

令和元年6月25日現在

機関番号：52501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16394

研究課題名(和文)体外循環装置用血液凝固リスクリアルタイム計測方法の確立

研究課題名(英文)Real-time risk measurement of blood coagulation in extracorporeal circulation

研究代表者

SAPKOTA ACHYUT (SAPKOTA, ACHYUT)

木更津工業高等専門学校・情報工学科・准教授

研究者番号：70724706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：体外循環装置を用いた治療法における血液の凝固が大きな問題である。この問題の対策として、凝固リスクを調べ、抗凝固処置を行う必要があるが、リアルタイムの血液状況を調べることができる方法がない。血液凝固の基本として昔から認められているウィルヒョウの三要素(血液成分の異常、血流の異常、血管内の異常)がある。本研究では血液凝固のバイオマーカーとして血漿タンパク質、代謝物質の変動に関する分子バイオマーカー「血液成分の異常」および赤血球の配向、変形等の生理学的なバイオマーカー「血流の異常」を解析し、電気計測によって血液凝固のリスクを求めることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色と独創的な点は、本研究が生化学情報処理と電気信号処理のノウハウを踏まえたシステムパイオロジーにおける意思決定支援システムの新しいアプローチである点にある。本研究の成果は、医療現場における血液凝固の管理を可能とする画期的なシステムにつながり、血液の状況をリアルタイムで計測し、血液体外循環装置を利用する患者の自宅や病室、手術室など様々な医療現場で抗凝固処置を最適に行うことができるようになる。従って、将来的には患者の命を守るだけでなく、患者の生活の質(QOL)の向上および医療費削減にも結びつくことが予想される。

研究成果の概要(英文)：Blood coagulation is a major problem in extracorporeal circulations. In order to address this problem, there is a need to evaluate coagulation risk and administer the anticoagulation therapy. However, existing technologies are not capable of evaluating the coagulation risk in real time. Blood coagulation risks can be summarized in terms of virchow's triad (abnormal blood constituent, abnormal flow and abnormal cell line). In this work, molecular blood coagulation biomarkers (abnormal blood consistent) and biophysical properties of blood cells and blood flow(abnormal flow parameters) were analyzed, and risk was evaluated in terms of electrical parameters.

研究分野：生体医工学

キーワード：血液凝固 生体電気計測 体外循環 人工臓器

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体外循環装置を用いた治療法（補助人工心臓、人工透析、人工心肺を用いたバイパス手術）における血液の凝固が大きな問題である。この問題の対策として、凝固リスクを調べ、抗凝固処置を行う必要がある。凝固リスクを調べるためには、トロンボエラストグラフィ(TEG)や活性化凝固時間(ACT)、プロトロンビン時間 (PT) などの計測が一般的である。これらは、循環流路から血液を取り出し、活性化剤と混ぜて凝固するまでの時間から血液の凝固リスクを評価する方法である。これらの方法では、一回の凝固リスクの評価に数分かかり、リアルタイムの血液状況を調べることができず、最適な抗凝固薬投与量および投与のタイミングを判断することが非常に困難である。また、抗凝固処置の副作用として出血や血小板減少症などのリスクが高まる。従って、リアルタイムで凝固リスクを把握し、最適な抗凝固処置を行うためのリアルタイム計測法が重要となるものの、未だそのような方法は存在しない。

2. 研究の目的

本研究ではリアルタイムで計測できる血液凝固リスクバイオマーカを用いて、リアルタイムで凝固リスクを調べる方法を確立することを目的とした。具体的には、血液凝固の基本として昔から認められているウィルヒョウの三要素（血液成分の異常、血流の異常、血管内の異常）があり、本研究では血液凝固のバイオマーカとしては血漿タンパク質、代謝物質の変動に関する分子バイオマーカ「血液成分の異常」および赤血球の配向、変形等の生理学的なバイオマーカ「血流の異常」を解析し、リスクを求めることを目的とした。

