日消外会誌　28（4）：786～792，1995年

半導体レーザードップラー微小循環血流計による肝viabilityの評価

東京慈恵会医科大学第2外科
岡本　友好　稲垣　芳則　椎野　豊　中村　純太
中里　雄一　佐野　勝英　柳沢　暁　青木　照明

半導体レーザー光を使用したレーザードップラー微小循環血流計による肝微小循環血流量をイヌ阻血モデルを用いて測定し，エネルギー代謝の面より肝viability評価における本法の有用性について検討した．また，ウリナスタチンの作用機序について本法を用いて検討した．雑種成犬を使用し60分阻血（A）群，90分阻血（B）群，90分阻血＋ウリナスタチン（C）群の3群にわけ，阻血前後の微小循環血流量（以下，F），エネルギーチャージ（以下，SC），動脈血中ケトン体比（以下，AKBR）を測定し，各群の生存率比較および組織学的検索を行った．FとECの相対変化率は有意に正の相関を示した．再灌流後30分時のFが予後の指標となった．ウリナスタチンの肝疵護効果機序は微小循環改善が主座であると思われた．よって本法は再現性，連続性，簡便性の面で肝臓のviability評価に有用であり，病態評価に期待のもてる検査法である．

Key words: laser Doppler velocimeter, microcirculation of liver, ischemic damage of liver in dogs

I. はじめに

近年，肝障害の発生における微小循環障害の関与，意義について多方面から検討がなされるようになった[1)2)]．とくに消化器外科領域では，肝切除時の肝門部における血流遮断後および肝移植時血流再開後などの病態において，肝viabilityに微小血管血流量が深く関与していることが明らかになってきた[3)]．これらの観点より微小循環血流量を測定することによって肝viabilityや肝障害の程度把握が可能であると考えられる．

肝微小循環血流量測定には，旧来よりBSP[4)]やICG[5)]などの色素法，アイソトープ[6)]，水素ガス[7)]や電解式による[8)]クリアランス法などが用いられてきた．さらに非侵襲的かつ連続的に測定できる方法としてレーザードップラーによる測定法が報告されている[4)~12)]．当初，レーザードップラー微小循環血流計（以下，LDV）のレーザー光はヘリウムイオンを使用したものが多く用いられていたが，肝臓などの赤血球密度の高い組織血流測定にはヘリウムイオンレーザー光による測定は問題が少なくなかった[13)]．しかし近年，Bonnerら[14)]の研究をはじめとし半導体レーザー光を使用したLDVによる測定の報告がみられるようになりその有用性が明らかにされた[15)~17)]．今回われわれはイヌ肝阻血モデルにおいて，半導体レーザー光を使用したLDVによる肝微小循環血流量を測定し，肝エネルギー代謝との比較より肝viability評価における本法の有用性について検討した．さらに，従来より微小循環改善作用があるとされるウリナスタチンを投与し[18)~20)]，その作用機序について本法を検討した．

＜1995年1月11日受理＞別刷請求先：岡本　友好
〒105　東京都港区西新橋3―25―8　東京慈恵会医科大学第2外科

II. 実験材料と方法

1. 実験動物

体重10kg前後の雑種成犬を使用した．餌，水分は実験当日まで与えた．

2. 実験モデルの作製

麻酔はketamin hydrochloride 15mg/kgを筋注後pentobarbital sodium 10mg/kgを静注し，気管内挿管下に純酸素のみの換気とし，適宜pentobarbital sodiumを追加した．V-Vバイパス用に頸静脈にカニュレーションするとともに，大腿動脈側枝より動脈圧モニター用にカテーテルを挿入した．

腹部季助下横切開で開腹後門脈，肝動脈および総胆管を十分に露出，はく離した．なお迷走神経肝枝はできる限り確認し，温存した．LDVのプローベは肝門部

操作に支障を来さないように左葉腹側面に無作為に装着し，門脈血流測定用の血流計プローブは脾静脈の門脈流入部より約1cm下部に装着した．阻血はヘパリン10単位/kg静注後門脈，肝動脈をクランプすることにより施行したが肝動脈が2本以上存在するときはすべてをはく離しそれぞれをクランプした．阻血中はV-Vバイパスとして脾静脈よりカニュレーション（TS-WR3825，テルモ社製）し，門脈血を頸静脈にポンプ(EYELA，RP-30型，東京理化器械社製)を使用し還流した．

