

電気インピーダンスを用いた単純浸漬保存肝の viability 評価法に関する実験的研究

岐阜大学第1外科, 同 第1解剖*

山内 希美 広瀬 一 千賀 省始
林 勝知 鬼束 惇義 正村 静子*

生理食塩水単純浸漬保存肝の viability の評価法として電気インピーダンス (EI) 測定の意義を検討した。Wistar 系雄性ラットを I 群: 4°C, II 群: 15°C, III 群: 25°C 保存とし, 電顕的評価, 肝組織中高エネルギーリン酸化合物 (HPLC), EI を測定した。なお EI は LCR メータにより 20Hz-1MHz までの 39 周波数を使用した。ミトコンドリアスコア (Mt. S) は I, II, III 群でそれぞれ保存 240 分, 120 分, 60 分まで 3 未満であった。%ATP は I, II, III 群でそれぞれ同保存期間に虚血前の 18~21% に減少した。%tan δ は虚血後直ちに減少し, Mt. S が 3 未満の時点で 0.033~0.086%/min となった。%ATP と %tan δ の間に有意な正の相関が認められた。%tan δ の変化はミトコンドリアの構造破壊および ATP の変化と関連性があることが示唆され, 電気インピーダンスは保存肝の viability を評価するのに有用である可能性が示唆された。

Key words: simple strage, electrical impedance, ultrastructure, adenine nucleotide, water content

緒 言

現在, 末期肝不全に対する最も有効な外科的治療として肝臓移植に頼らざるをえないのが現実である¹⁾²⁾。一方, 肝臓は虚血に対する耐容性には限界があり, これを越えると移植後の non functioning graft の発生の原因となる³⁾⁴⁾。よって保存中の肝の viability を推測することは重要である。現在までに電気インピーダンスを利用し心拍出量計測, 体内水分の測定などが報告されており⁵⁾⁶⁾、最近では生体の電気特性は周波数依存性, 温度依存性が強く, 組織は虚血時には経時的に電気特性が変化する⁷⁾ことに着目し, 石川ら⁸⁾は電気インピーダンスを利用して, 保存中の心の viability を予測出来る可能性があることを報告している。

同様に今回, 保存肝においても電気インピーダンスを測定することによって, 組織学的変化を連続的かつ非侵襲的に捕えることが可能であるか否かを, 保存肝の viability を表わす他のパラメーターとしての肝組織中 ATP 含有量および超微形態学的変化と比較対照することにより検討した。

方 法

体重 350~400g の Wistar 系雄性ラットを用いた。

エーテル麻酔下に開腹し, 門脈よりカテーテルを挿入した。尾静脈よりヘパリン 300u を全身投与し, 10 分後 ice slush を腹腔内に入れ肝を局所冷却しつつ, 下大静脈を切断すると同時に門脈より 4°C ヘパリン加乳酸化リンゲルにて灌流しながら肝を摘出した。ただちに温度の異なる生理食塩水に単純浸漬保存した。保存開始から保存終了まで保存生理食塩水の温度は保存予定温度 $\pm 1^\circ\text{C}$ の範囲内に保った。保存温度により次の 3 群に分けた。I 群: 4°C 生食水保存群 (n=6), II 群: 15°C 生食水保存群 (n=6), III 群: 25°C 生食水保存群 (n=6) である。

上記 3 群において肝の形態学的観察を行い, 肝組織中高エネルギーリン酸化合物を測定するとともに電気インピーダンスを測定した。また肝組織中水分含有量を測定した。

A) 電顕的観察

保存肝を 1 時間ごとに約 3mm 角に細切除し, 直ちにリン酸緩衝液と 2.5% グルタルアルデヒドの 4°C 固定液に浸漬し, 4°C にて 12 時間保存した。さらに同液に浸漬した肝組織を 1mm 角に細切し, オスミウム・リン酸緩衝液で 4°C, 1 時間の後固定を行った後, アセ

