

令和元年6月6日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01444

研究課題名(和文) 多波長光イメージングによる3次元血流情報の獲得と循環器系デバイス定量評価への応用

研究課題名(英文) Development of Multi-wavelength Optical Imaging for Acquisition of Three Dimensional Blood Flow Information in Mechanical Circulatory Support Devices

研究代表者

迫田 大輔(Daisuke, Sakota)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：40588670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：遠心血液ポンプ等の体外補助循環回路やバイパスグラフト血管内の血流の高速多波長イメージングシステムを開発した。波長600～720nm、20nm間隔で8波長の循環器系デバイス内イメージングを行い、波長が長くなるにつれて深部の血流をイメージングでき、3次元の血流情報を獲得できることが示唆された。また、開発システムを応用して動圧浮上遠心血液ポンプ内の血液適合性評価を行い、動圧軸受部において赤血球と血漿が分離するプラズマスキミング現象がヒト全血で起こることを明らかにした。また、高速血小板蛍光イメージングとして応用し、動圧軸受部の血小板活性を高輝度にイメージングできることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの循環器系デバイスの血液適合性評価は、数値流体力学解析や粒子画像計測法等、非血液による評価が主であった。それに対し本研究では実際に血液を使用し、生体内と比較して高速な血流が生じる循環器系デバイス内で、3次元的な血流情報を高速で得ることができるようになった。また血球細胞レベルの評価も可能になりつつあり、本システムによって従来では不可能であった、血液がどのように振舞っているのかリアルタイムに観察しながら循環器系デバイスを開発するということができる様になると考えられる。本研究で得た知見は、これまでに無い革新的な血液適合性を有する循環器系デバイスの開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：A high-speed multi-wavelength imaging system to image blood flow in mechanical circulatory support devices such as a rotary blood pump and coronary bypass graft was developed. The experimental results showed that the penetration depth increased as the image wavelength increased from 600 to 720nm. The result may indicated feasibility of acquisition of 3 dimensional imaging of blood flow in devices. In addition, as application study of the developed system, hemo-compatibility of hydro-dynamically levitated centrifugal blood pump was evaluated. As a result, plasma-skimming effect in the hydrodynamic bearing was observed. While we also showed the developed system could be also utilized as high-speed fluorescent imaging of platelets in the bearing.

研究分野：人工臓器工学

キーワード：可視・近赤外分光 非侵襲イメージング 人工臓器 循環器疾患 血液適合性 医療技術評価

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遠心血液ポンプや人工肺等の体外補助循環デバイスや、人工血管、人工弁、ステント、更にはバイパス用血管を含めた広義な循環器系デバイス内の血流は血液適合性に密接に関係するため、血流の可視化が非常に重要である。しかし従来では数値流体力学解析や粒子画像計測法等、非血液による評価が主であった。実際に血液使用下での循環器系デバイス内血流を可視化ができれば、循環器系デバイスの開発において直接的かつ定量的な血液適合性評価になる。またデバイス開発の段階だけでなく臨床で活用することも可能と考えられる。

波長 600nm 以上からヘモグロビンによる光吸収が少なくなるため、血流の光イメージングに適していきと考えられる。ここで、血液への光深達深さ (Penetration Depth [mm]) は、波長 600 ~ 700nm にかけて、波長が長くなるにつれて理論上ほぼ線形に増加していく。即ち、この波長帯において、イメージング波長を長波長へシフトしていく多波長イメージングを行うことで、血液深さ方向の血流情報を抽出できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

循環器系デバイス内血流が十分イメージング可能な、高速多波長光イメージング装置を開発する。イメージング波長をシフトさせていくことで、段階的に奥行き方向の流速がイメージングできていることを確認する。また、高速多波長イメージング装置の開発は、短い露光時間で高輝度な撮影が同時に可能になることでもある。実際に開発装置を利用した、循環器系デバイスの血液適合性評価の応用研究を行い、開発装置の有意性の検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高速多波長イメージング装置の開発