3．測定項目および方法

開腹後直ちにLDVプローベを装着し連続的に微小循環血流量を測定し，阻血前（ウリナスタチン投与群は投与群)，阻血後30分，60分，阻血解除前(60分阻血群は30分と解除前)，阻血解除後30分，60分ごとに肝組織エネルギーチャージ（energy charge：以下，EC)，動脈血中ケトン体比（arterial ketone body ratio：以下，AKBR）を測定した[21]．また各群で生存率を比較した．LDVは波長780nm半導体レーザー光を用いたFLOW MONITOR-MBF3D LASER BLOOD（Moor Instruments England社製）を使用し，プローベは直面接触型とした．門脈血流量の測定は超音波トランジットタイム血流計（ADVANCE社製）を使用した．LDVでは微小循環血流量（以下，F）のほかに赤血球密度（以下，C）と赤血球速度（以下，V）が表示され，F=C×Vで計算される．本法で計測されるFは血流量の絶対値ではないため阻血後のF値はすべて阻血前（ウリナスタチン投与群は投与前）の値を100%としてその後の変化を相対変化率（以下，%F）として表した．また，平均血圧，門脈血流量およびECも同様にその後の変化を相対変化率として表し，それぞれ平均血圧相対変化率(以下，%BP)，門脈血流量相対変化率(以下，%Vp)，EC相対変化率（以下，%EC）とした．

各測定ポイントにて右葉前縁より約2g（湿重量）の肝組織を採取し，直ちに肝組織内adenine nucleotideを測定するため液体窒素にて凍結保存した．凍結させた肝は粉末にした後7%で過塩素酸溶液でホモジナイズし，遠沈した．水酸化カリウムで中和後再び遠沈し，その上澄みをろ過後分析に供した．分析は高速液体クロマトグラフィーによって行った[22]．ECはEC=(ATP+0.5×ADP)/(ATP+ADP+AMP)で計算した[23]．AKBR測定はまず動脈圧モニター用カテーテルより各3cc採血後，血漿を分離した．除蛋白後Williamson法[24]の原理に基づき，3-ヒドロキシ酪酸およびアセト酢酸濃度を補酵素，酵素液（ケトレックス試薬，三和薬品化学）を順に加え，分光光度計(KETO-340II，伊原島子工業製）にて測定した．

組織学的検索は阻血解除後60分時に行った．組織は採取後10%ホルマリンで脱水固定し，ヘマトキシリンエオジン染色にて検鏡した．

4．実験群

阻血時間およびウリナスタチン投与の有無により以下の3群に分けた．

A群：60分阻血のみ（n=5)．

B群：90分阻血のみ（n=6)．

C群：90分阻血に加え，阻血10分前にウリナスタチン（持田製薬）5万単位/kgを静注した（n=6)．

6．統計学的処理

微小循環血流量，ECの相対変化率

AKBRの平均値の差の検定にはstudent-t検定を，生存率の比較にはχ^2検定を使用し，$p<0.05$を有意な差とした．

III．結　果

A群，B群における阻血前後の%Fと%ECとの関係を検討すると，相関係数r=0.74，回帰式Y=1.06X−21.54で有意に正の相関を示した（Fig. 1)．

各群の7日生存率はA群100%(5/5)，B群33%(2/6)，C群67%(4/6)で，A群はB群に対し生存日数の延長を認めたがC群はいずれの群とも有意差を認めなかった．

各群における阻血前後の%Fの変化をみると，A群は阻血解除後30分時でほぼ阻血前値にまで回復したがB群，C群では約50%の回復しかみられず，A群に比

Fig. 1 Correlation between flux and energy charge. Each value is calculated as relatively changed rate.