トンにて脱水し, Quetol 812, DDSA, MNA, DMP に包埋した。包埋後のブロックからウルトラマイクロームを用い, ガラスナイフにて約0.1 μ mの超薄切片を作成した。染色は酢酸ウラニールとクエン酸鉛にて二重染色を行い, 透過型電子顕微鏡(日立製 H800型)にて観察した。観察にあたっては, 6,000倍にて心筋の viability の評価に用いた Flameng のミトコンドリアスコア¹⁰⁾を基準にし, 正常: 0, matrix fine granules の消失: 1, matrix の淡明化, 部分的クリステの破壊像: 2, 著明なクリステの破壊像, focal condensation: 3, 外膜の破壊: 4 と5段階評価をし, ミトコンドリアの scoring を行った。観察する肝細胞は無作為に選択し, そのミトコンドリアの数は200とした。カウントしたミトコンドリアスコアの平均をとり, ミトコンドリアスコアとして半定量的に評価した。

B) 肝組織中 ATP 含有量の測定

肝組織中 ATP 含有量は各群とも虚血前, 保存開始から電気インピーダンス測定終了まで I 群は60分ごとに360分まで, II群は30分ごとに180分まで, それ以後60分ごとに360分まで, III群は15分ごとに90分まで, 120分以後60分ごとに360分まで保存肝組織を採取した。採取した肝組織を-80°C, 48時間凍結乾燥したのち, 高速液体クロマトグラフィー (high pressure liquid chromatography; HPLC) (TOSO 社製) を用いて単位乾燥重量あたりの ATP 含有量 (μ mol/gdw) を測定した。カラムは ODS-80TM (TOSO 社製), 緩衝液は磷酸緩衝液 (0.5M, pH 6) を使用した。

C) 電気インピーダンスの測定方法と誘電特性のパラメータ

測定電極に針の半径0.225mm, 電極間隔6mm, 刺入部長9mm のステンレス性平行2針電極を使用し, 保存

開始直後に肝中間葉に電極を刺入し, 15分ごとに測定した。なお電極刺入部位はすべて中肝葉とし, 測定開始から終了まで同位置にて行った。LCR メータ (YHP 社製, HP4284A) をコンピュータにて制御して, コンダクタンス (G) キャパシタンス (C) を計測した。測定周波数は20Hz から1MHz までの39周波数を使用した。これから肝組織の導電率 (χ) および比誘電率 (ϵ') を次式にて算出した。平行2針電極の針の半径 acm, 間隔 rcm, 刺入部長 tcm とすると,

$$\text{導電率}(\chi) = G \cdot \log_e((r-a)/a) / \pi / t$$

$$\text{比誘電率}(\epsilon') = C \cdot \log_e((r-a)/a) / \pi / t / \epsilon_0 \quad (\epsilon_0 : \text{真空の誘電率} 8.875 \times 10^{-14})$$

$$\text{直流導電率} \chi_1 \text{ の影響を除いた損失項 } \Delta \epsilon'' = (\chi - \chi_1) / 2\pi f \epsilon_0 \quad (f : \text{周波数特性})$$

以上を用いると, $\tan \delta$ (誘電正接) は次式で表現される⁹⁾。

$$\tan \delta = \Delta \epsilon'' / \epsilon'$$

D) 検定法

測定値, 算出値は平均値 \pm 標準偏差で示し, 各群の% $\tan \delta$ と% ATP の相関については1次回帰分析を行った。統計学的比較には危険率5%未満を有意差ありとした。

E) 水分含有量

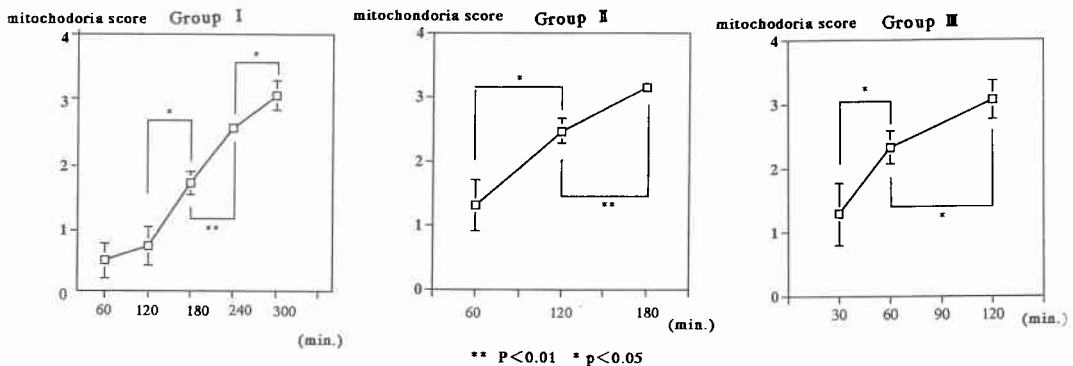
I ~ III群において保存後60分から360分までそれぞれ60分ごとに肝組織を採挿した。肝湿重量と, 48時間の-80°C凍結乾燥後の肝組織乾燥重量より, 肝組織中水分含有量を算出した。