図 1 に開発装置の概略図を示す。従来の多波長イメージング装置として、ハイパースペクトラルイメージングが挙げられるが、これは取り込んだ光を回折格子により各波長に分解しつつ CCD にて撮影するため、時間分解能が低い。これに対し、図 1 では高速カメラ (KEYENSE VW-9000, Japan) とフィルタチェンジャー (モータ: Orientalmotor NXM620A, Japan) から構成され、高速カメラのフレームレートとフィルタチェンジャーの回転位相のタイミングを同期させることで最大 8 波長の各波長イメージングを行うことができる。

各波長イメージングの結果から血液深さ情報の抽出について図 2 に示す。波長 1 でのイメージング結果から求める画像上の流速分布と波長 2 でのイメージング結果から求める流速分布との差は、1 ~ 2 光侵達層の流速イメージングになると考えられる。

**光侵達深さ [mm]** は、 $=1/\sqrt{3\mu_a(\mu_a+\mu'_s)}$  であらわれ、ここで  $\mu_a$  は吸収係数 [1/mm]、 $\mu'_s$  は換算散乱係数 [1/mm] であり、波長によって変わる。波長選定の理論的根拠として、Mie 理論による算出結果を図 3 に示す。血液のヘマトクリットを 30%、酸素飽和度を 100% とした。このとき、600 ~ 700nm にかけてがほぼ線形に増加しており、この付近の波長帯域において図 2 を適用することを考え、フィルタチェンジャーに接続する波長フィルタを 600 ~ 720nm、波長間隔:20nm (朝日分光社製) とした。

#### (2) 開発装置の基礎特性検証実験

遠心血液ポンプ、体外補助循環用塩化ビニルチューブ、リザーバーから成る模擬循環路を構成し、ブタ血液を循環させ、遠心血液ポンプ出口流路の高速多波長イメージングを行った。また、冠動脈バイパスグラフト部の評価が可能かを検討するため、回路一部にブタ頸動脈を接続し、頸動脈部の血流について同様にイメージングを行った。頸動脈部の流量は最大 320mL/min とした。

#### (3) 開発装置の応用: 超高速イメージングによる動圧浮上遠心血液ポンプ血液適合性評価

図 1 に示す高速多波長イメージング装置は最大 8 波長であるが、波長数を減らす程に 1 波長あたりのフレームレートを上げることができる。1 波長の単波長イメージングでは高速カメラの感度とフィルタ特性によって最大感度イメージングができる。最大高速かつ感度での使用の