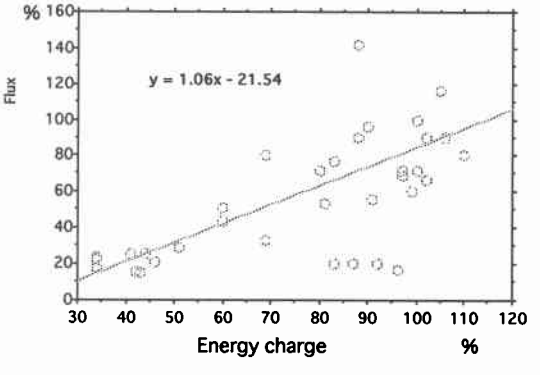


Fig. 2 Changes of flux before and after reperfusion. Each value is calculated as a relatively changed rate. (mean±SD)

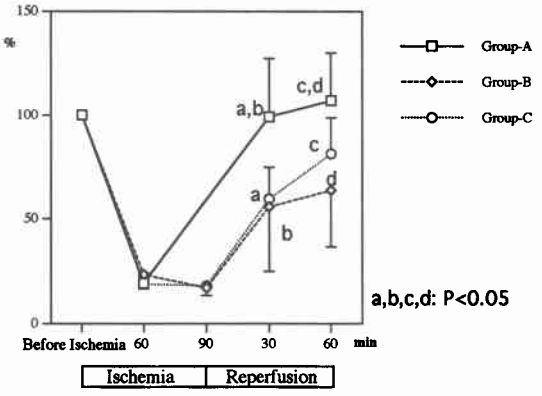
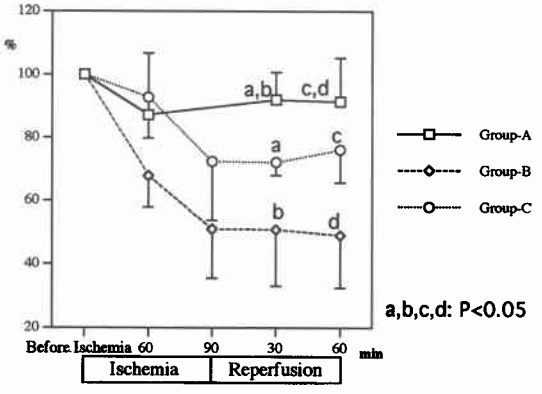


Fig. 3 Changes of mean blood pressure before and after reperfusion. Each value is calculated as a relatively changed rate.



べ有意に低値を示した．阻血解除後60分時ではC群は81.7%まで回復し，A群同様，B群に対して有意差を認めた(**Fig. 2**)．%BP も%F とほぼ同様に推移し，阻血解除後30，60分時でA群はB，C群に対し有意に高値を示した（**Fig. 3**)．%Vp を比較すると各群とも阻血解除後30分時までには有意差を認めず変化したが，60分時ではB，C群間に有意差を認めた（**Fig. 4**)．%EC および AKBR は阻血中は各群とも低値を示し，阻血解除後A，C群は良好な回復を示したが，B群は阻血解除30分後からの回復が不良であり，60分時にはA，C群に比べいずれも有意に低値を示した（**Fig. 5, 6**)．各条件下におけるCとVの変化は，Cは常にほぼ一定で，よってVはFの変動に比例した．

A群，B群，C群の阻血解除後60分時における光顕

Fig. 4 Changes of portal vein flow before and after reperfusion. Each value is calculated as a relatively changed rate

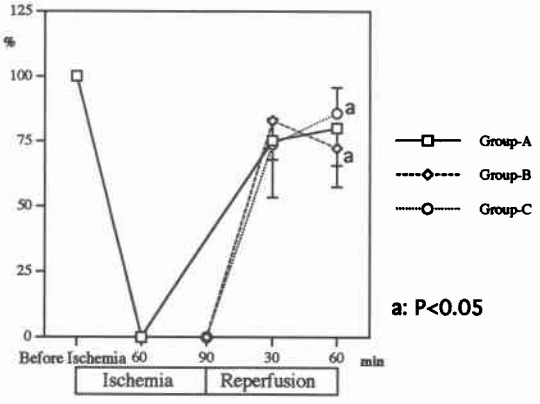


Fig. 5 Changes of energy charge before and after reperfusion. Each value is calculated as a relatively changed rate.

