

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：53801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18323

研究課題名(和文) 複屈折計測を原理とする血液中フィブリン可視化システムの研究

研究課題名(英文) Imaging of fibrin network formation using a birefringence measuring system

研究代表者

横山 直幸(YOKOYAMA, Naoyuki)

沼津工業高等専門学校・制御情報工学科・准教授

研究者番号：90710591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：血液の凝固を早期に検知することを目的に、物質の吸光特性と複屈折特性を経過時間的に計測・定量できる方法を提案し、実験的な検証を行った。抗凝固処理を施した豚血液を遠心分離することで血漿を抽出し、塩化カルシウムを添加することで凝固を促進し、前述の計測系により凝固と吸光、複屈折の関係を定量した。

実験の結果、複屈折位相差を原理とする計測系では、吸光を原理とする計測系に対して 1.053 ± 0.791 分だけ早期に変化のピークが生じており、抗凝固解除から10分以内に完全に凝固する試料において10%以上早期に凝固を検出できることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、血液の凝固に関する不可視領域であるフィブリンの凝集を、連続的に定量する試みは行われてこなかった。この手法を用いることで、まったく新しい患者血液の凝固能力の計測装置を開発することが可能となる。また、人工心肺使用中や補助人工心臓装着中など、血栓形成が致死的臨床イベントに直結する環境において、早期に血栓を予測するアラームを開発することが可能となる。これにより、患者への侵襲が低い抗凝固療法を確立し、心臓血管手術において最小限の抗凝固薬を投与することで、手術後の出血コントロールを容易とする可能性もある。

研究成果の概要(英文)：When we use artificial heart and lung machine during open heart surgery, thrombus formation is inevitable event, and thrombus scattering directly results in circulatory failure of the patient. Under the circumstances, medical engineer put anticoagulation drug when the thrombus formation observed around the surgical field and/or extracorporeal circulation circuit. In this study, we proposed novel blood coagulation detection method using birefringence characteristics of fibrin, which is precursor of blood clots, for the purpose to achieve effective anticoagulation; early and small amount administration of anticoagulation drugs.

To evaluate the proposal technique, birefringence optical system that can quantify the phase differences as voltage variation is assembled. As a result of over time optical measurement using coagulation activated porcine plasma, birefringence phase shifts were observed 1.053 ± 0.791 minutes earlier than light absorption of clots formation.

研究分野：人工臓器工学

キーワード：血液 複屈折 光計測 人工心肺

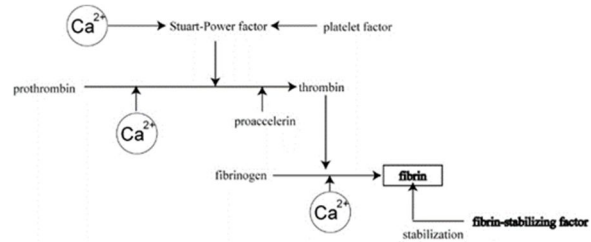
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

心臓手術時に用いる補助循環装置では、血液細胞に対する機械的せん断負荷や、血液が人工物に接触することによる異物反応により凝固系が促進され、人工肺回路内に血栓が形成されることがある。回路内に形成した血栓が患者体内へ送血されると、脳梗塞や腎梗塞、肺塞栓など致命的循環不全の原因となる。このため補助循環中は抗凝固薬の投与により血栓形成を抑制するが、抗凝固療法は副作用である出血とのトレードオフとなる。そこで人工心肺使用時には、術前に行う患者血液の凝固能計測（PT/APTT）と、術中に複数回行う活性化全凝固時間（ACT）計測の結果を参考にヘパリン（抗凝固薬）の持続投与を行う。ヘパリンは血栓前駆物質であるフィブリンの凝集・重合を抑制することで血栓形成を予防するが、副作用である出血のコントロールが難しい。そこで体外循環開始時の抗凝固は最小限とし、人工心肺回路の貯血槽や術野に血栓が観測された時点で、医師や臨床工学技士の経験則でヘパリンの追加投薬を行っている。血液ポンプ底部に可視光を照射することで早期に血栓を発見する研究など^[1]が行われているが、センサが検出した時にはすでに安定型血栓が形成しており、臨床的リスクの回避にはつながらない。

そこで、血栓の前駆物質であるフィブリンを検知することで、血栓が形成される前に最小限の抗凝固が行えるシステムの開発が求められている。しかし、フィブリンはX線回折や原子間力顕微鏡などを用いた真空乾燥状態でのみ分子構造が観察されている可視光波長以下の微細分子であるため、血液中の光イメージングは困難とされてきた。また、様々な条件下でフィブリンが血栓に至るまでに要する時間に関するデータも不足しているため、フィブリンの凝集・重合を予見する抗凝固プロトコルも確立していない。

一方、X線回折を用いた解析の結果などから、乾燥させたフィブリンは異方性の結晶構造となることが解っている^[2]。また一般に、異方性物質は方位面によって異なる屈折率を呈し、光が通過するとき振動面の向きによって位相差（複屈折位相差）を生じることが知られている。本研究では、凝集したフィブリンが異方性構造であることに着目し、複屈折によるイメージングを試みる。フィブリン凝集の検出原理が確立すれば、これまでよりも早期かつ少ない薬量での抗凝固が可能となり、臨床的リスクと抗凝固療法による副作用の軽減が期待される。



[1] Sakota, D., et al.(2016). "Development of an Optical Detector of Thrombus Formation on the Pivot Bearing of a Rotary Blood Pump." *Artif Organs* 40(9) pp.834-841.

