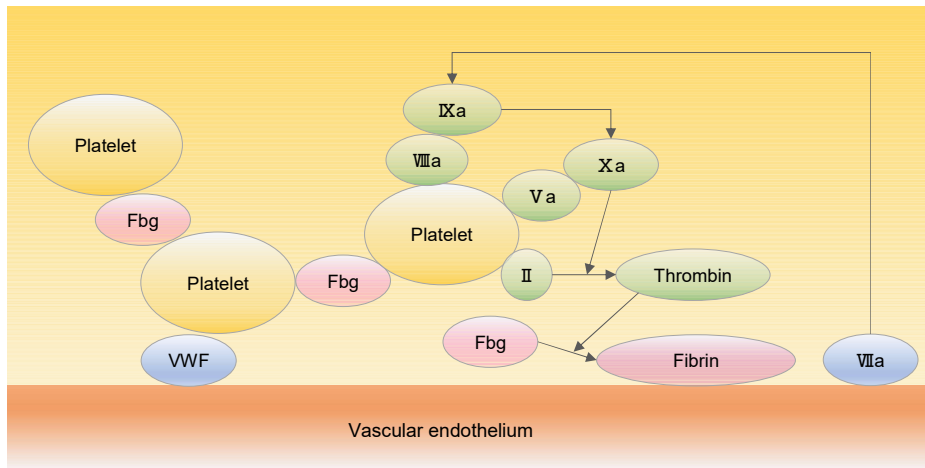


Fig. 4. 1 Mechanism of Hemostasis

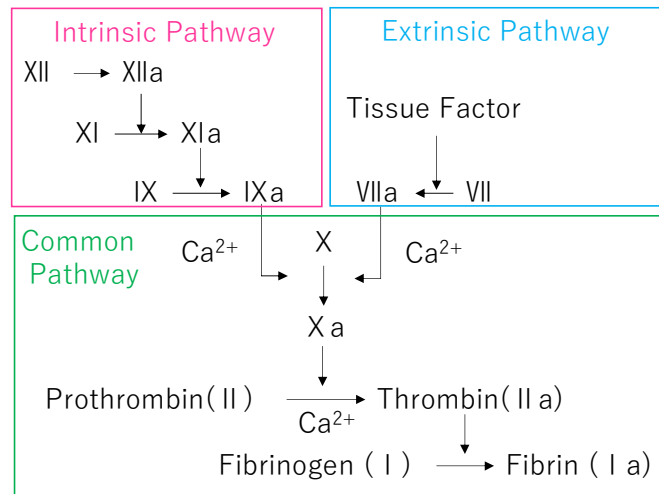


Fig. 4. 2 Schematic Representation of the Coagulation Cascade.



## 4-1-2. 大量出血時におけるフィブリノゲンの枯渇と凝固障害

4-1-1にて述べたように、フィブリノゲンは、出血時の血小板凝集とフィブリン網形成に必須であり、止血の要である(102)。通常、血中フィブリノゲン濃度は200-450 mg/dL程度であるが、重症外傷、心臓血管外科手術、産科における大量出血症例において、フィブリノゲンはフィブリンへの転化による消費だけでなく、輸液による希釈を受ける。さらには、創傷治癒過程における、プラスミンによるフィブリンの分解反応である線溶が、重度外傷時には異常に亢進する状態となり、フィブリンだけでなくフィブリノゲンまでもが急速に分解される状態となる(Fig. 4.3)(103)。その結果、血中フィブリノゲン濃度が極度に低下し、致死的な血液凝固障害(出血傾向)を引き起こす(103)。止血能に異常を来すフィブリン濃度の閾値は150 mg/dLとされる(104)。フィブリノゲンや血小板、VWF以外の凝固因子は主に酵素であり、その反応は増幅反応であるが、フィブリノゲンは傷を塞ぐ糊の役目を果たすものであり、他の凝固因子よりも少ない減少率(減少率約60%)で止血能に異常をきたす。従って、低濃度のフィブリノゲン濃度を迅速かつ簡便に把握し、新鮮凍結血漿(Fresh frozen plasma: FFP)やフィブリノゲン製剤を投与することは临床上非常に重要である。大量出血症例に対する血液製剤の適正な使用のガイドラインにおいても、フィブリノゲン濃度150 mg/dL以下でFFPやフィブリノゲン製剤を投与することが推奨されている(105)。

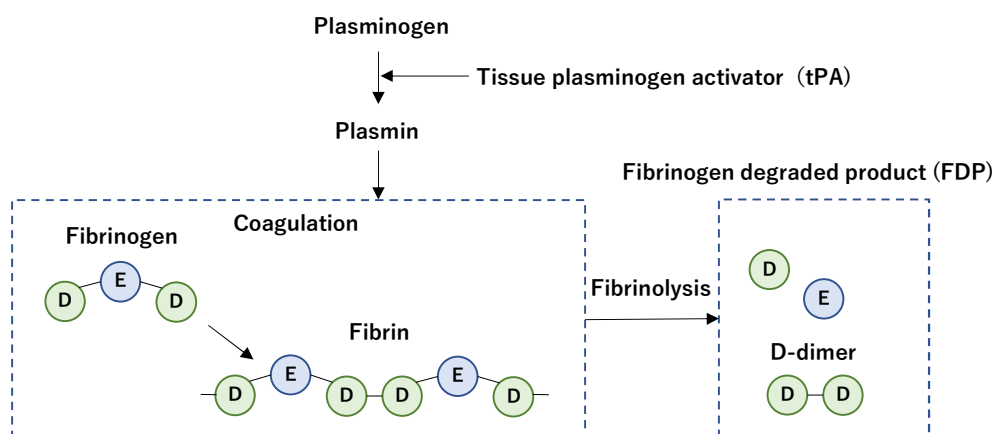


Fig. 4.3 Fibrinolysis Pathway.

#### 4-1-3. フィブリノゲン検査における課題

臨床におけるフィブリノゲン検査では、遠心分離による血漿の抽出と、試薬と反応させて凝固を行う必要があり、検査の待ち時間がかかるものであった(106)。これまでに短時間で測定できるPOCT装置も製品化されているが(107)、専用の試薬入りカートリッジが必要であり、コストがかかるという課題がある。

#### 4-1-4. 本章における研究の目的

本研究では、フィブリノゲン濃度依存的に増加する赤血球凝集能を測定することにより、凝固試薬を用いず、間接的にフィブリノゲンの濃度低下を推定することを新たに提案する。第1章で述べたように、これまでに赤血球凝集とフィブリノゲン濃度の関係性は、顕微鏡で観察するレオスコープ(26)や、syllectometry等の手法によって研究が行われており(108)、高濃度のフィブリノゲンに対して指数関数的に赤血球凝集速度が増加することが明らかになっているが(26)、凝固障害の目安となる150 mg/dL(104)以下の低濃度における詳細な関係を報告したものはない。過去にブタ血液を用いた体外循環において、フィブリノゲン低下と赤血球凝集能の低下が報告されているが(109)、この時の実験条件は非常に少なく、かつヒト血液を用いた詳細な実験は行われていない。また、赤血球凝集能の評価において、ヘマトクリットが大きく影響するため(84)、ヘマトクリットを固定した複数の条件での比較評価も必要となる。本研究では、出血時の赤血球レオロジーの理解向上と、簡便かつ迅速な新たなフィブリノゲン濃度推定手法の開発を目的として、ヒト血液の血漿と血清を混合し、ヘマトクリットを複数の条件にて作製した低濃度フィブリノゲンと赤血球凝集の関係を、簡便な赤血球凝集能の測定手法である syllectometry を用いて調査した。

## 4-2. 実験方法

### 4-2-1. 試料作製

本実験は、芝浦工業大学生命工学研究倫理審査委員会の承認後(承認番号#21-006)に行った。試料作製の手順を Fig. 4. 4(A)に示す。書面にて同意を得た 12 名の健常者 (21~25 歳) から、21G の採血針 (Terumo Corp., Tokyo, Japan) とシリンジを使用して静脈血を採血し、採血された血液の一部を速やかに 3.2%クエン酸ナトリウムと 9:1 で混合し抗凝固処理した。採取された残りの血液は、凝固促進剤入りの採血管(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)に入れ、室温にて 60 分静置してフィブリンを完全に析出させたのち、 $1,500\times g$  で 10 分間遠心分離し血清を得た。抗凝固処理した血液も同様に遠心分離し、buffy coat を除去したのち、遠心分離にて血球と血漿に分離した。分離した血清は、抗凝固してある血液と同様に、3.2%クエン酸ナトリウムと 9:1 で混合した。一人の被験者から得た血漿を、血清に対して 1.00:0, 0.75:0.25, 0.50:0.50, 0.25:0.75, 0.125:0.875 の比率で混合したのち、血球をヘマトクリット 20%, 30%, 40%になるよう添加し、血液量が不足し作成できなかった 4 条件を除いて最終的に 56 条件のサンプルを作製した。作製したサンプルの液体成分は速やかに冷凍保存し、臨床検査受託会社 (BML, Inc., Tokyo, Japan) にてフィブリノゲン濃度を測定した。なお、血漿の混合比が 0.125 のいくつかのサンプルに関しては、フィブリノゲン測定装置の測定下限である 50 mg/dL 以下を示したが、他の比率の実測値の値を外装してフィブリノゲン濃度を求めた。

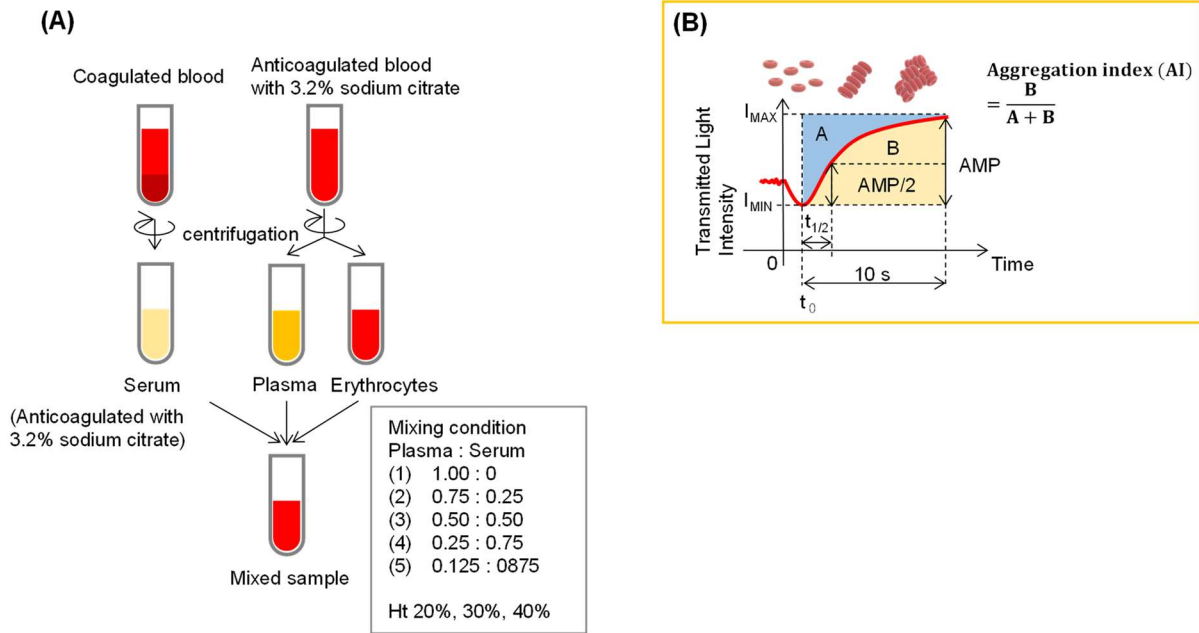


Fig. 4. 4 Preparation of Samples and Experimental Settings. (A) Procedure for preparing blood samples. (B) Syllectogram and aggregation parameters.