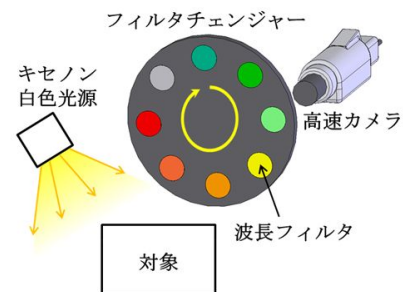


図 1: 高速多波長イメージング装置の概略図

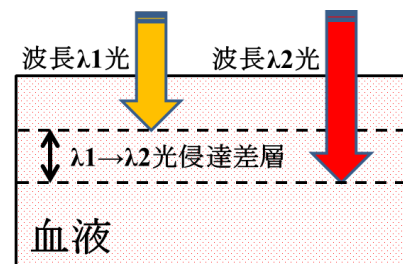


図 2: 光侵達深さ層

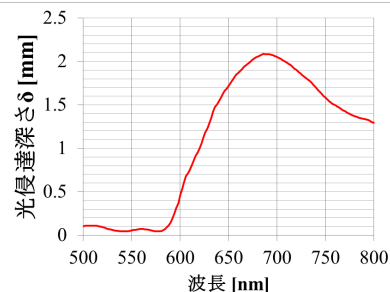


図 3 血液の光侵達深さ  $\delta$

応用として、研究代表者所属の研究室で開発中の動圧浮上遠心血液ポンプにおける動圧軸受部の血液適合性評価研究を行った。

第1の実験として、動圧軸受部のヒト血液(日本赤十字社提供)を使用した赤血球流動観察を行った。ポンプ回転数 4000 rpm, 5L/min で血液を循環させ、フレームレート 15000 fps、シャッタースピード 1/900000 s、倍率 300 倍 (KEYENSE 規格) で撮影した。その様子を図 4 に示す。観察結果から、軸受隙間 dx によって軸受山部の赤血球が減ることがわかった。そこで、回路内血液のヘマトクリット (回路内 HCT) に対する山部 HCT の減衰効率を E[%]として、以下の式によって算出した。

$$E = (\text{回路内 HCT} - \text{山部 HCT}) / (\text{回路内 HCT}) \times 100 \quad (1)$$

ここで、山部 HCT は以下の式により求めた。

$$\text{山部 HCT} = (Q \times \text{MCV}) / (dx \times \quad) \quad (2)$$

Q は画像中の山部の赤血球占有率(0 <math>Q </math> 1)、MCV は平均赤血球体積で自動血球分析装置から求めた。は赤血球断面積で赤血球形状モデル (D. Sakota et al, *J Biomed Opt* 15(16), 2010) より算出した。dx は Fig.1 に示す山部の軸受隙間であり、回転数および血液粘性によって変動する。4000 rpm における dx と粘性の関係について、別途同一回路を使用して様々な粘性に調整したグリセリン水溶液を循環させる実験を行い、レーザー変位計により求めておいた。回路 HCT 測定と同時に、回転粘度計を用いて粘性を計測し、その値から dx を算出して式(2)に代入した。

第2の実験として、開発装置を利用して高速な血小板流動観察を更に試みた。in vivo における血小板流動と異なり、動圧浮上遠心血液ポンプ内では非常に高速なシャッタースピードとフレームレートが要求される。また、血小板は光学的に透明でありかつ赤血球よりサイズも小さいため、血小板を蛍光させる必要がある。しかし循環器系デバイスの血液適合性評価には循環血液量も数 100mL 必要とするため、蛍光物質も安価なものでなければならない。そこで、メバクリン (SIGMA Q3251-25G, Quinacrine dihydrochloride) 及びローダミン (Wako Rhodamine B, 183-00122) を使用して、どこまで高速な血小板蛍光イメージングが可能であるかを検討した。

蛍光血小板試料の作成方法として、メバクリン蛍光ではヒト全血に 10  $\mu\text{M/L}$  の濃度でメバクリンを添加し、2 時間室温で静置した。ローダミンの場合は、ヒト全血から多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma : PRP, 血小板数 PLT = 20 ~ 40  $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) を作成し、PRP に 1000  $\mu\text{M/L}$  の濃度で添加して 2 時間室温で静置し、その PRP を遠心して上澄みをリン酸干渉生理食塩水 PBS で洗浄し、ヒト赤血球を加えた。

メバクリン蛍光イメージングでは、キセノンランプ (MAX303, 朝日分光) に 450nm のローパスフィルタを取り付けて励起光源とした。一方で図 1 の高速多波長イメージング装置に 490nm のハイパスフィルタを取り付けて観察を行った。ローダミン蛍光イメージングでは、光源に YAG レーザー (532nm, 最大出力 3W) を使用し、550nm のハイパスフィルタを取り付けて観察を行った。また、更なる高速イメージングの試みとして、高速多波長イメージングシステムにイメージインテンシファイア (II: 浜松ホトニクス) を取り付けて、II によるイメージングも検討した。