[2] Zabczyk, M., et al. (2015). "Assays of fibrin network properties altered by VKAs in atrial fibrillation - importance of using an appropriate coagulation trigger." *Thromb Haemost* 113(4): 851-861.

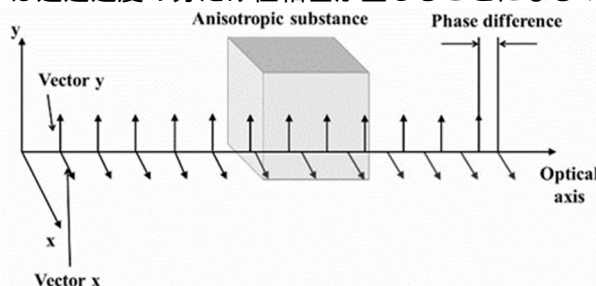
2. 研究の目的

本研究の目的は、可視光波長では検出できないフィブリンの凝集・立体構造を、複屈折位相差の原理を用いて定量化し、フィブリンの検出原理を確立することである。これにより、体外補助循環（人工心肺）や透析医療、補助人工心臓による移植待機などの臨床現場において血栓の形成を早期に検出し、最小限の抗凝固療法実施に寄与することができる。また、ACT計測のような可視光を用いた血液の凝固能計測装置に代わるフィブリンの凝集能を根拠とした血液凝固能の計測装置の実現につなげる。

3. 研究の方法

(1) 複屈折現象

複屈折とは、光ベクトルの振動面の方位によって、屈折率が異なること、あるいはそのような媒質によって起こされる現象である。光基本ベクトルが、位相子の媒質中を通過すると、光基本ベクトル x と光基本ベクトル y の光の進む速度が異なる。これは位相子が x 軸方向と y 軸方向で屈折率が異なることにより、光ベクトルの進む速度に差が生じるためである。その結果、位相子から出た光ベクトルは通過速度の分だけ位相差が生じることになる。これを複屈折位相差とよぶ。



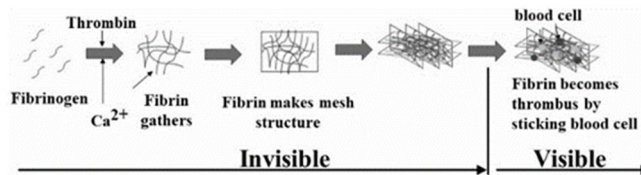
複屈折現象の概念図

(2) フィブリンの凝集と血栓形成

血液が異物と接触すると血液中酵素のトロンピンが生成され、トロンピンは血漿タンパクのフィブリノーゼンを切断してフィブリンを生成する。

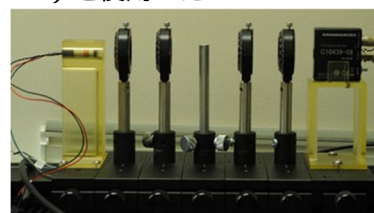
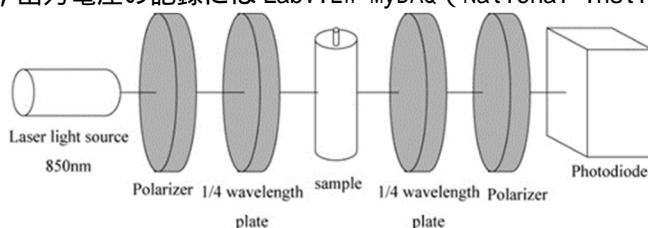
フィブリンは血小板とともに凝集して

網目・立体構造を作り上げる。そこに血球成分（主に赤血球）が付着することで血栓となる。血栓は観測が可能だがフィブリンはナノサイズの物質であるため、可視光でのイメージングが不可能である。なお、上述のヘパリンはトロンピンと結合することでフィブリンの生成を阻害する薬剤である。



(3) 実験系

光源（アライメント用レーザーダイオード 850NM X 10MW, Edmund）による直進光が偏光子（WGH-30C, 渋谷光学）を通ることにより直線偏光となり、その後 1/4 波長板（S333-830-4, 駿河精機）を通過することで円偏光となる。試料を通過した後に再び 1/4 波長板、偏光子を通過して検出器（フォトダイオードモジュール C10439-08, 浜松ホトニクス）により血液試料に照射した円偏光の歪みを受光器の電圧値として定量する光学系とした。本システムにおいて、血液試料に照射された円偏光は、試料中の異方性物質であるフィブリンにより歪みを生じ、検出器に到達する光強度が増加する。これにより、試料におけるフィブリン凝集の計測を行うものとした。なお、出力電圧の記録には LabVIEW MyDAQ (National Instruments) を使用した。