結 果

A) 電顕的评价

ミトコンドリアスコアでは I 群は保存240分, II群は保存120分, III群は保存60分でそれぞれ 2.53 ± 0.04 ,

Fig. 1 Mitochondria score



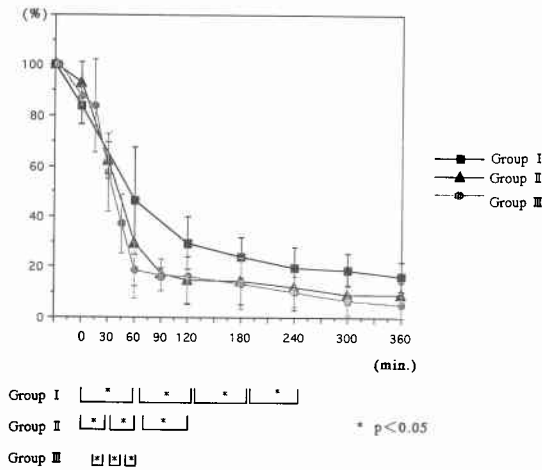
** P < 0.01 * p < 0.05

2.47±0.18, 2.46±0.26であった。次の評価時刻, すなわち I 群は300分, II群は180分, III群は120分においてそれぞれ3.03±0.19, 3.14±0.05, 3.12±0.14であった (Fig. 1)。

B) 肝組織中 ATP 含有量

虚血前の ATP 含有量を100%とした時のそれぞれの時間における ATP 含有量を%ATP 含有量として示した (Fig. 2)。電顕的評価におけるミトコンドリア

Fig. 2 %ATP



スコアが3未満に留まる時間, すなわち I 群では保存後240分, II群では保存後120分, III群では保存後60分で%ATP の値は I 群では21%, II群では18%, III群では19%であった。

C) 保存肝の電気特性

tanδ の経時的变化が保存早期に最も大きいIII群の1例を示す (Fig. 3)。虚血前および保存直後の tanδ の peak 値に変化はないが, peak 値をとる周波数は変化した。その後 tanδ の peak 値は低下すると同時に peak 値をとる周波数も低下した。

保存直後の tanδ の peak 値に対するそれぞれの時間における tanδ の peak 値を%tanδ とした。

各群の%tanδ の変化を示した (Fig. 4)。電顕的評価におけるミトコンドリアスコアが3未満に留まる時間, すなわち I 群で保存240分, II群で保存120分, III群で保存60分の%tanδ の値はそれぞれ81%, は77%, で72%であった。その前後における%tanδ の変化速度は, I 群は前は0.033%/min, 後は0.017%/min, II群は前は0.086%/min, 後は0.019%/min, III群は前は0.037%/min, 後は-0.039%/min となった。

D) %ATP と %tanδ との関係

%tanδ と %ATP の関係を示す (Fig. 5~7)。plot した点はそれぞれの虚血後の時間における平均値である。() 内にそれぞれの虚血時間を示した。I, II,

Fig. 3 One case of tanδ in Group III: Peak of tanδ decreased immediately after ischemia