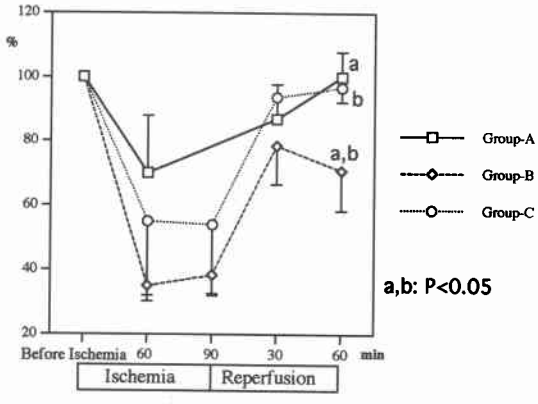
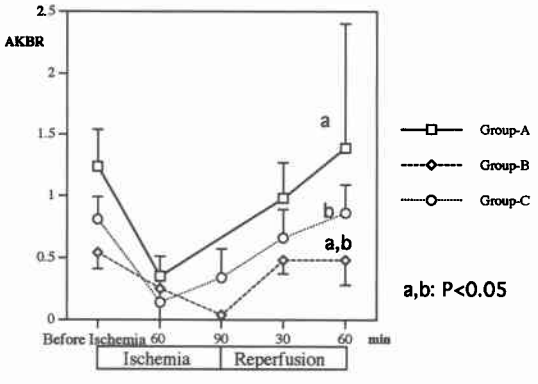


Fig. 6 Changes of AKBR before and after reperfusion.



組織像を比較すると，B群では中心静脈周辺に広範囲に肝細胞索の乱れ，肝細胞の空胞化がみられ，類洞腔の拡大，狭小も認められた(**Fig. 7**)．一方，A群では中心静脈周辺にわずかに肝細胞の空腔化が認められるのみであった(**Fig. 8**)．C群では肝細胞の変化はB群同様に認められたが類洞腔はほぼ均一に保たれていた(**Fig. 9**)．

Fig. 7 Histological findings of the liver of group-A at 60 minutes following declamping. (Hematoxylin-eosin stain, ×40)

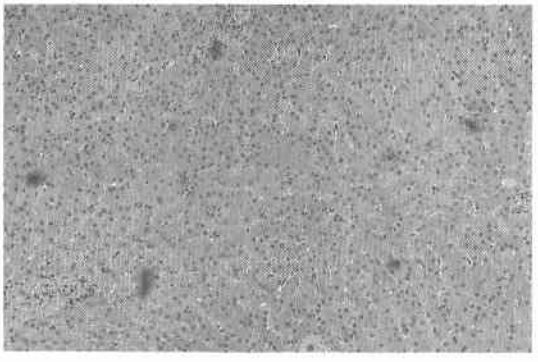


Fig. 8 Histological findings of the liver of group-B at 60minutes following declamping. (Hematoxylin-eosin stain, ×40)

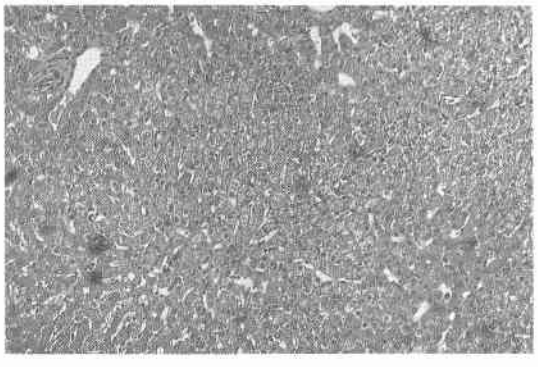


Fig. 9 Histological findings of the liver of group-C at 60 minutes following declamping. (Hematoxylin-eosin stain, ×40)

IV 考　察

手術時に障害肝のviabilityを評価する方法として，ECを直接測定するのは不可能に近い．近年Ozawaらの提唱するAKBR[21]がECをよく反映し，術中術後に当施設でも汎用し肝機能評価に役立っている．しかしAKBRも測定完了までには1時間近く要し，測定手技の熟練を必要とする．今回簡便かつ迅速に測定しうるレーザードップラーによる微小循環血流測定がどの程度肝臓の障害度および予後に関し表現しうるかを，ECやAKBRとの相関より考察した．

レーザードップラーによる微小循環測定の試みは，1975年Stern[25]によって報告されて以来，従来の微小循環測定法との比較や各種病態下での測定から，その簡便性，非侵襲性，連続性などの点で有用な検査法であるとされた[26)27]．