#### 4-2-2. Sylllectogram 測定方法

Sylllectogram の測定は、第2章で使用した測定装置 (MEK-1305; Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan) を用いて行った。本実験では20秒間の透過光強度の取得を行い、Fig. 4.4(B)に示すように  $I_{MIN}$  から10秒間の解析時間にて、AMP, AI,  $t_{1/2}$ , および、流れの停止後から透過光強度が最小になる時間  $t_0$  を求めた。 $t_0$  は解離した赤血球が凝集するまでの時間である。作製した各サンプルを3回または5回測定し、各パラメータの平均値を求めた。5回測定を行った43条件においては、再現性評価のため、変動係数 Coefficient of variation ( $CV = SD/mean \times 100$  [%]) を求めた。

#### 4-2-3. 顕微鏡下での赤血球凝集の観察

各混合条件のサンプルを、各サンプルの液体成分にて200倍に希釈したものを、37°Cに温調した厚み0.2mmの観察ステージに注入し、10分後に40倍の対物レンズ (LUCPLFLN; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) と倒立型顕微鏡 (IX-71; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) および CMOS カメラ (UI-3060CP-C-HQ; IDS Imaging Development Systems, Obersulm, Germany) にて観察を行った。

### 4.3. 結果および考察

#### 4-3-1. フィブリノゲン濃度と Sylllectogram および顕微鏡下における赤血球凝集の関係

作製した試料のフィブリノゲン濃度は平均  $129.4 \pm 88.3$  mg/dL であり、56サンプル中、33サンプルにおいて150mg/dL未満であった。Fig. 4.5に、同一被験者の血液から作製した各フィブリノゲン濃度サンプルにおける、流速を止めた時間を0とした透過光強度の時間変化の一例を示す。いずれの条件においても、透過光強度は、流速停止後にすみやかに減少したのち、増加へと転じる sylllectogram が取得された。フィブリノゲン濃度の低下とともに、透過光強度の最小値と最大値の差(AMP)は小さくなった。止血異常となるフィブリノゲン150mg/dL以下においても、透過光強度の変化を検出することができた。第2章で示したESR測定のためには5秒が最適な測定時間であったが、100mg/dL以下の条件においては sylllectogram の変化が非常に小さかったため、本実験において測定時間は10秒が望ましいと考えた。Fig. 4.6に希釈したサンプルの顕微鏡画像を示す。フィブリノゲン濃度が低下するほど赤血球凝集の度合いは低下していることが確認できた。

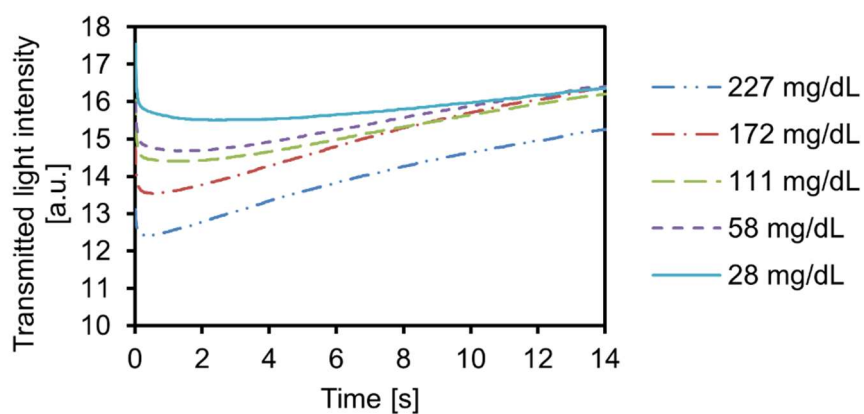


Fig. 4. 5 Syllectogram from a Representative Measurement of a Blood Sample at Each Fibrinogen Concentration.

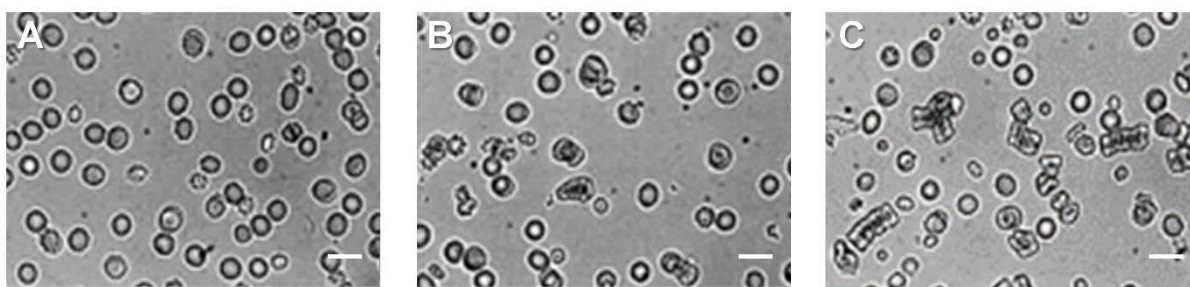


Fig. 4. 6 Representative Images of a Diluted Blood Sample at Fibrinogen Concentrations of (A) 32 mg/dL, (B) 96 mg/dL, and (C) 255 mg/dL. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4-3-2. フィブリノゲン濃度と凝集パラメータの関係

Fig. 4. 7にフィブリノゲン濃度と凝集パラメータの関係を、Table 4. 1に被験者毎のフィブリノゲン濃度と凝集パラメータの相関係数を示す。AI および AMP は、全てのヘマトクリット条件において正常域から低濃度におけるフィブリノゲン濃度と強い正の相関関係を示した。t<sub>1/2</sub>においては、フィブリノゲン濃度と強い負の相関関係を示し、約 100 mg/dL 以下においては非線形に値が顕著に増加する傾向を示した。これらの低濃度範囲におけるフィブリノゲンに対する凝集パラメータの傾向は、これまでに報告されている正常域から高濃度範囲における傾向(26)と同様である。従って、血漿中における赤血球凝集能は、極めて低濃度から高濃度範囲までのフィブリノゲン濃度に対して、連続的な変化を示すと言える。しかし、AI においては、正常範囲から 100 mg/dL に至るまでは値が減少したが 100 mg/dL 以下においては値が増加したものが複数見られた。この要因として、透過光強度の変化が著しく緩やかであるため、Syllectogram の上下の面積比の変化として検出しにくいことが挙げられる。また、凝集能が著しく低い場合、赤血球の変形からの回復による透過光の経時的な減少の影響を受けることが報告されており、この結果により AI が増加したと考えられる。t<sub>0</sub>に関しては、これまでフィブリノゲン濃度との関係を報告した例がほとんどないが、フィブリノゲンの低下に対して指数関数的な減少を示しており、フィブリノゲン濃度低下に対する検出感度が高いパラメータである可能性がある。

#### 4-3-3. ヘマトクリットおよび血液の個体差による影響

各凝集パラメータのフィブリノゲン濃度に対する変化は、一部においてヘマトクリットによる差があるものの、おおよそ正常値に近い値(40%)から、出血によって引き起こされる低値(20%)において、いずれのヘマトクリット条件においても類似の傾向を示していた。AMP に関しては、ヘマトクリットが低い群において AMP が高くなる傾向が見られたが、AI, t<sub>1/2</sub>, t<sub>0</sub>においてはヘマトクリット依存性は明らかではなかった。過去の報告では、正常なフィブリノゲン濃度範囲においては、ヘマトクリットの減少に伴い AI は低下し、t<sub>1/2</sub>は増加することが報告されている(39)。また、AMP においては、ヘマトクリット 40%付近を頂点としてヘマトクリットの増減に伴う減少傾向が示されている(39)。しかし、今回の結果は、それらと一致しなかった。この要因は、測定装置、フィブリノゲン濃度範囲等の違いが考えられるが、本実験結果のみでは厳密にヘマトクリット依存性を評価するには不十分であるため、今後、同一被験者のサンプルを用いてヘマトクリット濃度を変えた実験等を行う必要がある。

Table 4. 1 に、12名の被験者と調整したヘマトクリットにおける、フィブリノゲン濃度と各凝集パラメータとの相関係数を示す。同一の被験者で固定したヘマトクリットのサンプルであれば、いずれも相関係数は非常に高く、フィブリノゲン濃度変化に対する高い検出感度を有すると言える。しかし、当然ながら、血漿タンパクの組成や赤血球の状態が被験者毎に異なるため、被験者全体におけるフィブリノゲン濃度と各凝集パラメータの相関係数は個別の条件よりも低かった。

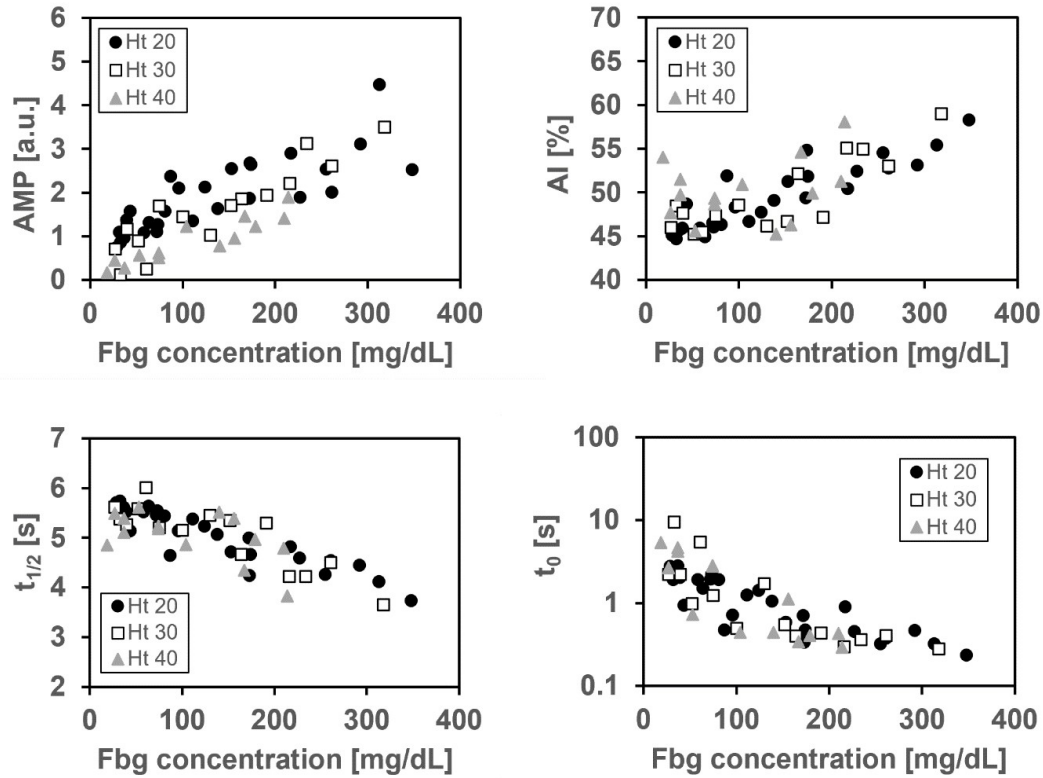


Fig. 4. 7 Relationship between Fibrinogen Concentration and the Aggregation Parameters.

Table 4. 1 Correlation Coefficients between Fibrinogen Concentration and the Aggregation Parameters in Each Subject.

Subject No., Ht	AMP	AI	$t_{1/2}$	$t_0$
1-Ht 20%	0.974	0.966	-0.994	-0.977
2-Ht 20%	0.996	0.976	-0.976	-0.895
3-Ht 20%	0.634	0.964	-0.961	-0.802
4-Ht 20%	0.972	0.995	-0.997	-0.967
5-Ht 20%	0.970	0.977	-0.985	-0.980
6-Ht 20%	0.883	0.978	-0.977	-0.851
7-Ht 30%	0.994	0.999	-1.000	-0.902
8-Ht 30%	0.996	0.894	-0.976	-0.891
9-Ht 30%	0.961	0.937	-0.929	-0.899
10-Ht 40%	0.988	-0.146	-0.402	-0.969
11-Ht 40%	0.985	-0.600	0.130	-0.973
12-Ht 40%	0.985	0.964	-0.983	-0.734
All	0.808	0.745	-0.827	-0.608



#### 4-3-4. フィブリノゲン濃度の正常範囲と低値における凝集パラメータ間の比較

Table 4.2 は、フィブリノゲン濃度が 150 mg/dL 以上と未満とで、各凝集パラメータの平均値を比較し、有意水準を 0.05 として Welch の t 検定を実施したものである。フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 未満での AMP および AI の平均値は、フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 以上での平均値よりも有意に低い値を示した。フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 未満での  $t_{1/2}$  および  $t_0$  の平均値は、フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 以上での平均値より有意に高かった。赤血球凝集能はフィブリノゲン以外に、免疫グロブリン、アルブミン等の様々な血漿タンパクの影響も受けるため、個人差も大きく、凝集パラメータ単体でフィブリノゲン濃度を正確に推定することは原理上難しい。しかし、今回の結果から、凝集パラメータを用いることにより、FFP やフィブリノゲン製剤投与の目安となる 150 mg/dL を明らかに下回っているかどうかの一助になり得ると考えられる。

Table 4. 2 Comparison of the Mean Values of the Aggregation Parameters between Fibrinogen Levels

	Mean $\pm$ standard deviation		
	$\geq 150$ mg/dL ( $n = 19$ )	$< 150$ mg/dL ( $n = 24$ )	<i>p</i> -value
<b>AMP</b>	2.15 $\pm$ 0.70	0.91 $\pm$ 0.50	$< 0.01$
<b>AI</b>	52.0 $\pm$ 3.58	47.0 $\pm$ 1.91	$< 0.01$
<b>t<sub>1/2</sub></b>	4.64 $\pm$ 0.49	5.45 $\pm$ 0.24	$< 0.01$
<b>t<sub>0</sub></b>	0.49 $\pm$ 0.22	2.61 $\pm$ 1.97	$< 0.01$