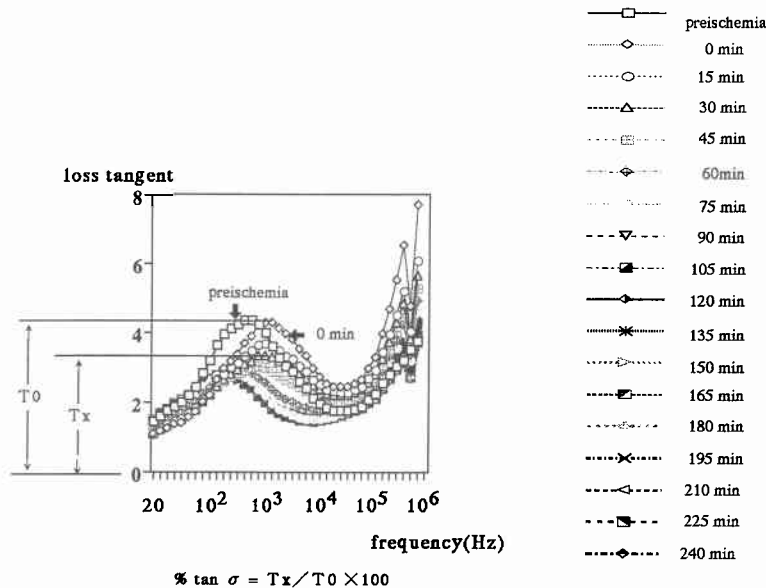


Fig. 4 %tanδ

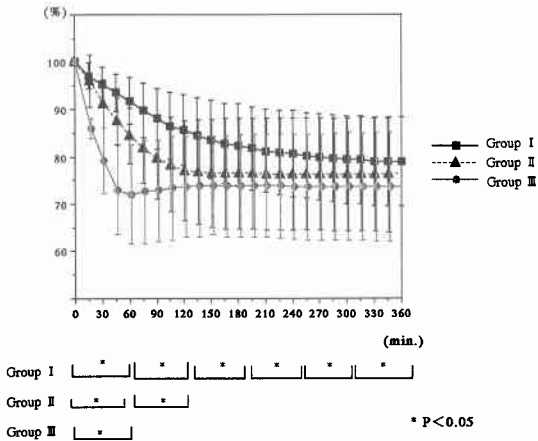


Fig. 5 Correlation between %ATP and %tanδ (Group I): $y=4.08x-307.52$ ($r^2=0.98$, $p<0.001$). () : a time of ischemia.

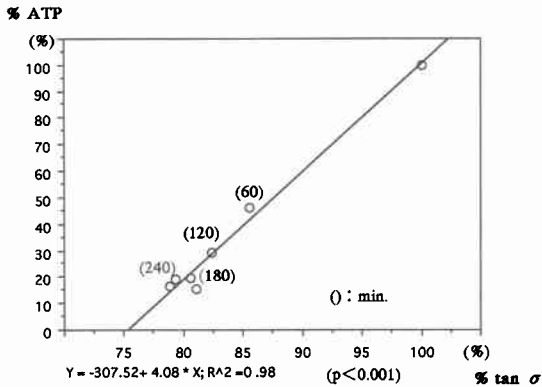


Fig. 6 Correlation between %ATP and %tanδ (Group II): $y=2.72x-193.73$ ($r^2=0.82$, $p<0.001$). () : a time of ischemia.

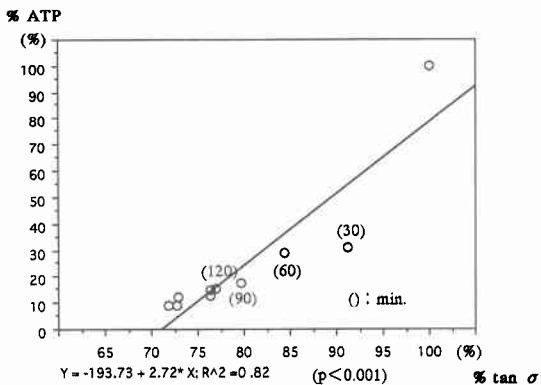


Fig. 7 Correlation between %ATP and %tanδ (Group III): $y=3.01x-201.15$ ($r^2=0.96$, $p<0.001$). () : a time of ischemia.