レーザードップラーによる微小循環測定の原理は以下のとおりである．一定波長のレーザー光が送光ガラスファイバーを通って組織内に照射される．組織内に入射された光子のうち静止組織に反射されたものはドップラー効果を受けず受光ファイバーに戻る．一方，運動粒子(主にヘモグロビン)に反射された光子はドップラー効果を受け周波数変調され，これを受光器で電気信号に変換する．この電気信号をアナログプロセッサーにより増幅処理した後，デジタルプロセッサーにより高速サンプリングし平均赤血球速度をリアルタイムに解析する．

従来の多くの報告はヘリウムネオンレーザー光を使用したものであったが[9)~12)]，Bonner[14]が半導体レーザー光を使用した測定を考案し，近年半導体レーザー光を使用したものが主流となりつつある[15)~17)]．ヘリウムイオンレーザー光に比べ半導体レーザー光を使用した場合の長所としては，1) ヘリウムイオンレーザー光では波長が638.2nmとヘモグロビンのそれと近いため，測定臓器の赤血球密度が高い場合やランダム運動速度が遅い場合（肝臓など）多重散乱の影響のため赤血球密度の変化による血液量の変化が実際より過小に評価される[13]，2) ヘリウムネオンレーザー光を使用したLDV計はヘリウムガスの半減期から一般的に測定可能時間が7万から10万時間と制限されるのに対し

て，半導体レーザー光の場合は半永久的に使用可能である，3）半導体レーザー光を使用すると装置が小型軽量化でき電気効率もよい，4）半導体レーザー光のほうが多チャンネル化に対応しやすいなどがあげられる．とくに1)の理由から有色組織の測定に高い精度を有する点が本法の最大の特徴であるといえる．

西森ら[16]はこの半導体レーザーLDVと水素ガスクリアランス法との比較から本法の測定精度を検討し，手術中の肝循環動態把握に有用であったとしている．Diebelら[28]はブタを使用した肝微小循環測定に，Wangら[29][30]はラットの出血性ショックやsepsisのモデルにおける各実質臓器の微小循環測定に本法を用いている．

A群，B群における%Fの差は各時点とも平均血圧の違いによる肝動脈血流量の差であると考えられた．また，阻血中も完全に0%とならなかったのは，血管自体の運動が残っていたか[13]あるいは肝静脈の影響と考えられた．再灌流後60分時の組織学的検索でB群に認められた類洞の変形はA群で認められず，形態学的にも微小循環障害が示唆された．

ウリナスタチンはショック時は虚血時に臓器保護作用があるとされているが，その作用機序については不明な点が多い．とくに肝臓においては肝細胞への直接効果や微小循環保持効果など様々の報告がみられる[18)~20]．本実験においては，90分阻血後再灌流60分時に%ECやAKBRとともに%Fも有意に非投与群に比べ投与群は高値を示し，門脈血流量も有意差を認めた．また再灌流30分時には%EC，AKBR，%Fはどれも有意差を認めなかったことより，温阻血再灌流障害におけるウリナスタチンの肝EC保持作用は，肝細胞への直接効果より微小循環改善による2次的効果が主座であると考えられた．

本実験結果よりA，B群間に生存率で差を認めたが，B，C群間では差を認めなかった．各群の%Fを同時に比較してみると，再灌流後30分時の%FがA，B群間で有意差を認め，B，C群間では有意差を認めなかった．このことより再灌流後30分時の%Fが予後をよく反映したと考えられた．

LDVは深さ約1mm以内の肝実質の赤血球の流れを反映しているが，主に動脈によって栄養されでる被膜の影響を受けやすく，動脈血の変化により強く影響されるという報告もみられる[31]．本研究結果より，A，B群間では動脈血流量の違いにより%Fに有意差がみられ，一方，B，C群間では門脈血流量の違いにより%Fに有意差がみられたと考えられることから，動脈および門脈のそれぞれの変化に対し本LDVは反応することが確認された．

