

循環器デバイス内血液凝固過程における血液光学特性変化のメカニズム

Mechanism of the alteration in optical properties of blood associated with thrombogenic process in mechanical circulatory supports

○ 迫田 大輔 (産総研) 藤原 立樹 (東京医科歯科大学)

大内 克洋 (東京医科歯科大学) 小阪 亮 (産総研)

西田 正浩 (産総研) 丸山 修 (産総研)

Daisuke SAKOTA, Ryo Kosaka, Masahiro NISHIDA, Osamu MARUYAMA,

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Tatsuki FUJIWARA, Katsuhiko OUCHI, *Tokyo Medical and Dental University (TMDU)*

Abstract: Blood-clotting in blood pump during mechanical circulatory support is one of the primary problem. Anticoagulation management must be required in the support. However, Excess or deficiency of anticoagulation causes bleeding or infarction respectively. To manage the blood clotting risk, the optical non-invasive and continuous blood monitoring method should be developed. We developed a hyperspectral imaging (HSI) method to visualize the thrombus growth process in a rotary blood pump and to investigate the optical properties of the thrombus. Also, the red blood cells (RBCs) aggregometry using near-infrared light associated with the blood-clotting reaction was conducted. As a result, the RBCs density around the blood-clotting area was reduced and the alteration could be detected by the developed optical method. In conclusion, the feasibility of the optical monitoring of blood-clotting stage was indicated.

Key Words: Mechanical circulatory supports, blood-clotting, Near-infrared light, Red blood cells aggregation

1. 緒言

1-1 体外循環における抗凝固問題

現在の国内における重症心疾患治療の流れとして、経皮的心肺補助(Percutaneous Cardiopulmonary Support : PCPS)や左心室補助(Left Ventricular Assist : LVA)等の体外循環を経て、埋込型補助人工心臓による長期的な循環補助を行い、適合する心臓移植ドナーが見つければ、最終的に移植に至る。埋込型補助人工心臓は、心臓移植適用患者のみの使用に限定されているため、緊急に治療を要する場合は即時適用の判断が困難となる。そこで埋込型補助人工心臓へ移行するかを判断するための目的で一次的に体外循環が行われている。また、近年発展が目覚ましい次世代創薬技術や再生医療技術によって、将来は体外循環中に積極的に心疾患を治療・回復させる医療が実現することも期待されている。

しかしながら体外循環中はヘパリン等による抗凝固療法が不可欠であり、抗凝固不足であれば血栓梗塞症、抗凝固過多であれば出血を引き起こし、長期間安全に血液凝固能をコントロールすることは大変困難であるのが現状である。長期安定した抗凝固療法を実現するためには、血液凝固状態を非侵襲かつ連続的にセンシングすることが必要と考えられる。そこで光学的手法による血液凝固過程の計測法確立を目指している。

1-2 血液凝固に伴う血液光学特性の変化

血液中に最も多く含まれる細胞は赤血球であり、血液内の光吸収および散乱は、ほぼ赤血球によって引き起こされる。したがって光学的手法による血液凝固モニタリングを実現するためには、血液が凝固する過程における、赤血球のふるまいを理解することが重要と考えられる。しかし血液の光学特性について、せん断速度、ヘマトクリット、溶血等に関する知見については報告があるが⁽¹⁾、血液凝固については無い。そこで本研究では、「体外循環用血液ポンプ

内血栓形成のハイパースペクトラルイメージング(Hyperspectral Imaging : HSI)および「赤血球凝集反応と血液凝固反応の関連性調査」を行い、両実験結果から、循環器デバイス内血液凝固過程における血液の光学特性変化のメカニズムについて考察した。