3. 研究の方法

① 凝固バイオマーカの解析：凝固因子として知られている分子以外の分子バイオマーカの解析として、以下の項目を実施した。(i) 正常と疾患のときの代謝物質含有率を取得：公開の代謝物質データベース (Human metabolome database, <http://www.hmbd.org>) から血液中における代謝物質の含有率(疾患の場合も含め)をプログラミングによって求めた。鑑別判断のため血液凝固の関連に関わらず全ての疾患状態と正常状態の代謝物質の含有率を求めた。(ii) 疾患と血液凝固の関連性を解析：代謝物質データベースにある疾患の血液凝固との相関性を文献マイニングによって求めた。方法としては、PUBMED データベースにある先行研究を検索し、血液凝固と疾患の同時出現を解析し、血液凝固と疾患間の相関性を求めた。(iii) 代謝物質と血液凝固の関連性の解析：血液凝固と疾患間の相関性および疾患で特徴のある代謝物質の情報から血液凝固に関連する代謝物質を求めた。疾患と血液凝固の相関性、代謝物質変動の程度、患者の性別および年齢をパラメータとして解析を行った。生理バイオマーカとしては以下の項目の解析を行った。(iv) 流赤血球の変形と配向の混相流体モデルを構築し、数値計算を行った。(v) 溶血は普段でも血液状態の異常であるが、凝固も加速化するリスクがある。そのため溶血の生物物理モデルを構築し、変動の範囲を計算した。電気数理モデルによって電気的影響を確認した。

② 血液実験方法：ブタとウシ血液を用いた実験を行った（購入先：東京芝浦臓器株式会社）。血液にはクエン酸ナトリウム水溶液を添加されており、血液の血漿中に含まれる遊離カルシウムイオンをクエン酸によってキレート化し、

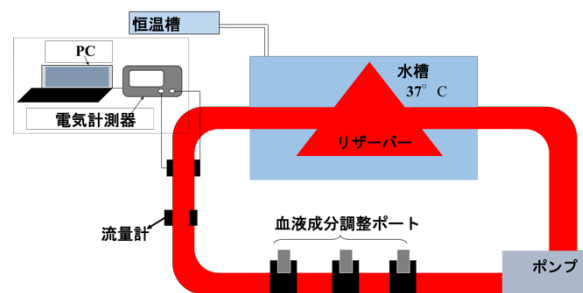


図 1 実験装置

自然に凝固しないようになる。実験中は凝固剤を調整し、凝固リスクを調整した。凝固薬として塩化カルシウム溶液を使用した。ウシ血液は赤血球の特性によりルローを形成しないため、時間経過による変化は少ない。従って、ルローや沈降の影響をなく静止状態での実験を実施し、電気計測に妥当な電気計測条件を決定した。ブタ血液は生物物理学的にヒト血液と近いいため流動実験実施に用いた。

4. 研究成果

分子バイオマーカー：血液凝固と関連があるとされた代謝物上位 10 種を図 2 に示す。血液凝固と特に関連があるとされた代謝物に対して関連する疾患について検証を行った。図 2 に示す通り、L-Alanine と関連ある疾患のうち、心臓移植患 (Heart transplant) と心不全 (Heart failure) は直接血液凝固と関連する。デング熱 (Dengue fever) は、ウイルス感染した細胞で合成・分泌される非構造タンパク質 NS1 抗原がトロンビン・プロトロンビンに結合して凝固反応を阻害することが先行研究で解っている。てんかん (Epilepsy) については抗てんかん薬が血液凝固異常を引き起こすほか副作用が現れやすく、使用には相応の安全管理が必要であることが知られている。

#	Metabolites	Disease
1	L-Alanine	Heart failure
2	Glycine	Dengue fever
3	L-Phenylalanine	Epilepsy
4	L-Tyrosine	Heart failure with preserved ejection fraction
5	Betaine	Heart transplant
6	L-Valine	
7	Acetone	
8	L-Lactic acid	
9	Ethanol	
10	L-Threonine	