LDVを実際測定するにあたっていくつかの問題点が挙げられる．第1に測定部位をどこにおくか，第2にプローベの接触状態をいかに維持するかという点である．今回われわれは手術操作に支障をきたさない左葉に無作為にプローベを装着したが同一肝内で測定値が大きくなる病態も考えられるので，今後数か所で測定しその平均をとるなどの全肝臓の微小循環を反映する測定法の検討が必要であろう．接触固定に関しては本実験系での表面接触型プローベではとくに重要で，円盤型のアダプターを使用し，円盤部に瞬間接着剤を塗布し固定した．しかしわずかの接触でもとれる場合もあり新たなアダプターの工夫も必要であろう．

測定値解析における最大の問題点は本法で表示されるFは絶対値ではないということである．このため必ず比較対象となるコントロール値が必要となる．よって各病態における測定値の理解には今後さらに動物および臨床応用にわけて十分で詳細なデータの比較検討が必要である．

また本実験系ではCは常に一定で，FおよびVのみが変化したが鬱血肝モデルなどではCが変動することが予想され，障害の種類によってはF，C，V間に特異な関係が成立する可能性がある．各種の障害モデルにおける本法の応用は肝障害の病態の早期診断に有用な情報をもたらすと思われる．

以上，本法は簡便性，再現性，連続性の面で従来の微小循環測定法より優れ，ヘリウムネオンレーザー光によるLDVより肝臓などの組織の測定には高い精度を有し，阻血肝障害時のbiabilityおよび予後の評価に有用であると思われた．測定法，測定値解析などに問題点も含んでいるが，今後肝臓をはじめ他の臓器の微小循環測定や病態評価に大いに期待の持てる測定法であると考えられた．