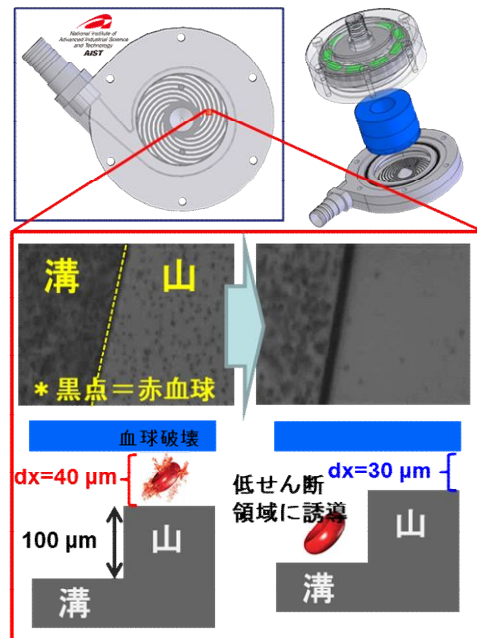


図 4: 動圧浮上遠心血液ポンプ内軸受部  
の高速イメージング

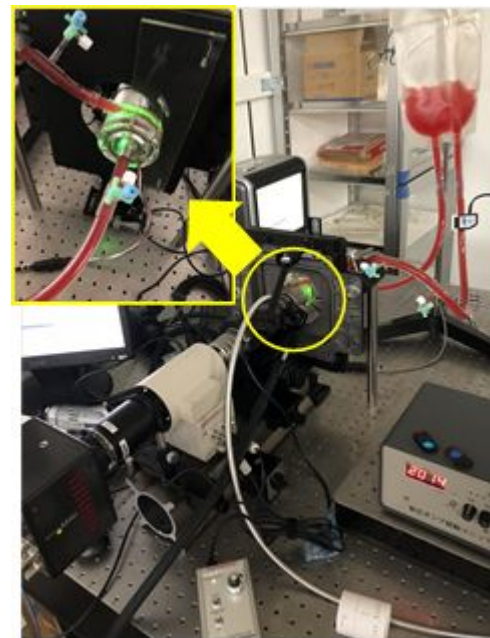


図 5: 動圧浮上遠心血液ポンプの高速蛍  
光イメージング (ローダミン蛍光)

#### 4. 研究成果

##### (1) 開発システムとその妥当性

図6に開発したシステムと、体外補助循環回路部における撮影結果を示す。高速カメラとフィルタチェンジャーを同期させ、図右では8波長ではフィルタチェンジャーの回転速度を500rpmとし、高速カメラの撮影フレームレートを4000fpsとして撮影した結果である。得られた各波長動画について、流線解析ソフト(カトウ光研株式会社 FlowExpert 2D)を使用して流線ベクトルを求めた。結果として、600~720nmの波長帯で、波長を長くするにつれて画像から求まる平均流速が増加していくことを体外補助循環路撮影とブタ頸動脈内撮影において確認し、図2の原理適用が可能であることが示唆された。