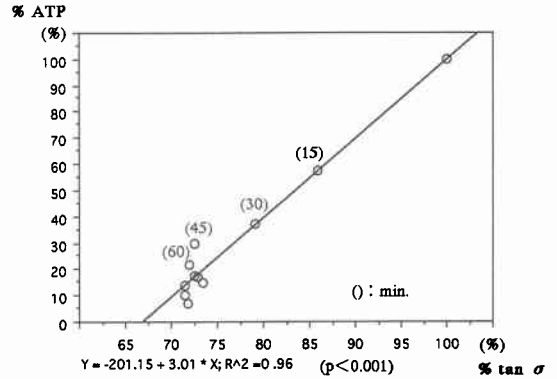
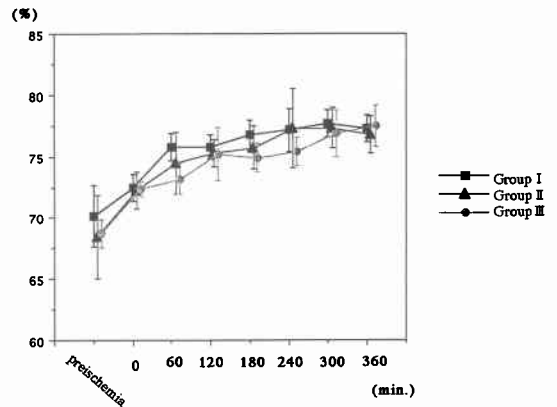


Fig. 8 Water content of the liver during preservation in Group: I~III: Water content increased during preservation in all groups but there were no significant differences between any two groups.



III群でそれぞれ,

$y=4.08x-307.52$ ($r^2=0.98$, $p<0.001$), $y=2.72x-193.73$ ($r^2=0.82$, $p<0.001$), $y=3.01x-201.15$ ($r^2=0.96$, $p<0.001$)

の直線回帰となり, 3群とも有意の相関を認めた.

E) 水分含有量

I~III群の水分含有量を示した(Fig. 8). 3群とも水分含有量は経時的に増加するが, それぞれの時間において3群間に有意差は認められなかった.

考 察

肝保存の研究報告は1960年 Mooreら¹¹⁾に始まる. 彼らは灌流液に生理食塩水を用い, イヌの肝臓の28°Cの

低温灌流保存を行い30分から45分の保存が可能であると報告している。その後、保存液の組成に工夫がなされ、1974年 Labotte¹²⁾はイヌの肝臓に Euro-Collins 液を用いて24時間の低温浸漬保存が可能であることを報告した。さらに1988年 Jamieson¹³⁾はイヌの肝臓にて UW 液を用い48時間の低温浸漬保存に成功したと報告している。また Olthoff¹⁴⁾はヒトの肝臓にて UW 液を使用し20時間保存肝で移植後の graft function が良好であると報告した。

一方、肝不全に対する治療として肝移植が定着しはじめている現在でも non function graft の報告がある⁴⁾。そこでこれを防止するために、保存肝の viability をリアルタイムにかつ簡便、非侵襲的な方法で測定することにより、移植後の non functioning graft を回避することが望ましい。

細胞微細構造の電顕的観察において、Flameng は心臓ではミトコンドリアスコアが3以上では、非可逆的障害を意味すると報告している¹⁰⁾。森ら¹⁵⁾は血流停止による肝細胞の壊死の発生過程を微細構造の変化で観察し、ミトコンドリアが標的小器官であることを示唆している。そこでミトコンドリアの不可逆点は、カルシウムの処理機能を失って基質中にリン酸カルシウムの沈着がみられた状態、およびミトコンドリア膜の崩壊した状態であると報告している。また肝保存において経時的に阻血変化におけるミトコンドリアの形態学的変化を観察した報告はあるが¹⁶⁾、定量化した報告はない。そこで Flameng が心筋の虚血性変化に用いたミトコンドリアスコアを肝細胞に用いた。本実験においてミトコンドリアスコアが3未満にとどまっている点は I, II, III群でそれぞれ保存240分, 120分, 60分であった。したがって組織学的には I 群は240分, II群は120分, III群は60分まではそれぞれミトコンドリアの機能は可逆的である可能性があると推測した。