2. 方法

2-1 大型動物体外循環急性実験中の動圧浮上遠心血液ポンプ内血栓形成イメージング

Fig.1 に示す体重 43kg の SPF ブタを用いた体外循環動物実験(両側頸静脈送脱血)を行った。本実験は、東京医科歯科大学及び産業技術総合研究所の動物実験倫理委員会審査にて承認を得て行った。当研究室で開発している動圧浮上遠心血液ポンプ(Fig.2)を使用し⁽²⁾、3000rpm、1L/min で循環した。手術中はヘパリンにより液活性凝固時間(Activated Clotting Time : ACT)を 200sec 以上とし、ポンプ循環開始から硫酸プロタミンにより、ヘパリン抗凝固をリバースした。循環開始からの ACT は 83 ± 11 sec であった。ポンプ下面に、ポンプ回転数と同周波数の 50 Hz 白色パルス光源を照射し、ストロボ効果によりインペラの静止像を得た。光は Fig.2 に示すポンプのボトムベアリングギャップを透過して、厚さ 4.9mm のインペラ内流路の血液層に達し、散乱した。ポンプからの後方散乱光について HSI⁽³⁾を行った。HSI システムにより CCD 撮像を分光し、波長 608~752nm の範囲で、4nm 間隔で各波長像を取得した。取得した画像を Fig.3 に示す。インペラ上に記した位相マーカーを基に、各波長像についてインペラ領域をアフィン変換により画像回転処理を行い、全ての波長像の位相を一致させた。最終的に 608nm から 752nm にかけて RGB 成分を付加し画像を重ね合わせてスペクトル画像を作成した。

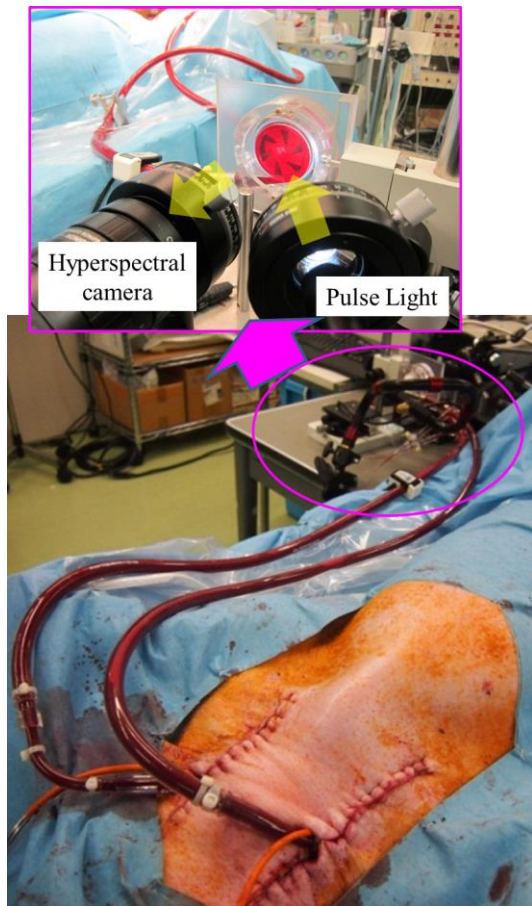


Fig. 1 Hyperspectral imaging of a hydrodynamically levitated centrifugal blood pump in acute animal experiment.

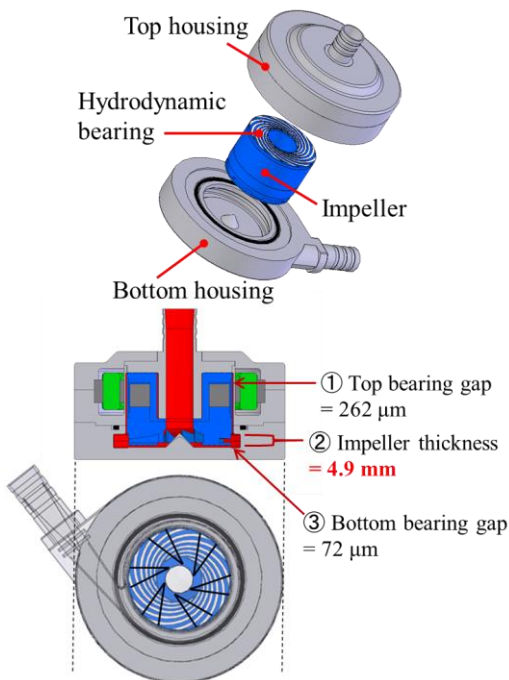


Fig. 2 Hydrodynamically levitated centrifugal blood pump.