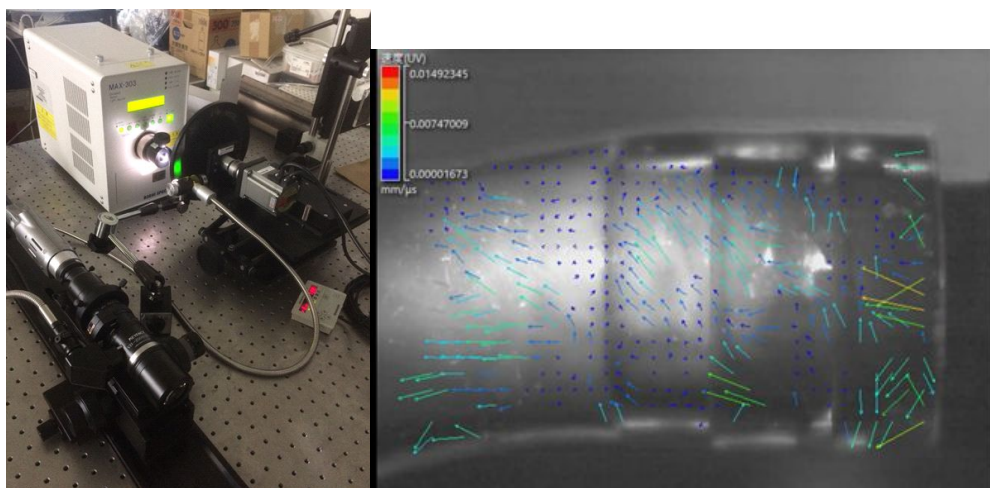


図6：左：開発した高速多波長イメージングシステム、  
右：体外補助循環回路における撮影結果

##### (2) 動圧浮上遠心血液ポンプ内プラズマスキミング効果

図7に回路内HCTと式(1)で求める効率Eの関係(実験#1, #2, #3, 総実験数N=3)を示す。回路内HCTが30%に差し掛かるにつれ、Eの低下が認められるが、それでも90%以上であることがわかった。これは即ち動圧軸受山部のヘマトクリットは全血において約1/10以下になることを意味している。生体内では、主血管に分岐している細い分岐血管へ血液が流れ込む際に、赤血球が流れ込まず血漿のみが流れる「プラズマスキミング現象」が起こることが知られている。同様の現象が動圧浮上遠心血液ポンプでも起こることが明らかとなり、更にその効率を定量的に評価することが本研究を通して出来るようになった。動圧軸受部は血液ポンプ内で最も高せん断場であり、赤血球破壊の主領域と考えられるが、プラズマスキミング効果を利用することで、赤血球を低せん断の溝部へ誘導することができれば、革新的な低溶血性のデバイス開発に繋がることを期待される。

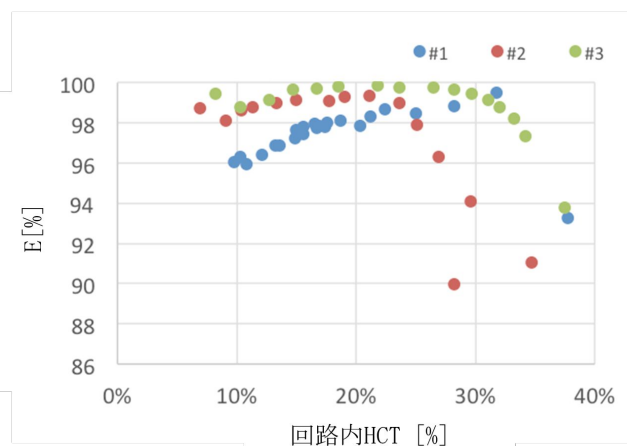


図7：動圧浮上遠心血液ポンプ内  
プラズマスキミング効率 E

##### (3) 高速血小板蛍光イメージング

図8に動圧浮上遠心血液ポンプ内ローダミン血小板蛍光イメージングの結果を示す。メパクリンと比較して、ローダミンの方が高輝度にイメージングできた。これは励起光源の出力が最も大きな要因と考えられた。図8に示す通常の観察では血小板がどこにあるか判別つかないが、ローダミン蛍光イメージングをすることで、黄色に発光する粒子として血小板を認識することができる。血小板活性が起こり壁に付着して群体を成すことでより高輝度にイメージングすることができた。しかしながら、ローダミン蛍光においてシャッター

ースピード 1/1000 s より高速でイメージングすることは輝度が不足し困難であった。II を使用した場合は、最大で 1/20000 s のイメージングが限界であった。これは通常の蛍光イメージングと比較して非常に高速なシャッタースピードであるが、動圧浮上遠心血液ポンプ内の血小板流動を撮影するには数 10 万分の 1 のシャッタースピードが要求されるため、更なる発展が必要である。しかし、活性血小板塊については非常に高輝度で検出することはできるため、現状においても、軸受部の血小板活性のリアルタイム評価には十分有用であることがわかった。