この稿を終えるにあたり，レーザードップラー微小循環血流計について数々のご助言をいただいた片岡実業，加藤春男氏に謝辞を申し上げます．

本論文の要旨は第42回日本消化器外科学会総会および第29回日本移植学会総会にて発表した．

文　献

1）竹井謙之，後藤守孝，福井弘幸ほか：肝微小循環―最近の話題―．最新医　46：1837―1844，1991
2）藤原研司，持田　智，黒川　清：消化器系における

微小循環障害．代謝 29：33—40，1992
3) 竹井謙之，川野 惇，房本英之ほか：虚血性肝障害の発生機序と予防．循環制御 13：239—247，1992
4) Bradley SE, Inglefinger FJ, Bradley GR et al: Estimation of hepatic blood flow in man. J Clin Invest 24：890—897，1945
5) Caesar J, Shaldon S, Sherlock S: The use of indocyamine green in the measurement of hepatic blood flow as a test of hepatic function. Clin. Sci 21：43—57，1961
6) Torrance HB, Gowenlock AH: Radioactive colloidal clearance techniques to measure liver blood flow in man. Clin Sci 22：413—423，1962
7) 柿本隆生：水素クリアランス法による肝局所血流量の研究．日消病会誌 79：2267—2276，1982
8) 越智次郎，小西明美，木下良太ほか：肝組織血流量及び組織酸素分圧同時測定による肝微小循環の解析．日消病会誌 83：180—188，1986
9) Shepherd AP, Riedel GL, Kiel JW et al: Evaluation of an infrared laser-Doppler blood flowmeter. Am J Physiol 254：832—839，1987
10) Arvidsson D, Svensson H, Haglund U: Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. Am J Physiol 254：471—476，1988
11) Stern MD, Lappe DL, Bowen PD: Continuous measurement of tissue blood flow by laser-Doppler spectroscopy. Am J Physiol 232：441—443，1977
12) 川本智章，井戸健一，高橋仁志ほか：レーザードップラー法による肝組織血流測定の基礎的研究．日レーザー医会誌 5：615—618，1985
13) 柳橋 健，今村正之，戸部隆吉：レーザードップラー微小循環血流測定法の消化器領域への応用．呼吸と循環 34：741—747，1986
14) Bonner R, Nossal R: Model for laser Doppler measurement of blood flow in tissue. Appl Optics 20：2097—2107，1981
15) 高橋昭三，小林信や，金子源吾ほか：温阻血が再灌流後の組織血流量に及ぼす影響．半導体レーザー微小循環血流計の有用性も含めて．今日の移植 5：577—581，1992
16) 西森 章，田中一彦，中村正人ほか：レーザードップラー法による肝組織血流量測定の検討．循環制御 12：121—125，1991
17) Almond NE, Wheatley AM: Measurement of hepatic perfusion in rats by laser Doppler flowmetry. Am J Physiol 262：203—209，1992
18) 山本保博，大塚敏文：イヌのエンドトキシンモデルにおける Urinary Tripsin inhibitor 投与の肝循環動態に及ぼす影響．最新医 42：2727—2733，1987
19) 古川一隆，岡本英三，山中若樹ほか：冷阻血障害に対する CoQ10, ulinastatin の細胞保護効果に関する検討—肝血流遮断低温灌流モデルを用いて—．Cyto-prot Biol 7：225—234，1989
20) Okamoto T, Inagaki Y, Aoki T: Use of ulinastatin for improving the viability of liver graft. Transplant Proc 25：2961—2964，1993
21) Ozawa K, Aoyama H, Yasuda K et al: Metabolic abnormalities associated with postoperative organ failure: a redox theory. Arch Surg 118：1245—1251，1983
22) Cabada AT, Stein K, Martel D et al: Biochemical appraisal of models for hepatic ischemia-reperfusion injury. Circ Shock 36：163—168，1992
23) Atkinson DE: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter interaction with feedback modifiers. Biochemistry 7：4030—4034，1966
24) Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA: Enzymic determination of D (-)-β-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. Biochm J 82：90—96，1962
25) Stern MD: In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. Nature 564：56—58，1975
26) 井戸健一，寺田友彦，川本智章ほか：レーザードップラーによる犬肝組織血流測定の検討．肝臓 26：215—221，1985
27) 斎田 宏，村上元庸，関 理ほか：レーザードップラー法によるラット胃粘膜血流測定の検討．日消病会誌 81：16—21，1984
28) Diebel LN, Wilson RF, Duchavsky SA et al: Effect of increased intra-abdominal pressure on hepatic arterial, portal venous, and hepatic microcirculatory blood flow. J Trauma 33：279—283，1992
29) Wang P, Zhou M, Rana W et al: Defferential alterations in microvascular perfusion in various organs during early and late sepsis. Am J Physiol 263：38-43，1992
30) Wang P, Hauptman JG, Chaudry IH: Hemorrhage produces depression in microvascular blood flow which persists despite fluid resuscitation. Circ Shock 32：307—318，1990
31) Arvidsson D, Svensson H, Haglund U: A comparision between laser doppler values obtained from the surface and the parenchyma of the liver. Edited by Tsuchiya M et al. Microcirculation-update. 1. Excerpta Media, Amsterdam-New York-Oxford, 1987, p376—379

An Assessment of Liver Viability Using Laser-Doppler Velocimeter with Semiconductor Laser

Tomoyoshi Okamoto, Yoshinori Inagaki, Yutaka Shiino, Junta Nakamura,
Yuichi Nakasato, Katsuhide Sano, Akira Yanagisawa
and Teruaki Aoki
Department of Surgery (II), The Jikei University School of Medicine

Hepatic microcirculatory flow (HMF) was measured by laser-Doppler velocimeter (LDV) with a semi-conductor laser using an ischemic model in the dog, and the usefulness of this method was evaluated by assessing liver viability from the standpoint of energy metabolism. The mechanism of ulinastatin's effect was also investigated using LDV. Clamping of the hepatic artery and portal vein was regarded as hepatic ischemia. Animals were divided to 3 groups as follows. The first was a group of 60 minutes' ischemia (A), the second, 90 minutes' ischemia (B), and the last, 90 minutes' ischemia + administration of ulinastatin (C). HMF, energy charge (EC) and arterial ketone body ratio (AKBR) were measured before and after ischemia, and the survival rates and histological findings were compared between the groups. Comparisons between A and B, and B and C, showed that HMF, which was expressed as a relatively changed rate (%F), was linearly related to energy charge and %F at 30 minutes after reperfusion was predictive of survival outcome. The main action of ulinastatin's protective effect against liver damage was thought to be that of maintaining the microcirculation. The LDV with semiconductor laser was useful in monitoring liver viability, and this procedure is expected to be used in understanding the pathogenesis of liver damage.

Reprint requests: Tomoyoshi Okamoto Department of Surgery (II), the Jikei University School of Medicine
3-25-8 Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo, 105 JAPAN