2-2 赤血球凝集反応と血液凝固反応の関連性調査：ガラスキューベット内血液凝固過程における透過光計測

Fig.4 に実験装置の概要を示す。血液は食肉処理場より採血から2時間以内に取得した新鮮ブタ血液を使用した。

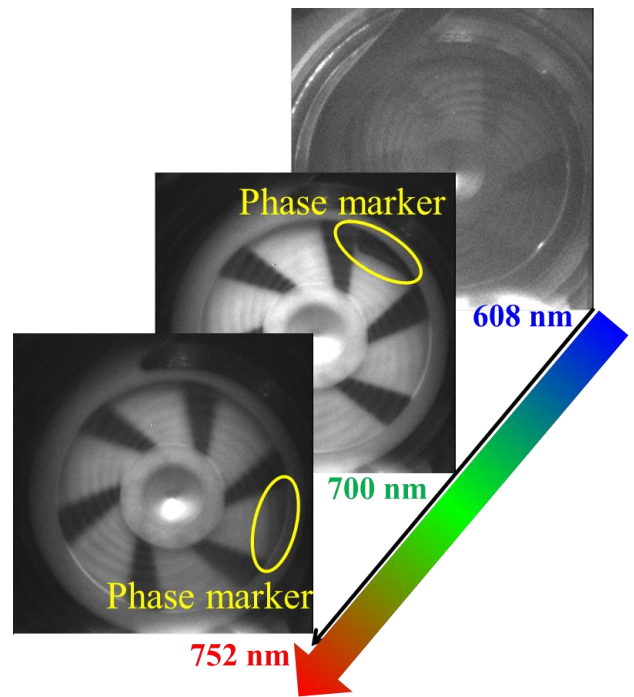


Fig. 3 Obtained wavelength images from 608 to 752 nm.

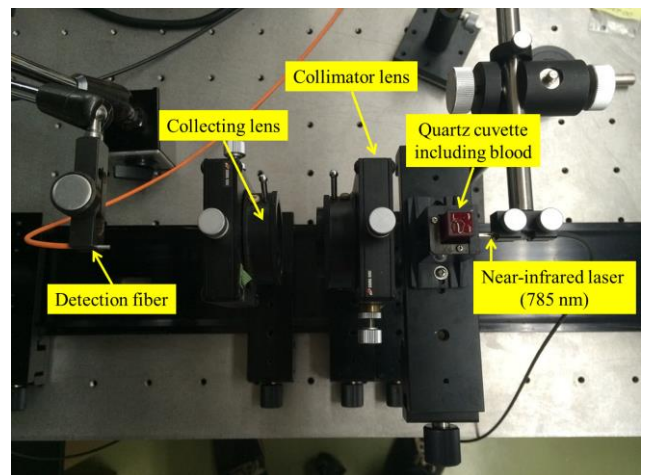


Fig. 4 Red blood cell aggregometry associated with blood-clotting reaction.

抗凝固として、採血後直ちに血液 1L にヘパリン 10000 U を投与した。血液を遠心分離し、自己血漿によりヘマトクリットを 30% に調整した。この血液について、血液 4cc と硫酸プロタミン 200 μL をガラスキューベットに同時投与し、その瞬間からの波長 785nm レーザーの透過光強度の経時変化をモニタリングした。コントロールとして、血液 4cc と生理食塩水 200 μL を同時投与した実験を行った。