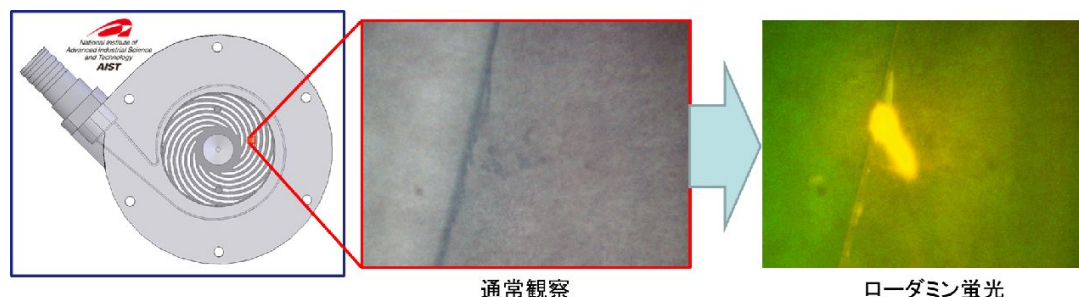


図 8：動圧浮上遠心血液ポンプ内ローダミン血小板蛍光イメージング

#### (4) 血液の可視・近赤外イメージングの実用化と更なる応用

本研究を経て循環器系デバイス内の血流を可視・近赤外光で高速かつ深部まで観測できるようになり、血球破壊や血液凝固に伴う血液の光学特性変化が明らかとなってきた。現在それを応用した体外補助循環用遠心血液ポンプ内の光モニタリングの実用化研究を実施している。市販遠心血液ポンプ内のヘマトクリット、酸素飽和度、血液凝固の光センサの製品化を目指した研究が進んでおり、本成果が実際の臨床の場において、長期安全な体外補助循環実現のために貢献できることが期待される。

本研究の様に、実際に血液を使用し、即ちデバイスを実際に使用する環境下において血液の挙動を詳細に観察しながら、血液適合性評価ができるようになることで、観察技術そのものがデバイス開発のためだけでなく、実際に临床上で使用される「循環器系デバイス用光センサ」として実用化することも考えられるようになった。現在の人工臓器は、生体臓器とは異なり、神経系または感覚系に相当する「センサ」が無い。本技術が実際に臨床で使用可能になる様、より小型・安価・安全・使いやすさを追求するため、現在 MEMS 技術を応用したフレキシブルな血液光センサの開発に着手している。人工臓器に感覚機能が備われば、その情報を基に人工臓器を智能化させることも考えられる。人工臓器や循環器系デバイスが、周囲臓器や血液の状態を常時センシングし、生体と協調・調和的に振舞う、インテリジェント人工臓器発展に、本成果が今後貢献できると考えている。

#### (5) まとめ

高速多波長イメージング装置を開発し、600～720nm における多波長イメージングによって循環器系デバイス内の 3 次元血流情報を獲得しうることが示唆された。また、開発装置を応用して高速、高輝度の循環器系デバイス内血液適合性評価研究を実施し、動圧浮上遠心血液ポンプ内で赤血球と血漿が分離するプラズマスキミング現象が、ヒト全血を使用して起こりうることを発見した。また、血小板の活性についても高速蛍光イメージングによって可能であることを示した。