## 4-3-5. 測定の再現性

Fig. 4. 8 は 5 回繰り返し測定したときの CV をフィブリノゲン濃度別に示したものである( $n = 43$ ). AMP の CV はフィブリノゲン濃度 150 mg/dL 以上では 10%未満であったが、フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 未満では 10%以上であることが多かった。この結果は、AMP の平均値の低下によるものと考えられる。AI および  $t_{1/2}$  の CV は、フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 以上ではほぼ全てが 5%未満であり、再現性に優れていたが、フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 未満では再現性が低下した。このような低値における再現性の低下は、AI の低値に感度低下の 1 つの要因であると考えられる。 $t_0$  の CV は比較的大きく、フィブリノゲン濃度への依存性は明らかでなかった。

Table 4. 3 は、フィブリノゲン濃度が 150 mg/dL 以上とそれ以下とで、各凝集パラメータの平均 CV を比較し、有意水準を 0.05 として Welch の t 検定を実施したものである。フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 未満では、 $t_0$  を除くすべてのパラメータの平均 CV が、フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 以上での平均 CV よりも有意に高かった。本実験における再現性は、過去に報告されているものとおおよそ同等であった(110)。

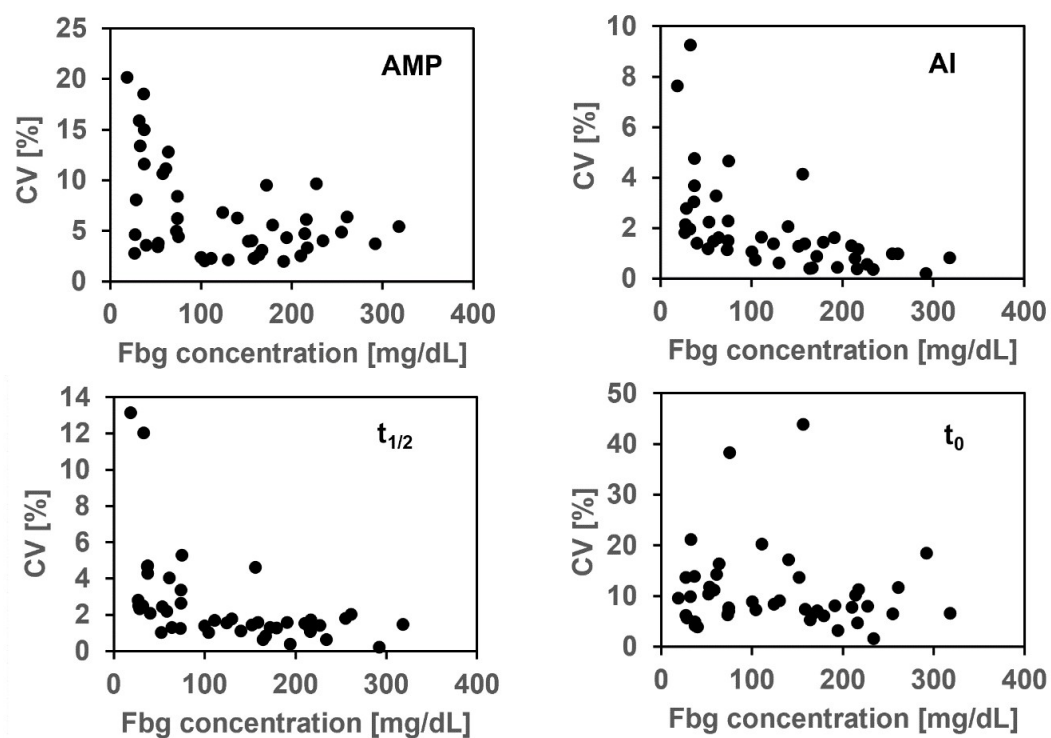


Fig. 4. 8 Reproducibility of the Aggregation Parameters.

Table 4. 3 Comparison of the CVs of the Aggregation Parameters between Fibrinogen Levels

	CV% mean		
	≥150 mg/dL ( <i>n</i> = 19)	<150 mg/dL ( <i>n</i> = 24)	<i>p</i> -value
<b>AMP</b>	4.6	7.9	<0.01
<b>AI</b>	1.0	2.5	<0.01
<b>t<sub>1/2</sub></b>	1.4	3.1	<0.01
<b>t<sub>0</sub></b>	9.9	11.5	n.s.

#### 4-4. 結論

本章では、凝固障害をきたす低濃度のフィブリノゲン濃度領域における、フィブリノゲン濃度と syllectometry にて得た凝集パラメータの関係性を明らかにした。凝集パラメータ AMP, AI,  $t_{1/2}$ ,  $t_0$  は、これまでに報告されている正常範囲から高濃度におけるフィブリノゲン濃度に対する変化と同様に、低濃度のフィブリノゲン範囲においてもその濃度低下に対し増加( $t_{1/2}$ ,  $t_0$ )または減少(AMP, AI)した。そして、フィブリノゲン濃度 150 mg/dL 以上と、150 mg/dL 以下における測定値の平均値に有意な差が認められた。顕微鏡的観察では、フィブリノゲン濃度差を反映した連鎖形成が確認できるようになるまでに 10 分以上の時間を要し、ESR では測定感度が足りず測定できないが、syllectometry であれば、10 秒間という短い測光時間で凝集能を定量化でき、間接的にフィブリノゲン濃度を推定することが可能である。そして、凝固試薬が不要かつ、全血を用いて短時間かつ低コストに測定可能であるため、コストのかかるフィブリノゲン検査の測定間を補完し、予期せぬフィブリノゲン低下の早期検出に寄与できる可能性がある。しかしながら、本実験では血清を用いているため、線溶の影響は考慮していない。本技術を臨床に応用するためには、線溶亢進時にフィブリノゲン分解物が赤血球凝集能に与える影響(26)や、輸液等の治療介入が赤血球凝集能に与える影響を考慮する必要がある。



## 第 5 章 赤血球凝集測定を用いた血液型判定法の開発

これまでの章では、赤血球とフィブリノゲン等の血漿タンパクとの弱い相互作用から生じる赤血球凝集のみに焦点を当ててきた。本章では、sylectogram を用いて、血液型由来の抗原抗体反応による特異的かつ強力な結合によって生じる赤血球凝集である agglutination を検出する手法の開発に関して実験的検討結果を述べる。本章においては、これまで示してきた可逆的な赤血球の凝集を赤血球凝集または”aggregation”と呼び、血液型抗原抗体反応由来の赤血球凝集を”agglutination”と呼ぶこととする。

利益相反 (Conflict of interest: COI) 等に関して：

本章における研究は、筆者が本学博士課程に入学後の 2021 年に本研究室と日本光電工業株式会社との共同研究を締結し、本学学生として実施したものである。本研究に関わる特許は、発明者：筆者、渡邊 宣夫教授、出願人：日本光電工業株式会社、芝浦工業大学として出願中である。日本光電工業株式会社から本研究室への資金の提供は無く、測定装置の貸与のみが行われた。また、日本光電工業株式会社は本研究に関する計画立案、および評価には関与していない。

### 5-1. 序論

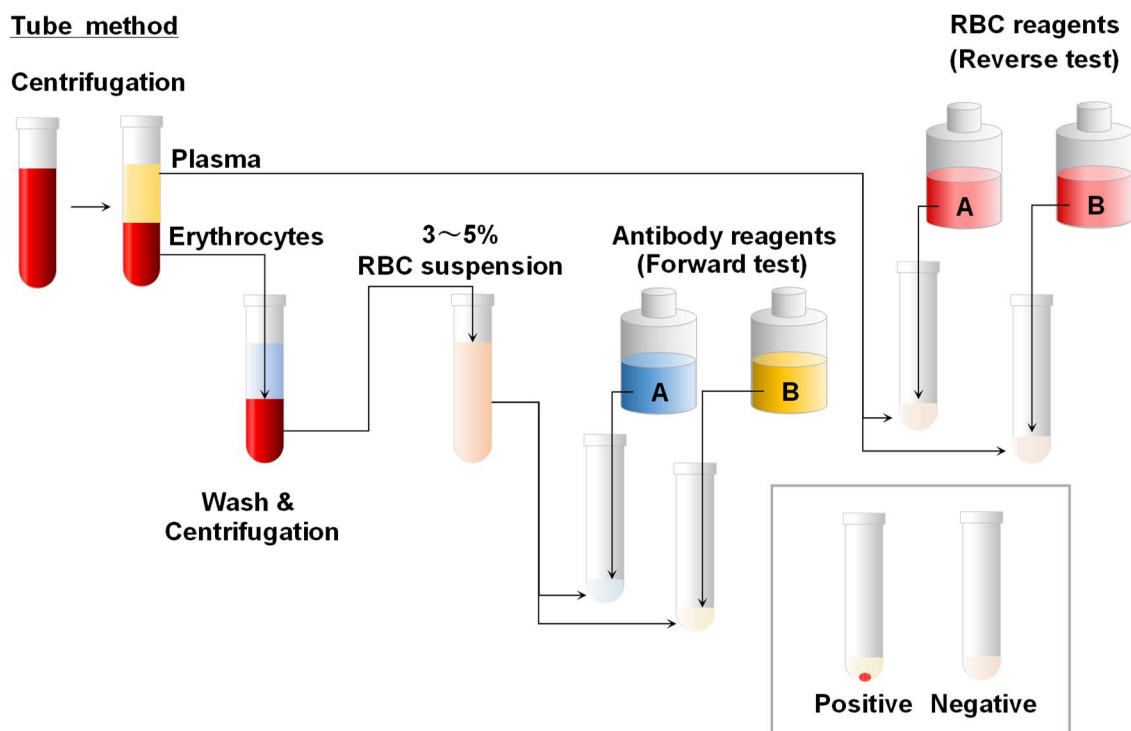
#### 5-1-1. ABO 血液型と輸血

心臓血管外科手術や重度外傷による大量出血時には、組織への酸素供給や止血能の維持のために輸血が必須となる(111)。輸血を行うにあたっては、被輸血者および輸血用製剤の血液型を、正確かつ迅速に特定することが求められる。ヒトの血液型においては、Landsteiner によって発見された ABO 血液型が最も一般的であり、赤血球膜上に存在する A 抗原または B 抗原と、血漿中に存在する A 抗体または B 抗体の有無によって、A 型、B 型、AB 型、O 型に分類される(112)。A 型血においては、赤血球膜上に A 抗原を有し、血漿中に B 抗体を有する。B 型血ではその逆で、赤血球膜上に B 抗原を有し、血漿中に A 抗体を有する。O 型血の赤血球は A および B 抗原を持たず、血漿中に A および B 抗体を有する。AB 型血では血漿中に A および B 抗原を有するが、赤血球膜上に A および B 抗体は持たない。これらの血液型の抗原抗体反応が起こると、赤血球同士が強く凝集し、溶血が起こり重篤な状態に陥る。従って、同型輸血を基本とするが、緊急時には抗原抗体反応が起こらない O 型の濃厚赤血球と、AB 型の血漿または血小板の異型輸血は許可されている。

#### 5-1-2. 血液型判定手法

臨床における ABO 血液型試験においては、被輸血者の血液成分と、A および B 型の抗体試薬または抗原試薬を混合し、抗原抗体反応によって生じる赤血球凝集塊を様々な手法により検出し

ている。一般的には、Fig. 5.1 に示すように、抗体試薬を用いて赤血球膜上にある血液型抗原を判定するオモテ試験と、血球試薬を用いて血漿中に存在する血液型抗体を判定するウラ試験があり(113)、両方の検査結果の一致が求められる。しかし、緊急時にはオモテ試験のみで判定することも多い。オモテ試験の最も簡便な手法としては、スライド法があり、血球と抗体試薬を等量ずつスライド上で混合し、目視にて agglutination を確認するが、感度が十分ではない(114)。試験管法はスライド法よりも感度に優れた一般的な手法であり、Fig. 5.1 のように、オモテ試験では血球の遠心分離と洗浄後に 3-5%の赤血球浮遊液を作成し、試験管内で試薬と等量混合して目視にて agglutination を確認するものである(113)。しかし、試験管法は血球の遠心分離、洗浄に時間と手間がかかる。現代の臨床検査室においては、カラム法(115)やマイクロプレート法(116)といった高感度かつ自動化された手法が普及してきている。また、Waveguide mode センサ (117)や、マイクロfluidイクス(118,119)、表面プラズモン共鳴 (Surface plasmon resonance; SPR) (120)などの技術を用いた新しい測定法も報告されている。



	Forward Test		Reverse Test	
	Anti-A antibody	Anti-B antibody	Type A erythrocyte	Type B erythrocyte
Type A	Positive	Negative	Negative	Positive
Type B	Negative	Positive	Positive	Negative
Type O	Negative	Negative	Positive	Positive
Type AB	Positive	Positive	Negative	Negative

Fig. 5. 1 Blood Group Typing by Tube method.