図 2 血液凝固と関連する代謝物質と疾病

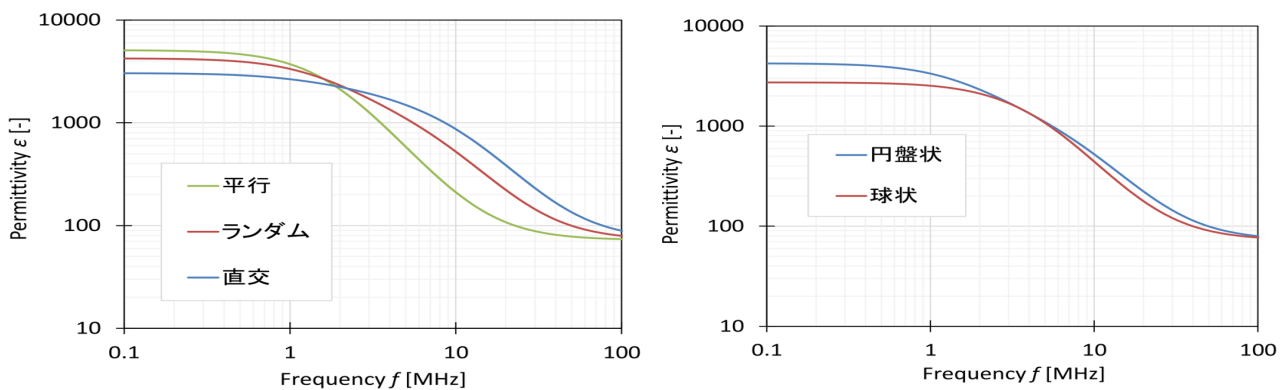


図 3 赤血球の配向と変形による誘電率の変化

生理バイオマーカー：赤血球は楕円体であるため、電流に対して赤血球が平行に配向しているか、垂直に配向しているかで電気特性は大きく変化する。赤血球を任意の向きに揃えることは容易ではないが、せん断力によって配向が変更する。配向は区間と時間で変化するが、代表的なものとして赤血球が電流に対して直交、ランダム、平行に配向している場合の誘電率計算結果を図 3 に示す。周波数によって誘電率が変化することが分かる。1MHz 程度までは平行で誘電率が高く、直交で誘電率が低い。また、平行のときは緩和周波数が低く、直交のときは緩和周波数が高い。したがって、1MHz 程度の周波数では平行の方が誘電率が高く、10MHz 程度では直交の方が誘電率が高くなる。また、2MHz 付近で配向によって誘電率のほぼ変わらない点が存在する。電気計測するとき 2MHz 程度を使用すると配向の影響が少ないと考えられる。また、赤血球の変形による誘電率の変化は複雑であるが、赤血球の形状が円盤状と球状の場合

の計算結果を示す。特に 1MHz 以下での誘電率の違いは顕著である。従って、上述のように 2 MHz 付近で計測することによって配向と変形の影響はなくなる。リスク解析には周波数のこのような特徴を利用し、物理的パラメータの影響を調べることが可能になる。

凝固リスク解析:血液を電気回路的に考えると、高周波数の電流は赤血球の膜と内部にも流れるので、計測結果には赤血球の膜の構築とのような生理学的パラメータと血漿成分の分子バイオマーカの影響も大きくなる。低周波数の電流は血漿のみに流れ、計測結果は赤血球濃度と配向の影響によって変化しない限り、血漿成分(分子バイオマーカ)のみに依存する。従って、5MHz 周波数帯までの実験および高周波数特性外挿法 (Cole-Cole 法) を用いて血液の凝固リスクを解析した。Cole-Cole 法による解析に主に 4 つのパラメータを求めることができるが、その中で図 4 に示す緩和周波数 (Relaxation Frequency) を解析することによって凝固リスクを求めることができた。具体的には関連する分子バイオマーカの変動が大きくなる(凝固リスクが高くなっていく)ほど緩和周波数を上げることが解った。関連する分子バイオマーカが多いためどの分子が大きく変動しているかを区別するまでは困難であるが、凝固した後は緩和周波数が下がる傾向が得られる(拡大図)。凝固しない血液にはこのような傾向は得られないことから、この方法によって凝固リスクを求めることが可能であると考えられる。また今後は、図 2 に示す代謝物質を精密に検査・計測することにより凝固リスクを早期に解析できると考え、同方法は血液凝固検査の新たな方法になると言える。