本研究の様に、実際に血液を使用して、循環器系デバイス内血球細胞レベルの挙動がリアルタイムで評価できれば、その流動を細胞レベルで制御するための有用な知見が得られ、これまでに無い革新的な血液適合性を有する循環器系デバイスの開発につながると期待される。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. D. Sakota, T. Fujiwara, K. Ohuchi, K. Kuwana, H Yamazaki, R. Kosaka, O. Maruyama, "Development of real-time and quantitative monitoring of thrombus formation in an extracorporeal centrifugal blood pump", Proc. SPIE (Optical Diagnostics and Sensing XVIII: Toward Pint-of-Care Diagnostics), 10501, 2018. DOI : 10.1117/12.2288149
2. D. Sakota, T. Fujiwara, K. Ohuchi, K. Kuwana, H Yamazaki, R. Kosaka, M. Nishida, T. Mizuno, H. Arai, O. Maruyama, "Development of a real-time and quantitative thrombus sensor for an extracorporeal centrifugal blood pump by near-infrared light", Biomedical Optics Express 9(1):190-201, 2018. DOI:10.1364/boe.9.000190
3. 近藤和樹, 迫田大輔, 小阪亮, 西田正浩, 丸山修, "動圧浮上遠心血液ポンプ内プラズマ

スキミング現象による軸受部赤血球分離効率の定量”，人工臓器 48(1)，2019.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. D. Sakota, T. Fujiwara, K. Ohuchi, K. Kuwana, H. Yamazaki, R. Kosaka, O. Maruyama, “Development of real-time and quantitative monitoring of thrombus formation in an extracorporeal centrifugal blood pump”, SPIE2018 Photonics West, 2018.
2. 藤原立樹, 迫田大輔, 大内克洋, 桑名克之, 山崎浩行, 丸山修, 荒井裕国, “メラ遠心ポンプ血栓検出光センサの実用化”, JaSECT 関東甲信越地方会大会, 2017.
3. 迫田大輔, 小阪亮, 西田正浩, 丸山修, “人工心臓内の可視化と計測技術”, 第 56 回日本生体医工学会大会, 2017.
4. 迫田大輔, 藤原立樹, 大内克洋, 桑名克之, 山崎浩行, 丸山修, “メラ遠心ポンプ用血栓検出光センサによる血栓形成表面積の定量性”, 第 55 回日本人工臓器学会, 2017.
5. D. Sakota, T. Fujiwara, K. Ohuchi, K. Kuwana, H. Yamazaki, R. Kosaka, H. Arai, O. Maruyama, “Quantitative and real-time monitoring of thrombus formed on the pivot bearing of an extracorporeal centrifugal blood pump”, The International Society for Mechanical Circulatory Support (ISMCS) 2017, 2017.
6. 迫田大輔, 白石泰之, 井上雄介, 山田昭博, 坪子侑佑, 桑名克之, 山崎浩行, 藤原立樹, 大内克洋, 山家智之, 丸山修, “メラ遠心血液ポンプ用血栓検出光センサ -左心室補助慢性動物実験における血栓検出能評価-”, 第 45 回人工心臓と補助循環懇話会学術集会, 2017.
7. 迫田大輔, 藤原立樹, 大内克洋, 白石泰之, 井上雄介, 三浦英和, 山田昭博, 桑名克之, 山崎浩行, 山家智之, 荒井裕国, 丸山修, “メラ遠心血液ポンプ血栓検出光センサの開発と大型動物実験における血栓検出性能評価”, 第 54 回日本人工臓器学会, 2016.
8. 迫田大輔, 藤原立樹, 大内克洋, 白石泰之, 井上雄介, 三浦英和, 山田昭博, 桑名克之, 山崎浩行, 山家智之, 荒井裕国, 丸山修, “遠心血液ポンプ内非侵襲血栓形成光モニタの実用化”, 第 19 回日本血栓検出と治療学会, 2016.
9. D. Sakota, T. Fujiwara, K. Ohuchi, K. Kuwana, H. Yamazaki, R. Kosaka, H. Arai, O. Maruyama, “Development of an optical thrombus detector on the pivot bearing of a rotary blood pump”, 24<sup>th</sup> Congress of the International Society for Rotary Blood Pumps (ISRBP), 2016.

〔その他〕

ホームページ等

・産業技術総合研究所 健康工学研究部門 人工臓器研究グループ：  
[https://unit.aist.go.jp/hri/group/2015\\_ao-4/](https://unit.aist.go.jp/hri/group/2015_ao-4/)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。