3. 結果

3-1 動圧浮上遠心血液ポンプ内血栓成長過程

Fig.5 に取得したスペクトル画像を示す。ポンプによる循環開始から 98 min 後、インペラベーン先端部より画像輝度に変化が認められた。その後2つのベーン周囲に輝度値低下領域が広がっていった。特に 130min から 200min かけて、輝度値がより低下したことを確認した。実験終了後、ポンプを生理食塩水で洗浄してポンプ内を確認し、イメージングと同形体の血栓が形成されていることを確認した。

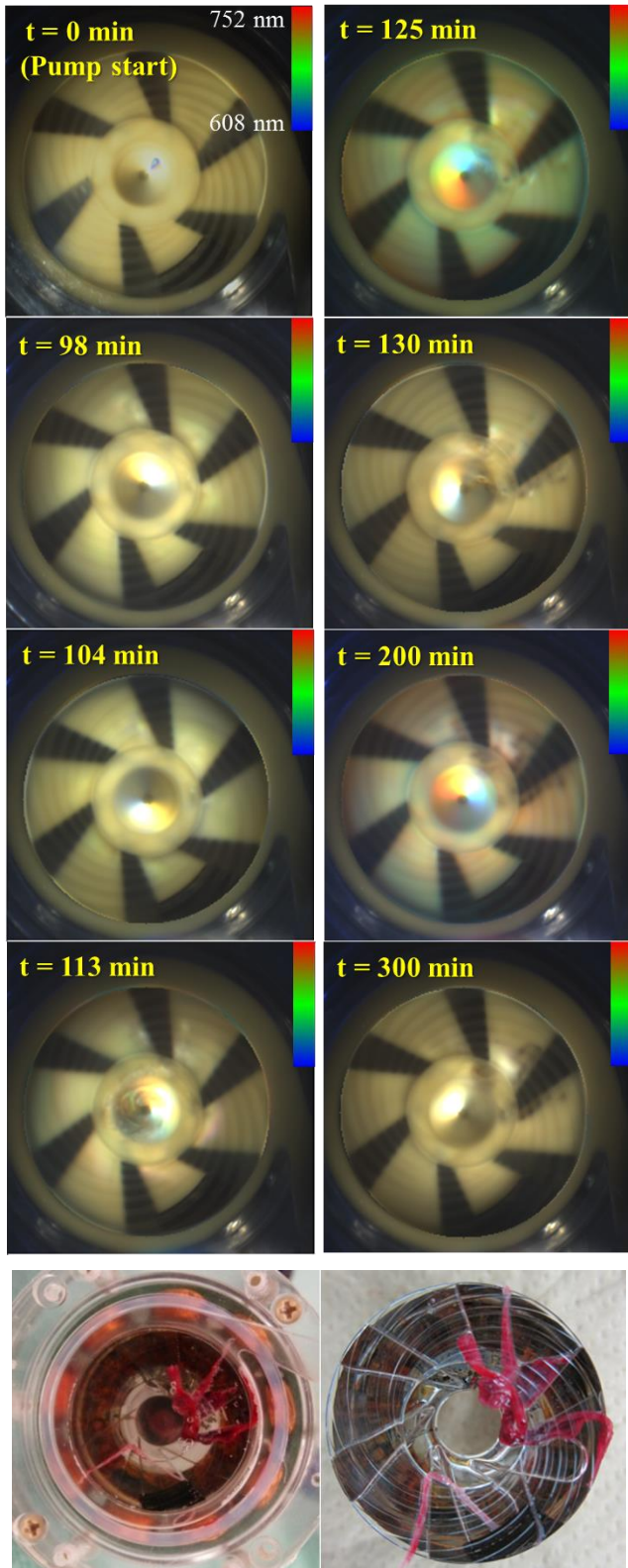


Fig. 5 Thrombus growth process in a hydrodynamically levitated centrifugal blood pump

3-2 ガラスキューベット内血液凝固過程における透過光計測の経時変化

Fig.6 にガラスキューベットの透過光強度の経時変化を示す。血液サンプルを注入して約1秒後から透過光強度が次第に増加していった。これは赤血球凝集が起こり、光の赤血球衝突回数が減少するために透過光強度が増加したものと考えられる。したがって、この透過光強度の増加度が