### 5-1-3. 血液型判定手法における課題

前項にて述べた様々な手法は、agglutinationを検出するタイプの測定法であり、フィブリノゲン等の血漿タンパクと赤血球の相互作用によって生じる赤血球の連鎖・凝集(aggregation)(121)を、誤って検出することを避けなければならない(122)。Aggregationは健常状態においても生じ、炎症性疾患ではさらに増加する(44)。従って、上記の手法において、aggregationを起こす血漿タンパクの排除のための希釈や遠心分離工程が必要であり(123)、検査に手間と時間がかかっていた。また、agglutinationによる凝集塊を目視可能なサイズに成長させるため、血液量に対して、等量かそれ以上の高い混合比率で試薬を混合する必要があり、コストがかかるものであった。

### 5-1-4. 本章における研究の目的

本章では、血液型判定において従来は排除する対象であった赤血球凝集(aggregation)を、syllectometryを用いて定量的に測定することで、血液型抗原抗体反応由来の凝集(agglutination)の発生を検出し、血液型判定を行うことを提案する。Syllectometryは、これまで示したように、赤血球間の相互作用の変化を高感度に検出可能であるため、血液の洗浄や希釈を必要とせず、かつ微量の抗体試薬量で起こるagglutinationを検出し、血液型を判定することができると考えられる。本研究では、肉眼でのagglutinationの検出が困難なほどの低い混合比率で抗体試薬と血液を混合し、syllectometryを用いて血液型を判定可能であるか調査を行った。

## 5-2. 実験方法

### 5-2-1. 試料作製

本実験は、芝浦工業大学生命生命工学研究倫理審査委員会の承認の下行われた(承認番号#21-006). 書面にて同意を得た 20 名の健常者 (A, B, O, AB 型各 5 名) から, 21G の採血針 (Terumo Corp., Tokyo) を使用して静脈血を採血し, 採血された血液を速やかに K2-EDTA にて抗凝固処理した. 抗 A 抗体試薬(Anti-A)および抗 B 抗体試薬(Anti-B) (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) によるオモテ試験と, A 型血球および B 型血球 (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) によるウラ試験により血液型を判定した. なお, 判定にはスライド法および試験管法を用いて, 試薬と試料を等量ずつ混合し, 肉眼にて agglutination を確認した. 次に, 採血した血液に対して抗 A 抗体試薬および抗 B 抗体試薬を 2.5, 5, 7.5, 10% (v/v) の比率にて混合した 400  $\mu$ L のサンプルを各 2 バイアル作製し, syllectogram 測定に使用した. 試薬を添加していない血液をコントロールとし, 同様に実験に供した. なお, 試薬と血液の混合は測定の直前に行われ, 10 回の転倒混和の後に測定された. 本章では, 血液型由来の抗原抗体反応が陽性である混合条件を”positive”, 陰性である条件を”negative”と呼ぶこととする.

### 5-2-2. 目視および顕微鏡による Agglutination の観察

各混合比率のサンプルにおいて, 目視および顕微鏡で凝集状態の確認を行った. 各試薬混合条件にて, syllectogram 測定に使用したサンプル 50  $\mu$ L をスライドガラス上に滴下し, 1 分以上経過後に目視による凝集の観察を行った. 各試薬混合条件のサンプルの一部を用いて, aggregation が発生しない生理食塩水で 200 倍希釈したものと, aggregation が発生する自己血漿で 150 倍に希釈したものを, 4-2-3 と同様の方法にて顕微鏡観察を行った.

### 5-2-3. Syllectogram の測定

Syllectogram の測定は、第 2 章で使用した測定装置 (MEK-1305; Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan) を用いて行った。本実験では、Fig. 5. 2 に示すように、10 秒間の Syllectogram から、赤血球凝集量および凝集速度を反映するパラメータである AMP, AI と、syllectogram における開始時間および最終時間における透過光量である  $I_{\min}$  と  $I_{\max}$  を得た。装置にて使用しているせん断速度 ( $335 \text{ s}^{-1}$ ) は、aggregation を十分に解離させるために必要なせん断速度 ( $200 \text{ s}^{-1}$ ) (20) より大きく、かつ赤血球の抗原抗体結合の解離に必要なせん断速度 ( $600 \text{ s}^{-1}$ ) (124) 未満である。従って、negative では、aggregation のみの syllectogram が観測されるため、 $I_{\min}$  や AMP が大きいのが、一方の positive では、測定開始時にすでに agglutination が存在し、凝集した状態であるため、 $I_{\min}$  が negative よりも高く、結果として AMP が小さいと予想される。測定の直前に血液とそれぞれの条件で抗体試薬を混合した後、速やかに装置での測定を実施した。測定は複製した 2 バイアルにて二重測定し、合計 4 回の測定結果を得た。なお、試薬との混合から 1 回目の測定開始時間(装置内における測光開始時間)は約 1 分後であり、2 回目の測定開始時間は、混合から 3 分後であった。解析に使用する値は 4 回測定の平均値とし、各凝集パラメータにおける positive と negative の比較を行った。また、混合後における経過時間の影響を確認するため、1 回目と 2 回目の測定値について比較を実施した。

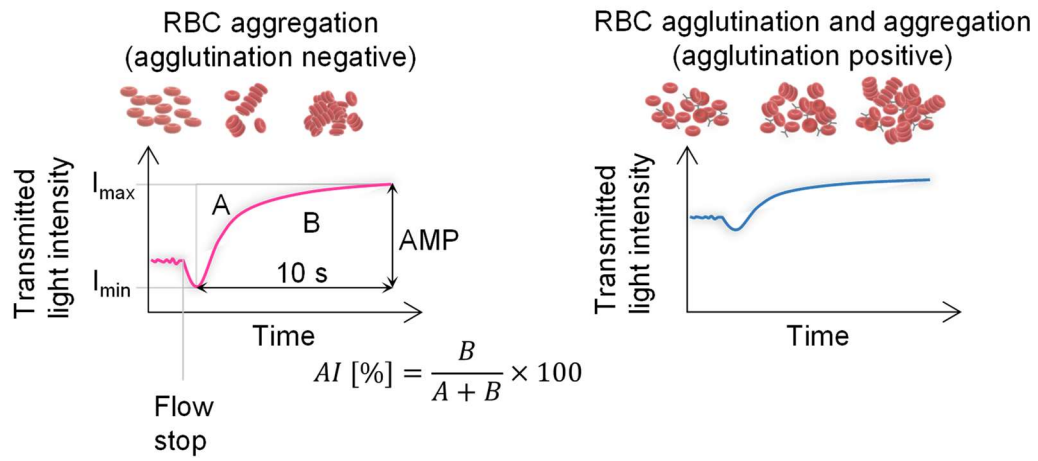


Fig. 5. 2 Image of a Syllectogram of Agglutination-negative and -positive Samples.

### 5-3. 結果および考察

#### 5-3-1. Agglutination の観察

Fig. 5.3A に、各混合条件の試料を生理食塩水で 200 倍希釈したサンプルと、無希釈のサンプルの顕微鏡画像を示す。Positive においてのみ顕微鏡下にて agglutination が確認され、その凝集の強度は試薬の混合比率と共に増加していた。また、無希釈のサンプル画像では、いずれの条件においても agglutination による変化を目視で確認することはできなかった。従って、本混合比率は、検査者が目視で agglutination を確認することが困難なほど低いが、確実に agglutination が生じているものであると示された。一方で、血漿で 150 倍希釈した顕微鏡画像(Fig. 5.3B)では、試薬混合率が 2.5%では、不規則な赤血球の凝集体である agglutination と、連鎖 (aggregation) がそれぞれ存在している様子が確認できた。試薬混合率 10%では、2.5%と比較して、若干ではあるが、連鎖が少なく agglutination の割合が多い傾向にあった。

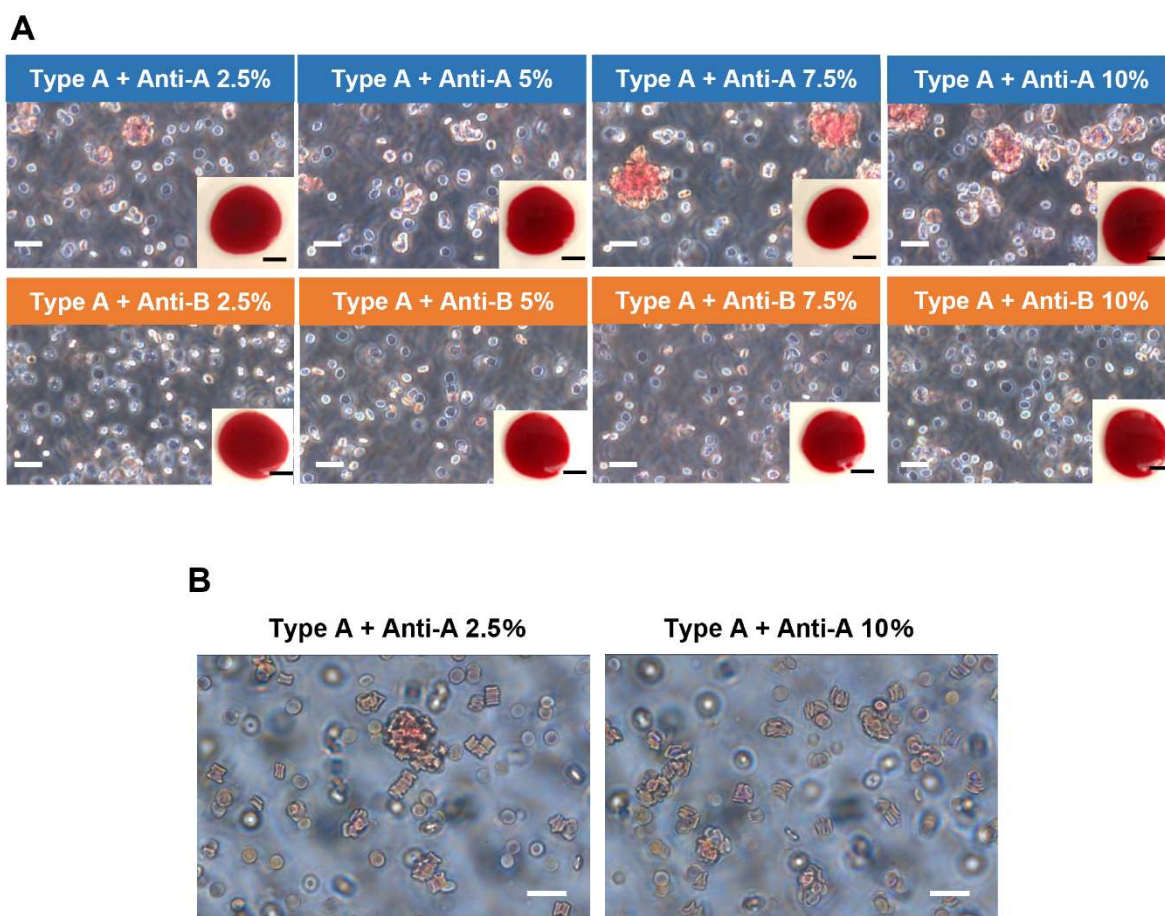


Fig. 5. 3 Microscope Images of a Representative Sample Mixed with Antibody Reagent.

(A) Microscope images of samples diluted 200 times with saline at antibody reagent volume ratios of 2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10%. The scale bar indicates 20  $\mu\text{m}$ . The image inserted at the lower right is a blood image obtained using the slide method, and the scale bar indicates 5 mm. (B) Microscope images of type A blood diluted 150 times with autologous plasma at antibody reagent volume ratios of 2.5% and 10%. The scale bar indicates 20  $\mu\text{m}$ .