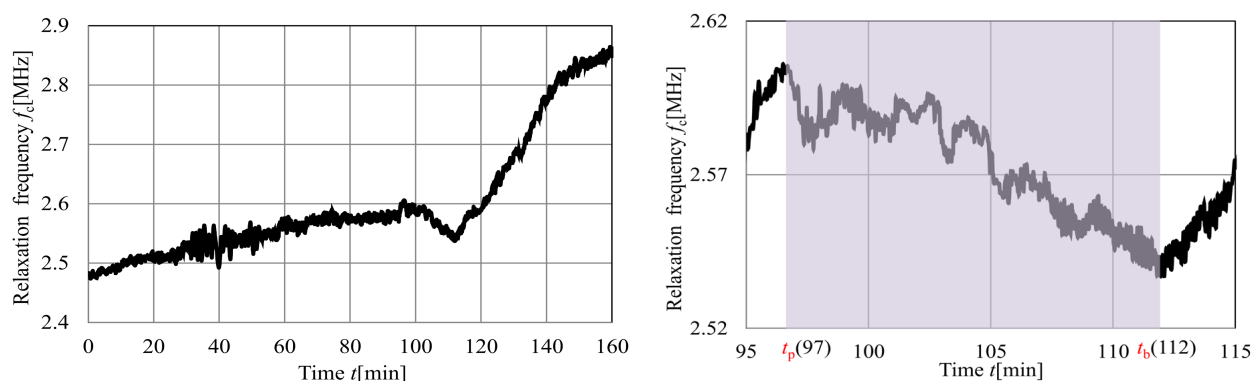


図 4 凝固しやすい血液における緩和周波数の変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) A. Kiet Tran, Achyut Sapkota, Jianming Wen, Jianping Li and Masahiro Takei, Linear relationship between cytoplasm resistance and hemoglobin in red blood cell hemolysis by electrical impedance spectroscopy and eight-parameter equivalent circuit, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 119 pp.103-109, Nov. 2018
- (2) Jianping Li, Daisuke Kikuchi, Achyut Sapkota and MasahiroTakei, Quantitative evaluation of electrical parameters influenced by blood flow rate with multiple-frequency measurement based on modified Hanai mixture formula, Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 268 pp. 7-14, Sept. 2018
- (3) Jianping Li, Achyut Sapkota, Daisuke Kikuchi, Daisuke Sakota, Osamu Maruyama and Masahiro Takei, Red blood cells aggregability measurement of coagulating blood in extracorporeal

circulation system with multiple-frequency electrical impedance spectroscopy, Biosensors and Bioelectronics, Vol.112 pp.79-85, Jul. 2018

〔学会発表〕（計 9 件）

- (1) Achyut Sapkota, Metabolome analysis for new possible hemostatis biomarkers, 63rd Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research, Feb. 2019
- (2) Achyut Sapkota, Use of Bioinformatic tools in diagnostic stewardship, Africa International Biotechnology and Biomedical Conference, Nairobi, Kenya, Aug. 2018
- (3) Achyut Sapkota and Kazunori Hamada, Visualization of interrelated biological words using iterative data mining, 9th international meeting on Visualizing Biological Data, Mar. 2018
- (4) Jianping Li, Nguyen Huu Dung, Daisuke Kikuchi, Madoka Koishi, Osamu Maruyama, Achyut Sapkota and Masahiro Takei, Quantitative analysis of the relaxation frequency of blood during the thrombus formation process, 第39回日本血栓止血学会集会, Nagoya, Japan, Jun. 2017
- (5) Jianping Li, Daisuke Kikuchi, Madoka Koishi, Achyut Sapkota and Masahiro Takei, Application of electrical capacitance tomography on thrombus detection in blood extracorporeal circulation systems, 18th International Conference on Biomedical Applications of Electrical Impedance Tomography, New Hampshire, USA, Jun. 2017
- (6) Achyut Sapkota, Nguyen Huu Dung and Masahiro Takei, Electrical circuit modeling and experimental evaluation of the blood undergoing thrombosis, 61st Biophysical society annual meeting, New Orleans, USA, Feb. 2017
- (7) Achyut Sapkota, Nguyen Huu Dung and Masahiro Takei, Point-of-care coagulation test using electrical signal analysis in blood, International conference on Thrombosis and Embolism, Stockholm, Sweden, Nov. 2016
- (8) Achyut Sapkota, Madoka Koishi, Daisuke Kikuchi, Nguyen Huu Dung and Masahiro Takei., Electrical impedance spectroscopy tomography for blood flow visualization, 8th World Congress on Industrial Process Tomography, Igaussu Falls, Brazil, Sep. 2016
- (9) Achyut Sapkota, Daisuke Kikuchi and Masahiro Takei, Analysis of blood coagulation time in terms of coagulation pathway and blood electrical properties, The 38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Orlando, USA, Aug. 2016

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 : <https://researchmap.jp/sapkota/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※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。