大きい程、赤血球凝集能が強いことを意味する。血液注入から106秒後に $P < 0.05$ の有意差を得た。硫酸プロタミン投与後の血液の ACT は 113sec であった。したがって、血液凝固反応に伴って、赤血球凝集能が低下した結果が得られた。

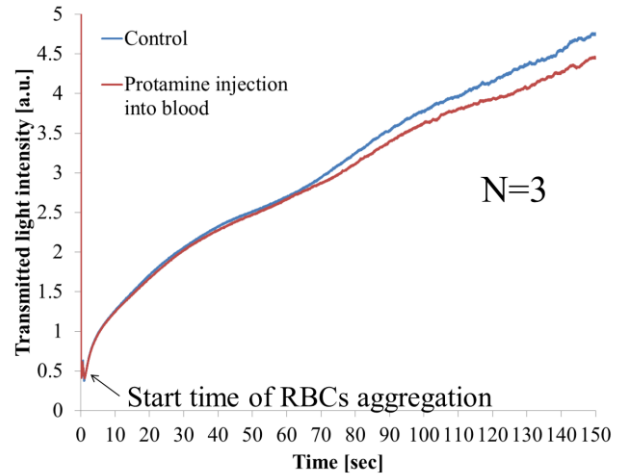


Fig. 6 Result of optical red blood cells (RBCs) aggregometry associated with blood-clotting reaction.

4. 考察

4-1 フィブリン生成後の血栓の光学特性

Fig.5 より、血栓形成領域において波長 608nm から 752nm にかけての後方散乱光の低下が認められた。この波長帯における後方散乱光は殆どが赤血球によって引き起こされることから、血栓形成域において赤血球密度の低下が起こったことが考えられる。特に 130min から 200min にかけて赤血球密度の低下が顕著に起こっていることが示唆された。フィブリンが生成されたとき、周囲の赤血球はフィブリンに捕捉されるが、血液ポンプ内のせん断流れによって、補足されていた赤血球が離脱していくことで、周囲と比較してフィブリン生成域の赤血球密度が低下したものと考えられる。すなわち、Fig.5 は血液ポンプ内の赤血球密度（ヘモグロビン濃度）分布をイメージングしたものであり、血栓域と周囲のヘモグロビン濃度差を検出することが、光学的に血栓を検出することが可能であることがわかった。血栓のヘモグロビン濃度は周囲の流れによって引き起こされることから、周囲せん断速度によって、血栓のヘモグロビン濃度は変化することが考えられる。

4-2 血液凝固反応に伴う赤血球凝集能低下

赤血球凝集反応のメカニズムは完全には解明されていないが、有力な仮説として血漿タンパクによる「架橋現象」が提唱されている⁽⁴⁾。赤血球膜表面は負に帯電しており、本来であれば赤血球同士には斥力がはたらくが、フィブリノゲン等の血漿タンパクは正に帯電しているため、フィブリノゲンが赤血球間に架橋することで赤血球凝集が起こる。フィブリノゲン濃度が高くなれば、赤血球凝集能は増加することが知られている。すなわち、フィブリノゲンが血液凝固反応によってフィブリンとなれば、血漿中のフィブリノゲン濃度が減少するため、赤血球凝集能が低下したと考えられる。しかし、Fig.6 の ACT は 113sec であり、ガラスセル内において 100sec 以内に強固な血栓は確認されなかった。また、Fig.6 では赤血球凝集能の低下は示唆されているが、凝集反応は継続的に起こっており、血液の流動性は維持されているといえる。したがって、赤血球凝集能の低

下は「血栓が形成されるよい前」に起こる可能性が示唆された。

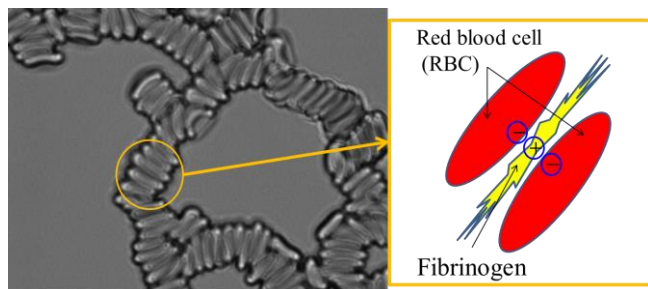


Fig. 7 RBCs aggregation model "Fibrinogen bridging".