### 5-3-2. 各試薬混合率における syllectogram と凝集パラメータ

Fig. 5.4 に各抗体試薬混合率における syllectogram の一例を示す。すべての混合率において、時間経過に伴い透過光強度の増加が見られたが、positive と negative ではシレクトグラムに顕著な差が見られた。Positive では、試薬混合率の増加とともに、透過光強度の最低値である  $I_{\min}$  が増加し、AMP が減少した。一方、negative では、試薬混合率の増加とともに  $I_{\min}$  は減少し、AMP は positive よりも小さくなった。syllectogram の詳細な解析結果は次項に述べる。

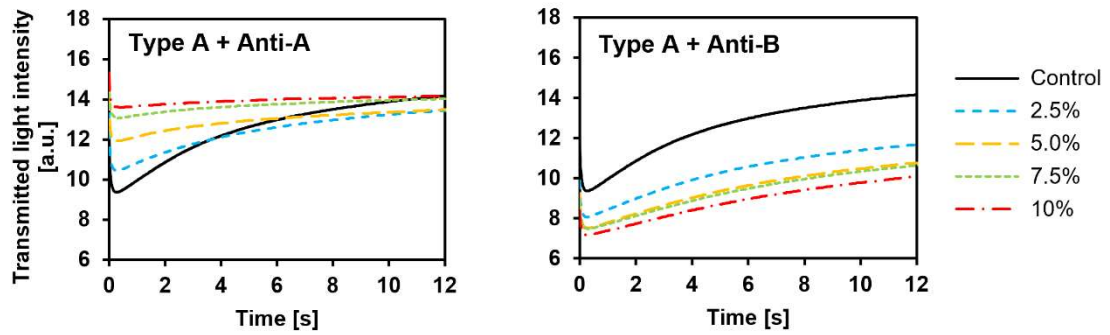


Fig. 5. 4 Syllectogram from a Representative Measurement of Agglutination-positive and -negative Samples (blood type A with the addition of anti-A or anti-B antibody reagent at concentrations of 0 (control), 2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10%, respectively).



### 5-3-3. 各血液型における、抗 A および抗 B 試薬混合時の凝集パラメータの比較

次に、各血液型、各試薬混合率における syllectogram を解析して得られた凝集パラメータ AMP, AI,  $I_{min}$ ,  $I_{max}$  を Fig. 5.5 に示す。Negative では、すべての凝集パラメータは試薬混合率の増加とともに減少したが、positive では、いくつかの凝集パラメータにおいて試薬混合率の増加に伴い、negative と異なる値を示した。凝集量の変化を示す AMP の平均値は、A 型、B 型のほとんどの試薬混合率において negative より positive の方が有意に低く ( $p < 0.05$ )、その差は試薬混合率の増加に伴い大きくなった。これは、positive では測定開始時に agglutination が存在し、連鎖形成可能な個々の赤血球が減少したために、aggregation が進まなかったものと考えられる。

Aggregation のない透過光強度である  $I_{min}$  は、positive では試薬混合率の増加とともに増加する傾向があり、試薬混合率 5% (A 型血) または 7.5% (B 型血) 以上で negative よりも優位に大きかった ( $p < 0.05$ )。また、positive における試薬混合率の増加に対する AI と  $I_{max}$  の変化は小さく、試薬混合率が 7.5% (AI) または 10% (AI,  $I_{max}$ ) のときに negative よりも有意に大きな値を示した ( $p < 0.05$ )。O 型と AB 型については、抗 A 試薬と抗 B 試薬を用いた試料の間で、いずれの凝集パラメータにも差は認められなかった。

本実験結果を考察するにあたり、agglutination が関与しない条件、すなわち negative における抗体試薬が syllectogram に与える影響について考察する必要がある。まず、試薬の混合によるヘマトクリット低下の影響が考えることとする。過去の報告により、ヘマトクリット低下により AI は減少し(125,126)、AMP はヘマトクリット 40%付近でピークを示す(40,127)。しかし、本実験におけるヘマトクリットの減少はコントロールに対して 10%以下であり(コントロールのヘマトクリット範囲は 36.8%から 49%)、そのヘマトクリット範囲での影響はわずか数%と推定される。従って、negative で AI, AMP が減少したのは、ヘマトクリット以外の要因によるものと考えられる。抗体試薬には、aggregation を阻害することが報告されているアルブミンが含まれており(128)、アルブミンが negative の AMP, AI,  $I_{max}$  の低下させた可能性がある。 $I_{min}$  はヘマトクリットの減少に伴い増加するはずであるが(126)、本実験では  $I_{min}$  が減少した (Fig. 5.5)。この要因の調査のため試薬の吸光特性を調べたが、LED の波長 (870 nm) 付近に吸光特性は認められなかった。また、顕微鏡画像 (Fig. 5.3) で確認した赤血球の形態や、CBC 測定から得た MCV にも大きな変化は見られなかった。aggregation が増加すると  $I_{min}$  が増加することから、negative における  $I_{min}$  の減少は、試薬に含まれるアルブミンによる aggregation の低下が要因であると思われる。

Positive の結果は、抗原抗体反応による agglutination の増加と、上記に述べた試薬の影響による aggregation の低下が合成された結果として考えることができる。測定開始時にすでに agglutination が存在し、凝集が進んだ状態であるため、 $I_{min}$  が negative よりも高かったと考えられる。同時に、測定開始時にはすでに連鎖形成可能な赤血球数が減っているために aggregation の成長は早期に収束し、結果として AMP が小さく、AI が高くなったと予想される。一方で、Positive の AI,  $I_{min}$  および  $I_{max}$  が試薬混合率 2.5%から 10%で増加したが、コントロールと 2.5%の間では減少していたのは、上記に述べた試薬の影響による aggregation の低下の影響によるものであると考えられる。全ての凝集パラメータの中で、AMP が最も感度良く agglutination を検出可能であると考えられたため、以降は AMP を用いた血液型判定について述べる。

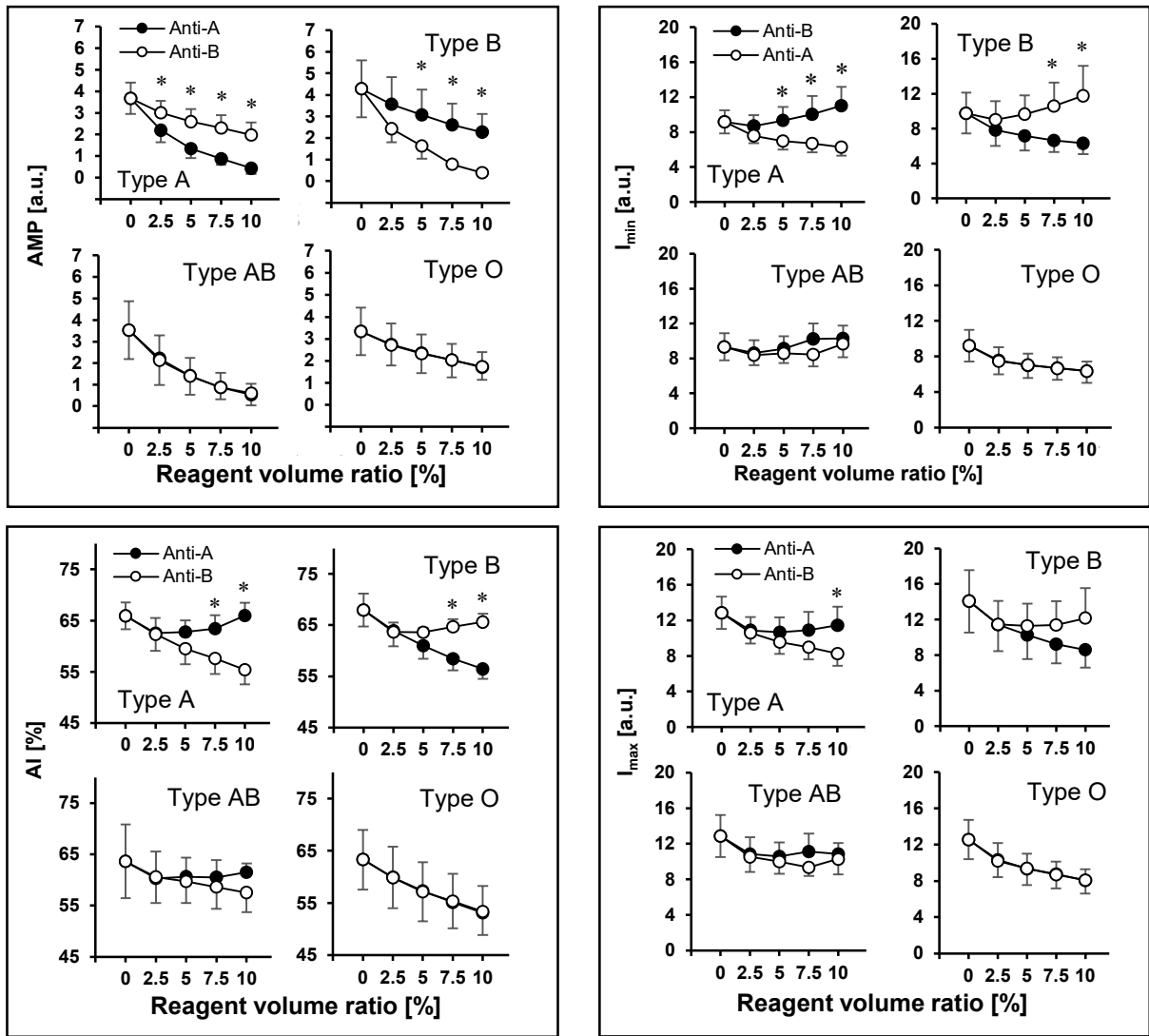


Fig. 5. 5 Relationship between the antibody reagent volume ratio and the aggregation parameters for each blood type. Error bars indicate SD (n = 5). \* $p < 0.05$  (Welch's  $t$ -test).

#### 5-3-4. 測定値の二重測定再現性

本実験における測定値のばらつきには、第 4 章で示したように aggregation の個人差が影響していると考えられるが、サンプル 1 バイアル各 2 回の測定間隔 (約 3 分) における、抗体試薬の反応時間の差も要因として排除できない。Fig. 5.6 に本手法における AMP の二重測定の再現性評価として、2 測定間の相関図と Bland Altman 解析の結果を示す。AMP における 2 重測定の再現性は非常に良好であり ( $r = 0.995$ ,  $n = 320$ )、1 回目の測定値の平均と 2 回目の測定値の平均値の間に統計的な有意差は無かった ( $1.85 \pm 1.10$  vs.  $1.84 \pm 1.06$ )。なお、他の行雄パラメータにおいても同様に、二重測定における大きな差は認められなかった。この結果から、AMP の測定値の再現性は高く、かつ 2 回の測定間における抗体試薬の反応時間の差も無いことが明らかになった。

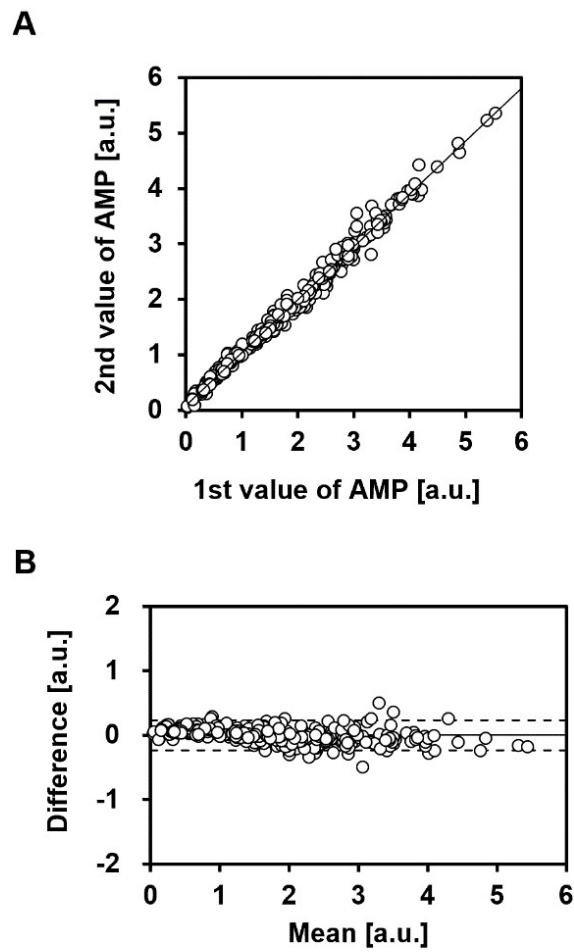


Fig. 5. 6 Reproducibility of the AMP value.

(A) Relationship between the first and second measurements for AMP. Correlation coefficient for AMP,  $r = 0.995$  ( $n = 320$ ). The solid line represents the regression line. The first measurement was performed 1 min after mixing, and the second measurement was performed 3 min after mixing. (B) Bland Altman plot for the first and second measurements of AMP. The solid line represents the bias. The dotted line indicates 1.96 SD.