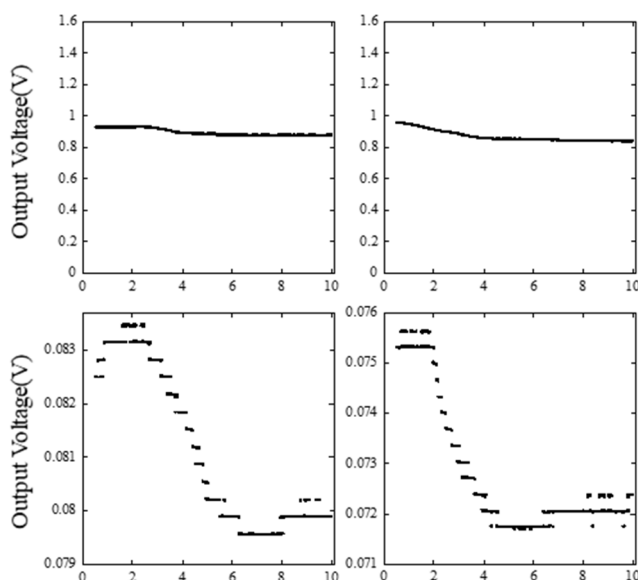
実験に用いた光学系（左：概要 右：装置外観）

(4) 実験方法

クエン酸 Na で抗凝固処理した豚血液を 6709G で 10 分間遠心分離して血漿を抽出し、 CaCl_2 水溶液を混合することで抗凝固を解除した（計測開始）。この試料を光学系に治具で固定し、10 分間レーザを照射して、検出器の受光強度を計測した。実験は、血液試料に照射した円偏光の歪みを受光器の電圧値として定量する実験（フィブリン凝集の定量）と、4 枚の光学フィルタを取り除いて血液試料による可視光の吸光のみを定量する実験（血栓形成の評価）の 2 種類を行った。なお、実験はすべて室温 24 の環境にて行った。

4. 研究成果

以下に代表的な実験結果 2 例を示す。上図は血漿試料におけるレーザ吸光特性の時間的変化を計測した結果であり、下図は血漿に円偏光を照射することで時間経過とともに変化する偏光円の歪による受光センサ電圧の変化を示している。



CaCl_2 により抗凝固を解除した血漿は、10 分間の計測後にすべて凝固していることが確認され、吸光度計測の実験では CaCl_2 添加後 $1.978 \pm 0.815(\text{min})$ から電圧が低下し、その $2.774 \pm 0.816(\text{min})$ 後に一定値となった。一方で、光学フィルタを用いた複屈折計測の結果は CaCl_2 添加直後に電圧が増加し、 $0.926 \pm 0.618(\text{min})$ 後にピーク値となる正弦波様の電圧変化を呈した。

吸光実験の電圧降下の開始を drop start(a)、複屈折計測における電圧値の最大点を first peak(b)とすると、この 2 点間で $1.053 \pm 0.791(\text{min})$ の時間差となった。

光学フィルタを取り除いた実験系では、試料の吸光特性のみが検出器の電圧低下として定量されるシステムとなっている。このため、この実験において見られた一時的な電圧降下は、血漿試料の凝固によりレーザの吸光度が上がった結果として生じたと考えられる。一方で、光学フィルタを介した実験において観測された正弦波様の電圧変化は、凝集したフィブリンが形成した

異方性物質による複屈折の影響が現れていると考えられる。

上述の drop start (a) と first peak (b) の差に着目すると、いずれの血漿試料においても、吸光による電圧変化の開始よりも複屈折による電圧変化のピークが 1 分程度早く観測されており、本計測系を用いることにより、血栓前駆段階を検出できる可能性が示唆された。

また、本実験において観測された電圧変化では、その開始時間は偏差が大きく波形も異なることから、個体ごとの凝固能による差、即ち、凝固因子の濃度差によるものではないかと考えられる。また、血漿試料ごとに開始時の電圧値に差が生じているのは、試料を封入した毛細ガラス管の厚みが 1 本 1 本異なっていることが原因であると考えた。

本研究の結果より、吸光特性を原理として検知できる血栓形成よりも 1 分程度前にフィブリン凝集による複屈折が観測可能であることが分かった。また、本研究において構築した計測系で使用する受光器の出力電圧と血液の凝固因子の関係を詳細に検証することで、個体特性である血液の凝固能に関して、新しい評価方法を確立できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naoyuki YOKOYAMA et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 Fibrin Network Formation and Thrombolysis using a Birefringence Measuring	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 582-583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 勝俣敦，横山直幸
2. 発表標題 複屈折による血液凝固の光イメージング
3. 学会等名 富士山麓アカデミック＆サイエンスフェア2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----