4-2 血液凝固反応過程における赤血球のふるまい

本研究により、血液凝固反応に伴う赤血球のふるまいは Fig.8 の様になることが考えられた。Step1 として、血栓周囲のフィブリノゲン⇒フィブリン反応が起こるため、赤血球の凝集能の低下が起こる。Step2 で、フィブリンネットワークが生成され周囲の赤血球が取り込まれる。Step3 で、フィブリンに捕捉されていた赤血球が血流により離脱する。この過程において光学的には後方散乱が減少していき、これを検出することで血液凝固過程の光学的計測法の可能性が考えられる。

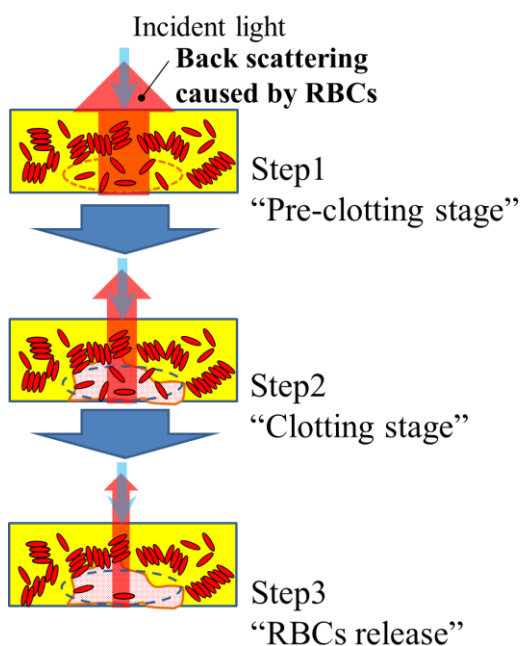


Fig. 8 RBCs aggregation associated with blood-clotting.

4-3 今後の展望

血液ポンプ等の循環器デバイス内で形成される血栓を光学的手法で非侵襲かつ連続的にイメージングすることが可能になった。本成果を利用した定量的なデバイスの抗血栓性評価法の確立が期待される。また、血液凝固反応に伴い赤血球凝集能が変化することが考えられたため、Fig.8 の Step1 に示す「血栓形成の直前状態」の光学的検出の可能性が示唆された。Step1 の状態をモニタリングできれば、その状態に応じた抗凝固投与を行うことで、最小の抗凝固薬で血栓を未然に防ぐ、適切な抗凝固療法の実現が期待できる。

5. 結言

循環器デバイス内血液凝固反応過程において、凝固域の赤血球密度低下が起こり、それに伴う光学的変化があることが示唆された。本知見を利用した、循環器デバイス内の血液凝固監視装置の実現が今後期待される。

参考文献

- (1) A. Roggan, et al., "Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400-2500 nm", *Journal of Biomedical Optics*, Vol. 4, No. 1, pp. 36-46, 1999.
- (2) R. Kosaka, et al., "Geometric optimization of a step bearing for a hydrodynamically levitated centrifugal blood pump for the reduction of hemolysis", *Artificial Organs*, Vol. 37, pp. 778-785, 2013.
- (3) D. Sakota, et al., "Feasibility of the optical imaging of thrombus formation in a rotary blood pump by near-infrared light", *Artificial Organs*, Vol. 38, pp. 733-740, 2014.
- (4) M. Kaibara, "Rheological behaviors of bovine blood forming artificial rouleaux", *Biorheology*, Vol. 20, pp. 583-592, 1983.