### 5-3-5. Positive と negative 間における AMP および AMP の相対値の比較

血液型検査への応用のためには、すべての血液型と抗 A 試薬および抗 B 試薬を含めた場合の positive と negative の差が十分に大きいことが必要となる。全ての positive および negative 間の AMP の比較を Fig. 5. 7A に示す。全ての試薬混合率において positive と negative 間の AMP に有意差 ( $p < 0.05$ ) が得られたが、個人差によるばらつきが比較的大きかった。AMP の個人差をキャンセルし、血液型判定精度を向上させるため、コントロールの AMP に対する試薬混合後の AMP の相対値を求めたものを Fig. 5. 7B に示す。得られた AMP の相対値では、測定値のばらつきが減少し、試薬混合率が最も低い 2.5%でも、positive と negative の差はより明確となった ( $p < 0.01$ )。各試薬混合率における positive および negative の平均値を agglutination 検出の閾値として判定した被験者 20 名の血液型は、試験管法で求めたものと全て一致した。

今回使用した臨床用血液型判定試薬のマニュアルには、スライド法および試験管法では 50%の試薬混合率を使用することが指示されている。本研究で用いた最も低い試薬混合率(2.5%)は、標準値の 1/20 であり、肉眼で agglutination を検出することは困難であったが、sylectometry では検出可能であった。先行研究(129)では、市販の抗体試薬を数十%以上の混合率で用いており、それらの方法と比較しても、本手法は低濃度の試薬でも凝集を検出できる高感度な方法であると言える。なお、本手法は、チャンバ内で静的に測定する吸光度測定法(130)とは異なる。Fig. 5. 4 に示すように、少量の抗体試薬を全血に混合しただけの場合、aggregation の成長により透過光強度が時間と共に増加するため、微小な agglutination を検出するには、aggregation を解離させるせん断速度が必要となる。したがって、静的な吸光測定法(130)に限らず、少量の抗体試薬による全血中の微小な agglutination を検出することはできないはずである。しかし、aggregation は血液型による違いはないものの(131)、血漿フィブリノゲン濃度に依存し(125)、個人差だけでなく体の状態によっても変化する。そのため、本手法では、コントロールに対する相対値を用いる必要があり、さらに、aggregation の低い検体では判定精度が低下する可能性がある。また、本法は濃厚赤血球を必要とするため、他の光学的手法では可能であった、市販の希薄な血球試薬を用いたウラ試験を行うことは困難である可能性が高い(132)。しかし、本技術は従来報告されている方法とは異なる新しい血液型判定法であり、希釈や洗浄などの手間のかかる前処理を必要としないという利点がある。さらに、抗体試薬の混合比を標準の 1/5~1/20 で行うことができ、検査工程の短縮・簡略化、コスト削減に役立つと考えられる。

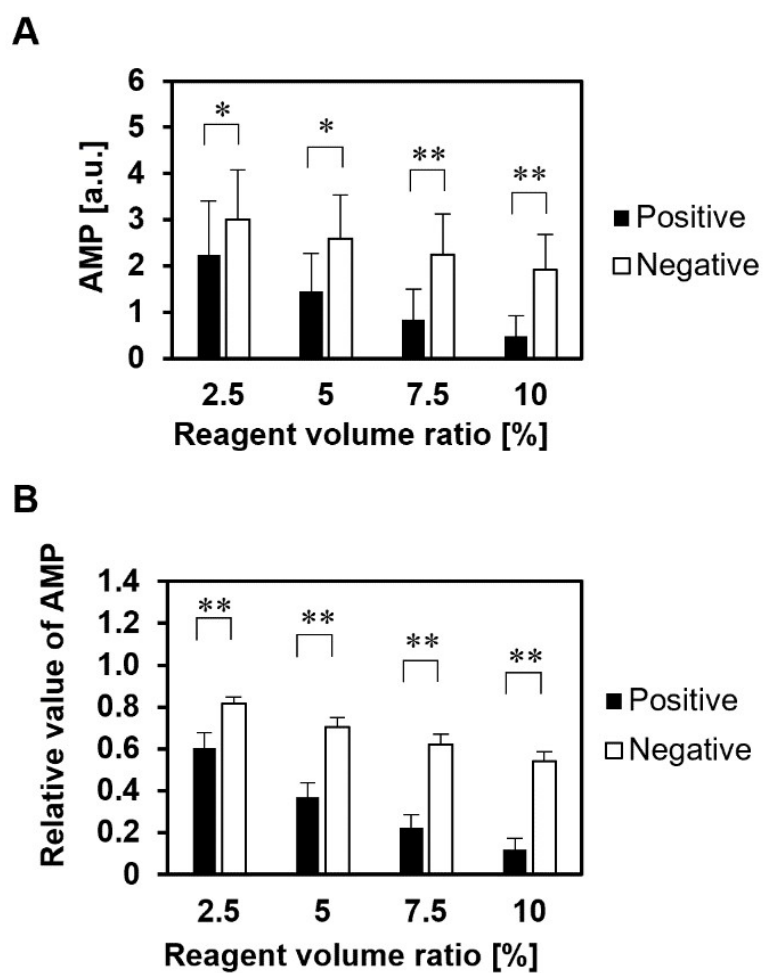


Fig. 5. 7 Comparison of the aggregation parameter AMP between the positive and negative conditions.

(A) AMP. Error bars indicate SD ( $n = 20$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Welch's  $t$ -test). (B) Relative value of AMP. Error bars indicate SD ( $n = 20$ ). \*\* $p < 0.01$  (Welch's  $t$ -test).

#### 5-4. 結論

本研究では、syllectometry を用いた新しい血液型判定法を提案した。その結果、肉眼や従来法では検出が困難であった、血漿タンパクと赤血球の相互作用による連鎖・凝集 (aggregation) と共存する血液型抗原抗体反応由来の赤血球凝集塊 (agglutination) の検出に成功した。そして、コントロールに対する AMP の相対値を用いて、20 名の血液型 (ABO 血液型各 5 名) を判定することに成功した。本手法は、血球の遠心分離と、洗浄や希釈を必要としないため、迅速かつ簡便な手法であり、かつ試薬混合率も従来法の 1/5~1/20 に削減可能である。

#### 備考

本章における成果は、以下に示す雑誌にて査読中である。

**Higuchi M**, Sekiba Y, Watanabe N. Novel blood typing method by discrimination of hemagglutination and rouleaux using an erythrocyte aggregometer. *Clinical hemorheology and microcirculation*.





## 第6章 各章の総括および展望

本研究では、現在の血液検査における課題である、検査時間の短縮化、前処理の簡略化、試薬・消耗品の削減に対し、赤血球凝集能を迅速かつ簡便に測定する手法である *sylllectometry* を応用することにより、上記課題を解決可能な3つの血液検査手法を開発した。

1. 迅速かつ正確な赤血球沈降速度 (ESR)測定法の開発と検証においては、測光時間 5 s の *sylllectogram* から得た *Aggregation Index* に対するヘマトクリットの影響を補正することにより、ESR を迅速かつ正確に計算する手法を構築した。さらに、沈降速度を MCV にて補正することにより、精度を向上させることに成功し、200 を超える臨床検体において本手法が有効であることを実証した。本件に関する技術は、ESR および CBC を同時測定可能な装置として、すでに日本光電工業株式会社が発売している。本技術が世界に広く普及し、炎症性疾患のスクリーニング検査やフォローアップにおける検査時間の短縮とコスト削減に貢献することを期待する。また、今後は、個々の乖離データに関する原因説明を行い、血漿の粘度等、本研究で考慮していないパラメータを簡易的に取得し、計算式に取り入れることにより、さらなる精度向上の可能性はある。

2. 赤血球凝集測定を用いた血液凝固障害の検出のための基礎検討においては、これまで着目されてこなかった低濃度のフィブリノゲン血液における赤血球凝集パラメータを *sylllectometry* を用いて明らかにし、重度外傷、危機的産科出血、心臓血管外科手術等において致死的な凝固障害を引き起こす 150 mg/dL 以下のフィブリノゲン濃度を検出できる可能性を示唆した。本技術は、血漿の遠心分離や凝固試薬との反応が不要な、簡便かつ低コストな低濃度フィブリノゲン検出を可能とするものである。しかしながら、臨床検体の測定に応用するためには、本実験では考慮されていない、様々な血漿タンパク、線溶および治療において投与される輸液、薬剤等の影響を今後評価していく必要がある。

3. 赤血球凝集測定を用いた ABO 血液型判定法の開発においては、*sylllectometry* を用いて血漿タンパクと赤血球の相互作用による連鎖・凝集 (*aggregation*) と共存する血液型抗原抗体反応由来の赤血球凝集塊 (*agglutination*) を検出し、20名の ABO 血液型を判定することに成功した。本手法は、血球の遠心分離と、洗浄や希釈を必要としないため、迅速かつ簡便な手法であり、かつ試薬混合率も従来法の 1/5~1/20 に削減可能である。今後は、弱い *agglutination* や非特異抗体等、様々な臨床背景を有する血液検体や、保存された輸血用血液においても適用可能であるかの検証が必要である。

## 第7章 結論

本研究では赤血球凝集能測定を利用して以下の3つの血液検査手法を開発した.

1. ESRの迅速かつ正確な測定
2. 迅速かつ簡便な低濃度フィブリノゲンの検出
3. 前処理不要かつ試薬量削減可能な血液型判定

1においては、古くから研究されてきた、疾患に付随して変化する赤血球凝集能そのものの測定法を改良することで、赤血球凝集能測定の臨床的利便性を最大化を行い、2と3においては、赤血球凝集の特性と *sylectometry* を利用した新しいバイオセンシング手法の可能性を示したと言える。本研究成果が、臨床の血液検査における検査時間の短縮化、前処理の簡略化、試薬・消耗品の削減に寄与し、臨床のワークフローの改善と医療経済性の向上を実現することを期待する。

## 引用文献一覧

1. Tomaiuolo G. Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics. *Biomicrofluidics*. 2014 Sep;8(5):051501.
2. Takami A, Watanabe S, Yamamoto Y, Kondo H, Bamba Y, Ohata M, et al. Reference intervals of red blood cell parameters and platelet count for healthy adults in Japan. *Int J Hematol*. 2021 Sep 2;114(3):373–80.
3. Canham PB, Burton AC. Distribution of Size and Shape in Populations of Normal Human Red Cells. *Circ Res*. 1968 Mar;22(3):405–22.
4. McMahon TJ. Red Blood Cell Deformability, Vasoactive Mediators, and Adhesion. *Front Physiol*. 2019 Nov 15;10.
5. Helms CC, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. Erythrocytes and Vascular Function: Oxygen and Nitric Oxide. *Front Physiol*. 2018 Feb 22;9.
6. Smith AS, Nowak RB, Zhou S, Giannetto M, Gokhin DS, Papoin J, et al. Myosin IIA interacts with the spectrin-actin membrane skeleton to control red blood cell membrane curvature and deformability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018 May 8;115(19).
7. Kuck L, Peart JN, Simmonds MJ. Active modulation of human erythrocyte mechanics. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2020 Aug 1;319(2):C250–7.
8. Simmons P, Penny R, Goller I. PLASMA PROTEINS A REVIEW. *Medical Journal of Australia*. 1969 Sep;2(10):494–506.
9. Whitmore RL. *Rheology of the circulation*. Pergamon Press; 1968.
10. Chien S. Shear Dependence of Effective Cell Volume as a Determinant of Blood Viscosity. *Science (1979)*. 1970 May 22;168(3934):977–9.
11. Lanotte L, Mauer J, Mendez S, Fedosov DA, Fromental JM, Claveria V, et al. Red cells' dynamic morphologies govern blood shear thinning under microcirculatory flow conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Nov 22;113(47):13289–94.
12. Cross MM. Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems. *J Colloid Sci*. 1965 Jun;20(5):417–37.
13. Walburn FJ, Schneck DJ. A constitutive equation for whole human blood. *Biorheology*. 1976 Jun 1;13(3):201–10.
14. Byron Bird R, Carreau PJ. A nonlinear viscoelastic model for polymer solutions and melts—I. *Chem Eng Sci*. 1968;23(5):427–34.
15. Gambaruto AM, M\_Janela J, Moura A, Sequeira A. Sensitivity of hemodynamics in a patient specific cerebral aneurysm to vascular geometry and blood rheology. *Mathematical Biosciences and Engineering*. 2011;8(2):409–23.
16. Baskurt OK, Meiselman HJ. Erythrocyte aggregation: Basic aspects and clinical importance. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2013;53(1–2):23–37.
17. Chien S. Biophysical Behavior of Red Cells in Suspensions. In: *The Red Blood Cell*. Elsevier; 1975. p. 1031–133.
18. Asakura S, Oosawa F. On Interaction between Two Bodies Immersed in a Solution of

- Macromolecules. *J Chem Phys.* 1954 Jul;22(7):1255–6.
19. Baskurt OK, Boynard M, Cokelet GC, Connes P, Cooke BM, Forconi S, et al. New guidelines for hemorheological laboratory techniques. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009;42(2):75–97.
  20. Friebel M, Helfmann J, Müller G, Meinke M. Influence of shear rate on the optical properties of human blood in the spectral range 250 to 1100 nm. *J Biomed Opt.* 12(5):054005.
  21. Lazari D, Freitas Leal JK, Brock R, Bosman G. The Relationship Between Aggregation and Deformability of Red Blood Cells in Health and Disease. *Front Physiol.* 2020;11:288.
  22. Kahane I, Ben-Chetrit E, Shifter A, Rachmilewitz EA. The erythrocyte membranes in  $\beta$ -thalassemia. Lower sialic acid levels in glycophorin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1980 Feb;596(1):10–7.
  23. Hanson VA, Shettigar UR, Loungani RR, Nadijcka MD. Plasma sialidase activity in acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1987 Jul;114(1):59–63.
  24. Bäumler H, Neu B, Mitlöhner R, Georgieva R, Meiselman HJ, Kiesewetter H. Electrophoretic and aggregation behavior of bovine, horse and human red blood cells in plasma and in polymer solutions. *Biorheology.* 2001;38(1):39–51.
  25. Windberger U, Bartholovitsch A, Plasenzotti R, Korak KJ, Heinze G. Whole Blood Viscosity, Plasma Viscosity and Erythrocyte Aggregation in Nine Mammalian Species: Reference Values and Comparison of Data. *Exp Physiol.* 2003 May;88(3):431–40.
  26. Maeda N, Seike M, Kume S, Takaku T, Shiga T. Fibrinogen-induced erythrocyte aggregation: erythrocyte-binding site in the fibrinogen molecule. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1987 Nov;904(1):81–91.
  27. Maeda N, Seike M, Nakajima T, Izumida Y, Sekiya M, Shiga T. Contribution of glycoproteins to fibrinogen-induced aggregation of erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1990 Feb;1022(1):72–8.
  28. Izumida Y, Seiyama A, Maeda N. Erythrocyte aggregation: Bridging by macromolecules and electrostatic repulsion by sialic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1991 Aug;1067(2):221–6.
  29. Carvalho FA, Connell S, Miltenberger-Miltenyi G, Pereira SV, Tavares A, Ariëns RAS, et al. Atomic Force Microscopy-Based Molecular Recognition of a Fibrinogen Receptor on Human Erythrocytes. *ACS Nano.* 2010 Aug 24;4(8):4609–20.
  30. Foresto P, D'Arrigo M, Carreras L, Cuzzo RE, Valverde J, Rasia R. Evaluation of red blood cell aggregation in diabetes by computerized image analysis. *Medicina (B Aires).* 2000;60(5 Pt 1):570–2.
  31. Fukase A, Nagasawa K, Mori S, Arakawa M, Yashiro S, Ishigaki Y, et al. Correlation between Red Blood Cell Aggregation and Blood Glucose Level. In: 2019 IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS). IEEE; 2019. p. 45–7.
  32. Chen G, Zhao J, Li P, Kan X, You G, Wang Y, et al. Effects of synthetic colloid and crystalloid solutions on hemorheology in vitro and in hemorrhagic shock. *Eur J Med Res.* 2015 Dec 4;20(1):13.
  33. Engeset J, Stalker AL, Matheson NA. EFFECTS OF DEXTRAN 40 ON ERYTHROCYTE AGGREGATION. *The Lancet.* 1966 May;287(7447):1124–7.

34. Neu B, Wenby R, Meiselman HJ. Effects of Dextran Molecular Weight on Red Blood Cell Aggregation. *Biophys J*. 2008 Sep;95(6):3059–65.
35. Chen S, Gavish B, Zhang S, Mahler Y, Yedgar S. Monitoring of erythrocyte aggregate morphology under flow by computerized image analysis. *Biorheology*. 1995 Jul;32(4):487–96.
36. Kishimoto S, Maruhashi T, Kajikawa M, Matsui S, Hashimoto H, Takaeko Y, et al. Hematocrit, hemoglobin and red blood cells are associated with vascular function and vascular structure in men. *Sci Rep*. 2020 Jul 10;10(1):11467.
37. Herlihy BL. *The Human Body in Health and Illness*. 3rd ed. WB Saunders Co.; 2006.
38. Fabry TL. Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood*. 1987 Nov;70(5):1572–6.
39. Baskurt OK, Meiselman HJ, Kayar E. Measurement of red blood cell aggregation in a “plate-plate” shearing system by analysis of light transmission. *Clin Hemorheol Microcirc*. 1998 Dec;19(4):307–14.
40. Shin S, Yang Y, Suh JS. Measurement of erythrocyte aggregation in a microchip stirring system by light transmission. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;41(3):197–207.
41. Maeda N, Seike M, Shiga T. Effect of temperature on the velocity of erythrocyte aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1987 Nov;904(2):319–29.
42. Neumann FJ, Schümid-Schoenbein H, Ohlenbusch H. Temperature-dependence of red cell aggregation. *Pflugers Arch*. 1987;408(5):524–30.
43. Brigden ML. Clinical utility of the erythrocyte sedimentation rate. *Am Fam Physician*. 1999 Oct 1;60(5):1443–50.
44. Ami R ben, Barshtein G, Zeltser D, Goldberg Y, Shapira I, Roth A, et al. Parameters of red blood cell aggregation as correlates of the inflammatory state. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001 May 1;280(5):H1982–8.
45. Tanahashi N, Gotoh F, Tomita M, Shinohara T, Terayama Y, Mihara B, et al. Enhanced erythrocyte aggregability in occlusive cerebrovascular disease. *Stroke*. 1989 Sep;20(9):1202–7.
46. Maeda N. Erythrocyte rheology and oxygen transfer in microcirculatory system. *Journal of Biorheology*. 2015;29(1):2–5.
47. Bosschaart N, Edelman GJ, Aalders MCG, van Leeuwen TG, Faber DJ. A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood. *Lasers Med Sci*. 2014 Mar 12;29(2):453–79.
48. Jubran A. Pulse oximetry. *Crit Care*. 2015 Dec 1;19(1):272.
49. Hamaoka T, McCully KK. Review of early development of near-infrared spectroscopy and recent advancement of studies on muscle oxygenation and oxidative metabolism. *The Journal of Physiological Sciences*. 2019 Nov 29;69(6):799–811.
50. Swinehart DF. The Beer-Lambert Law. *J Chem Educ*. 1962 Jul 1;39(7):333.
51. Bosschaart N, Edelman GJ, Aalders MCG, van Leeuwen TG, Faber DJ. A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood. *Lasers Med Sci*. 2014 Mar 12;29(2):453–79.

52. Westergren A. Studies of the Suspension Stability of the Blood in Pulmonary Tuberculosis1. *Acta Med Scand.* 1921 Apr 24;54(1):247–82.
53. Jou JM, Lewis SM, Briggs C, Lee SH, de La Salle B, Mcfadden S. ICSH review of the measurement of the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol.* 2011 Apr;33(2):125–32.
54. Fåhræus R. THE SUSPENSION STABILITY OF THE BLOOD. *Physiol Rev.* 1929 Apr 1;9(2):241–74.
55. Sox HC. Diagnostic Decision: The Erythrocyte Sedimentation Rate: Guidelines for Rational Use. *Ann Intern Med.* 1986 Apr 1;104(4):515.
56. ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. International Council for Standardization in Haematology (Expert Panel on Blood Rheology). *J Clin Pathol.* 1993 Mar 1;46(3):198–203.
57. Kratz A, Plebani M, Peng M, Lee YK, McCafferty R, Machin SJ. ICSH recommendations for modified and alternate methods measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Int J Lab Hematol.* 2017 Oct;39(5):448–57.
58. Maeda N, Seike M, Imaizumi K, Kon K, Shiga T. Erythrocyte Aggregation Induced by Immunoglobulin G and Related Macromolecules Studied with Rheoscope-Image Analyzer-Computer System. In: *Microcirculation in Circulatory Disorders.* Tokyo: Springer Japan; 1988. p. 439–44.
59. Zijlstra WG. Sylllectometry, a new method for studying rouleaux formation of red blood cells. *Acta Physiol Pharmacol Neerl.* 1958;7:153–4.
60. Tomita M, Gotoh F, Tanahashi N, Turcani P. Whole-blood red blood cell aggregometer for human and feline blood. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 1986 Dec 1;251(6):H1205–10.
61. Hardeman MR, Dobbe JG, Ince C. The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2001;25(1):1–11.
62. Dobbe JGG, Streekstra GJ, Strackee J, Rutten MCM, Stijnen JMA, Grimbergen CA. Sylllectometry: the effect of aggregometer geometry in the assessment of red blood cell shape recovery and aggregation. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2003 Jan;50(1):97–106.
63. Isiksacan Z, Erel O, Elbuken C. A portable microfluidic system for rapid measurement of the erythrocyte sedimentation rate. *Lab Chip.* 2016;16(24):4682–90.
64. Baskurt OK, Uyklu M, Ozdem S, Meiselman HJ. Measurement of red blood cell aggregation in disposable capillary tubes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2011;47(4):295–305.
65. Gyawali P, Ziegler D, Cailhier JF, Denault A, Cloutier G. Quantitative Measurement of Erythrocyte Aggregation as a Systemic Inflammatory Marker by Ultrasound Imaging: A Systematic Review. *Ultrasound Med Biol.* 2018 Jul;44(7):1303–17.
66. Nagasawa K, Fukase A, Mori S, Arakawa M, Yashiro S, Ishigaki Y, et al. Evaluation method of the degree of red blood cell aggregation considering ultrasonic propagation attenuation by analyzing ultrasonic backscattering properties. *Journal of Medical Ultrasonics.* 2021 Jan 12;48(1):3–12.
67. Baskurt OK, Uyklu M, Meiselman HJ. Simultaneous monitoring of electrical conductance and light transmittance during red blood cell aggregation. *Biorheology.* 2009;46(3):239–49.

68. 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 Trans Biomed Eng.* 2010 Apr;57(4):969–78.
69. Lee K, Kinnunen M, Khokhlova MD, Lyubin E v., Priezzhev A v., Meglinski I, et al. Optical tweezers study of red blood cell aggregation and disaggregation in plasma and protein solutions. *J Biomed Opt.* 2016 Mar 8;21(3):035001.
70. 人口推計(2021年10月1日現在). 総務省統計局. 2022.
71. 令和元(2019年度) 国民医療費の概況.
72. Kernick D, Jay AWL, Rowlands S. Erythrocyte Settling. *Can J Physiol Pharmacol.* 1974 Dec 1;52(6):1167–77.
73. Stokes G. On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums. In: *Mathematical and Physical Papers.* Cambridge University Press; 1851. p. 1–10.
74. Oka S. A physical theory of erythrocyte sedimentation. *Biorheology.* 1985 Aug 1;22(4):315–21.
75. Mayer J, Pospíšil Z, Litzman J. The mechanism of erythrocyte sedimentation in Westergren's examination. *Biorheology.* 1992 Jun 1;29(2–3):261–71.
76. Holley L, Woodland N, Hung WT, Cordatos K, Reuben A. Influence of fibrinogen and haematocrit on erythrocyte sedimentation kinetics. *Biorheology.* 1999;36(4):287–97.
77. Puccini C, Stasiw DM, Cerny LC. The erythrocyte sedimentation curve: A semi-empirical approach I. *Biorheology.* 1977 Mar 1;14(1):43–9.
78. Steinour HH. Rate of sedimentation. Nonflocculated Suspensions of Uniform Spheres. *Ind Eng Chem.* 1944 Jul 1;36(7):618–24.
79. Richardson JF, Zaki WN. Sedimentation and fluidisation: Part I. *Transactions of the Institution of Chemical Engineers.* 1954;32:35–53.
80. Boycott AE. Sedimentation of Blood Corpuscles. *Nature.* 1920 Jan;104(2621):532–532.
81. Toyama Y, Dobashi T, Sakanishi A, Oka S. Enhanced Erythrocyte Sedimentation Rate and Upflow Layer in Inclined Rectangular Vessel. *Jpn J Appl Phys.* 1990 Feb 20;29(Part 1, No. 2):453–4.
82. Sonmez C, Dogan OC, Kaymak AO, Akkaya N, Akin KO, Guntas G. Test-1 analyzer and conventional Westergren method for erythrocyte sedimentation rate: A comparative study between two laboratories. *J Clin Lab Anal.* 2018 Jun;32(5):e22384.
83. Boğdaycıoğlu N, Yılmaz FM, Sezer S, Oğuz E. Comparison of iSED and Ves-Matic Cube 200 Erythrocyte Sedimentation Rate Measurements With Westergren Method. *J Clin Lab Anal.* 2015 Sep;29(5):397–404.
84. Agosti R, Clivati A, D'Ettore M, Ferrarini F, Somazzi R, Longhini E. Hematocrit dependence of erythrocyte aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2016 Dec 22;8(6):913–24.
85. Tuğral E, Yalçın Ö, Başkurt OK. Effect of Donor Age on the Deformability and Aggregability of Density-Separated Red Blood Cells. *Turk J Haematol.* 2002 Jun 5;19(2):303–8.
86. Trudnowski RJ, Rico RC. Specific gravity of blood and plasma at 4 and 37 degrees C. *Clin Chem.* 1974 May;20(5):615–6.
87. Harkness J. The viscosity of human blood plasma; its measurement in health and disease. *Biorheology.*

- 1971 Dec 1;8(3-4):171-93.
88. Procedures for the erythrocyte sedimentation rate test; approved standard—fifth edition. CLSI guideline H02-A5. Wayne, PA; 2011.
  89. Isiksacan Z, Asghari M, Elbuken C. A microfluidic erythrocyte sedimentation rate analyzer using rouleaux formation kinetics. *Microfluid Nanofluidics*. 2017 Mar 24;21(3):44.
  90. Tsukasa K, Satoru M, Masaaki S, Junichi N. Evaluation of HbA1c, CRP and CBC measurement with Celltac  $\alpha+$ . *International Journal of Analytical Bio-Science*. 2019;42(3):141-51.
  91. Zhanov A, Yang S. Electrochemical impedance spectroscopy of blood. Part 3: a study of the correlation between blood conductivity and sedimentation to shorten the erythrocyte sedimentation rate test. *Analytical Methods*. 2018;10(2):180-9.
  92. Maki R, Tabe Y, Yamamoto T, Takemura H, Sawada T, Esaki T, et al. Accuracy study of a novel alternate method measuring erythrocyte sedimentation rate for prototype hematology analyzer Celltac  $\alpha+$ . *Int J Lab Hematol*. 2021 Aug 30;43(4):588-96.
  93. Tefferi A. Anemia in Adults: A Contemporary Approach to Diagnosis. *Mayo Clin Proc*. 2003 Oct;78(10):1274-80.
  94. Phear D. The Influence of Erythrocyte Factors on Their Sedimentation Rate. *J Clin Pathol*. 1957 Nov 1;10(4):357-9.
  95. Manley RW. The Effect of Room Temperature on Erythrocyte Sedimentation Rate and Its Correction. *J Clin Pathol*. 1957 Nov 1;10(4):354-6.
  96. Skalak R, Tozeren A, Zarda RP, Chien S. Strain Energy Function of Red Blood Cell Membranes. *Biophys J*. 1973 Mar;13(3):245-64.
  97. Cannon JW. Hemorrhagic Shock. *New England Journal of Medicine*. 2018 Jan 25;378(4):370-9.
  98. Göbel K, Eichler S, Wiendl H, Chavakis T, Kleinschnitz C, Meuth SG. The Coagulation Factors Fibrinogen, Thrombin, and Factor XII in Inflammatory Disorders—A Systematic Review. *Front Immunol*. 2018 Jul 26;9.
  99. McMichael M. New Models of Hemostasis. *Top Companion Anim Med*. 2012 May;27(2):40-5.
  100. Lancé MD. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. *Thromb J*. 2015 Dec 12;13(1):1.
  101. Wikkelsø A, Wetterslev J, Møller AM, Afshari A. Thromboelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment versus usual care in adults or children with bleeding. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2016 Aug 22;2016(12).
  102. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005 Aug;3(8):1894-904.
  103. Fries D, Martini WZ. Role of fibrinogen in trauma-induced coagulopathy. *Br J Anaesth*. 2010 Aug;105(2):116-21.
  104. Lunde J, Stenballe J, Wikkelsø A, Johansen M, Afshari A. Fibrinogen concentrate for bleeding - a systematic review. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2014 Oct;58(9):1061-74.
  105. Miyata S, Itakura A, Ueda Y, Usui A, Okita Y, Ohnishi Y, et al. TRANSFUSION GUIDELINES FOR PATIENTS WITH MASSIVE BLEEDING. *Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy*. 2019



- Feb 28;65(1):21–92.
106. Undas A. Determination of Fibrinogen and Thrombin Time (TT). In: *Methods in molecular biology*. 2017. p. 105–10.
  107. Okahara S, Handoh T, Wakita M, Yamamoto T, Misawa S, Miida T, et al. Fibrinogen measurement by a novel point-of-care device with whole blood: comparison of values against Clauss method. *J Anesth*. 2021 Oct 19;35(5):757–60.
  108. van Haeringen NJ, Glasius E. The relation between rouleaux formation in blood and fibrinogen content in plasma. *Clinica Chimica Acta*. 1970 Jul;29(1):55–60.
  109. Sakota D, Kosaka R, Nishida M, Maruyama O. Optical aggregometry of red blood cells associated with the blood-clotting reaction in extracorporeal circulation support. *Journal of Artificial Organs*. 2016 Sep 24;19(3):241–8.
  110. Baskurt OK, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Alexy T, et al. Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;43(4):283–98.
  111. Sharma S, Sharma P, Tyler LN. Transfusion of blood and blood products: indications and complications. *Am Fam Physician*. 2011 Mar 15;83(6):719–24.
  112. Landsteiner K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe. *Zentralbl Bakteriol*. 1900;27:357–62.
  113. Mujahid A, Dickert FL. Blood group typing: From classical strategies to the application of synthetic antibodies generated by molecular imprinting. Vol. 16, *Sensors (Switzerland)*. MDPI AG; 2016.
  114. Li HY, Guo K. Blood Group Testing. Vol. 9, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2022.
  115. Lapiere Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion (Paris)*. 1990 Feb;30(2):109–13.
  116. Xu W, Wan F, Lou Y, Jin J, Mao W. Evaluation of an Automated Microplate Technique in the Galileo System for ABO and Rh(D) Blood Grouping. *Clin Lab*. 2014;60(02/2014).
  117. Ashiba H, Fujimaki M, Awazu K, Fu M, Ohki Y, Tanaka T, et al. Hemagglutination detection for blood typing based on waveguide-mode sensors. *Sens Biosensing Res*. 2015 Mar 1;3:59–64.
  118. Yamamoto K, Sakurai R, Motosuke M. Fully-automatic blood-typing chip exploiting bubbles for quick dilution and detection. *Biomicrofluidics*. 2020 Mar 1;14(2).
  119. Chang YJ, Fan YH, Chen SC, Lee KH, Lou LY. An Automatic Lab-on-Disc System for Blood Typing. *SLAS Technol*. 2018 Apr;23(2):172–8.
  120. Hounkhamhang N, Vongsakulyanon A, Peungthum P, Sudprasert K, Kitpoka P, Kunakorn M, et al. ABO blood-typing using an antibody array technique based on surface plasmon resonance imaging. *Sensors (Switzerland)*. 2013 Sep 9;13(9):11913–22.
  121. Shiga T, Maeda N, Kon K. Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1990 Jan;10(1):9–48.
  122. Yudin J, Heddle NM. A 13-question approach to resolving serological discrepancies in the transfusion medicine laboratory. Vol. 45, *Lab Medicine*. American Society of Clinical Pathologists; 2014. p. 193–206.
  123. Waider KL. Rouleaux and saline replacement.

124. Rasia RJ. Weak “A” blood subgroup discrimination by a rheo-optical method: a new application of laser backscattering. *Optical Engineering*. 1996 Jan 1;35(1):20.
125. Korotaeva T v, Firsov NN, Bjelle A, Vishlova MA. Erythrocytes aggregation in healthy donors at native and standard hematocrit: the influence of sex, age, immunoglobulins and fibrinogen concentrations. Standardization of parameters. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007;36(4):335–43.
126. Higuchi M, Watanabe N. A rapid and accurate method for estimating the erythrocyte sedimentation rate using a hematocrit-corrected optical aggregation index. *PLoS One*. 2022 Jul 12;17(7):e0270977.
127. Deng LH, Barbenel JC, Lowe GDO. Influence of hematocrit on erythrocyte aggregation kinetics for suspensions of red blood cells in autologous plasma. *Biorheology*. 1994 Apr 1;31(2):193–205.
128. Reinhart WH, Nagy C. Albumin affects erythrocyte aggregation and sedimentation. *Eur J Clin Invest*. 1995 Jul;25(7):523–8.
129. Pimenta S, Nobrega JM, Duarte FM, Minas G, Soares FO. Automatic Electronic System to Human Blood Typing. *Procedia Eng*. 2012;47:647–50.
130. Ramasubramanian M, Anthony S, Lambert J. Simplified spectrophotometric method for the detection of red blood cell agglutination. *Appl Opt*. 2008 Aug 1;47(22):4094–105.
131. Vayá A, Martínez Triguero M, Ricart A, Plumé G, Solves P, Corella D, et al. Erythrocyte aggregability and ABO blood groups. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2009;41(1):67–72.
132. Uno S, Tanaka T, Ashiba H, Fujimaki M, Tanaka M, Hatta Y, et al. Sensitive typing of reverse ABO blood groups with a waveguide-mode sensor. *J Biosci Bioeng*. 2018 Jul;126(1):131–7.

## 研究業績

本研究に関連する論文

査読論文

**Higuchi M**, Watanabe N. A rapid and accurate method for estimating the erythrocyte sedimentation rate using a hematocrit-corrected optical aggregation index. PLoS One. 2022 Jul 12;17(7):e0270977. (第2章の内容)

**Higuchi M**, Tanaka M, Watanabe N. Investigation of erythrocyte aggregation parameters of blood with low levels of fibrinogen by syllectometry. Journal of Biorheology (in press). (第4章の内容)

学会発表

2021年

国際学会

**Higuchi M**, Watanabe N. Investigation of effect of measurement time for transmitted light through blood on relationship between erythrocytes' sedimentation velocity and aggregation parameters. The 2nd Joint meeting of ESCHM-ISCH-ISB 2021.

2022年

国内学会

1. **樋口誠**, 渡邊宣夫, ヘマトクリット補正した赤血球凝集パラメータを用いた迅速かつ正確な赤血球沈降速度推定法, 第61回生体医工学会, 2022年6月, 新潟朱鷺メッセ
2. 関羽康弘, **樋口誠**, 渡邊宣夫, Syllectometryを用いたABO式血液型判定法の確立に向けた基礎検討, 第61回生体医工学会, 2022年6月, 新潟朱鷺メッセ
3. 田中理禎, **樋口誠**, 渡邊宣夫, Syllectometryを用いた低濃度フィブリノゲン領域における赤血球凝集能の測定, 第45回日本バイオレオロジー学会, 2022年6月, 東海大学湘南キャンパス
4. 親泊翔, **樋口誠**, 渡邊宣夫, 微小流路中の光学的赤血球凝集測定における血液厚みの影響, 第70回レオロジー討論会, 2022年10月13-14日, 金沢歌劇座

本研究に関する特許

登録特許

特許7037324, 発明者 **樋口誠**, 「炎症マーカー測定方法, 炎症マーカー測定装置, 炎症マーカー測定プログラム, および当該プログラムを記録した記録媒体」(第2章, 第3章, 第4章関連特許)

出願中の特許

発明者 **樋口誠**, 渡邊宣夫, 「血液検査装置, 血液検査方法, および血液検査プログラム」(第5章関連特許)

**謝辞**

本論文の作成にあたり、終始適切な助言と丁寧な指導をして下さった、指導教官である渡邊宣夫教授に深く感謝します。共同研究者である同研究室の M1 田中理禎さん、関羽康弘さんには実験の実施とデータまとめ、有用なご意見を頂戴し、深く感謝致します。本論文をまとめるにあたり、副査としてご指導いただきました、花房昭彦先生、山本紳一郎先生、福井浩二先生、東京医科歯科大学の大内克洋先生に深く感謝申し上げます。ボランティア検体の採血にて多大なご協力をいただきました、ねぎし内科神経内科クリニックの根岸輝彦院長に感謝致します。臨床検体のデータ収集にてお世話になりました順天堂大学医学部検査室の山本剛正先生に感謝致します。試料作成と実験補助でご協力いただきました、日本光電工業株式会社の濱本葉子氏、寺社下悠木氏に感謝致します。本研究を実施するにあたり、装置開発時において多大なご協力を頂きました同社の濱田竜也氏、江崎龍洋氏、佐伯和音氏、源田弘長氏に感謝致します。貴重な血液検体を提供いただいたボランティアの方々、および臨床データを利用させていただいた順天堂大学病院の患者様にも感謝申し上げます。本研究で使用した装置の貸与と、多大な援助、ご支援をいただきました日本光電工業株式会社と、上司の堀江克如氏に深く感謝申し上げます。最後に、社会人博士としての忙しい研究生活を支えてくれた私の家族、妻の眸、長女のひかり、次女みのりに心から感謝します。