組織中の ATP は残存量が虚血障害時における臓器の viability の判定に有用であると報告されている^{17)~19)}。平良は肝虚血再灌流実験において酵素的方法により測定した肝 ATP 量は死亡率と相関する肝血流再開後の ATP の回復勾配と相関関係があり、ATP は肝 viability の指標として適切であること、さらに常温下にて虚血再灌流実験を行い、ATP 値は虚血約10分後に正常値の10~20%にまで低下するが、同 ATP 含有量は再灌流後の回復において安全限界内にあると報告している²⁰⁾。本実験では I 群, II群, III群で組織学的に可逆性があると推定される安全限界のそれぞれ保存

240分, 120分, 60分においては、いずれの群でも%ATP は10~20%の間にあり、上記再灌流後の ATP 回復限界であると報告されている可逆性のある変化に相当した。

一方、生体の電気特性は組織の種類によって異なるので、これを利用し種々の生体組織の電気インピーダンスに関する報告が多くなされてきた。1967年 Geddes²¹⁾は多くの研究者の報告をまとめ、電気インピーダンスは組織により異なることを示している。その原因として金井⁷⁾は生体の電気特性は周波数依存性が強いこと、温度依存性が大きいこと、切除組織は経時的に電気特性が変化することなどを述べている。

一方、肝組織片の電気インピーダンスの経時変化に関する報告²²⁾はあるものの、その変化から保存肝の viability を予測する研究の報告はない。そこで本実験では経時的に保存肝の電気特性を示す指標として $\tan\delta$ を計測することにより、生体の組織学的変化を捕えることが可能かどうかを検討した。虚血肝では ATP の産生能は低下し、Na-K ポンプが停止するため、細胞膜の脱分極がおこり、Na の細胞内への流入とともに水分の細胞内流入がおこり、細胞の膨化が起こるとされている¹⁵⁾。本実験でも組織内水分量は増加しており矛盾しない。また細胞内 pH は酸性に傾き細胞膜は脆弱となり、Ca が細胞内へ流入し、細胞内小器官であるミトコンドリアは膨化、破壊され、細胞は決定的な打撃をうける¹⁵⁾²³⁾²⁴⁾。Grant²⁵⁾は電気的特性の変化は細胞を構成する細胞膜の変化や、細胞内の膜構造をもつ小器官の膜構造の変化によるものを反映していると報告し、Andrzej⁹⁾は $\tan\delta$ は細胞膜容量や組織の膜構造およびその変化を反映しており、 $\tan\delta$ を測定することによって、形態的な変化を予測することが可能であると報告している。そこで本実験では $\tan\delta$ を経時的に測定することにより、その変化より形態学的変化の推測を試みた。上記のごとく、組織学的に或いは生化学的に可逆性のある虚血時間前の各群の% $\tan\delta$ の変化率は I, II, III群でそれぞれ0.033, 0.086, 0.037であった。一方、上記可逆性のある虚血時間経過後の各群の% $\tan\delta$ の変化率はいずれの群も上記のそれより減少し続けた。したがって% $\tan\delta$ の変化率は各群で異なるものの、上記の変化率以上であれば組織学的にあるいは生化学的に可逆性がある可能性が示唆された。石川²⁶⁾は4°C生理食塩水単純浸漬保存心筋における電気インピーダンスは保存2時間後、減少率は最高に達し、それ以後も減少し続け、その上昇率が0.1

$\Omega\text{cm}/\text{min}$ を下回る時間は3.5~6.0時間の範囲内に存在し、同保存時間内である保存4時間を心筋保存において安全限界と報告している。

本実験ではそれぞれの群において%ATPと% $\tan\delta$ は有意な相関を示したことから少なくともこれらの時点までは% $\tan\delta$ は%ATPを示す指標の1つになり得る可能性が示唆された。またこれらの時点では $\tan\delta$ の変化は少なく、これを大きく変化させる組織の変化が止まった可能性が示唆される。

また組織水分量の変化と電気インピーダンスは必ずしも相関しないことは心保存で報告されている²⁶⁾。本実験でも経時的に肝組織中水分含有量を計測したが、肝組織中水分含有量はどの群も増加傾向にあった。しかしいずれの保存時間においても3群間に有意差は認められないにもかかわらず、電気インピーダンスに差があった。したがって電気インピーダンスは単に細胞浮腫のみを反映しているのではないことを確認した。

一方、電気インピーダンスの経時変化はその保存液によって特異的であり、単純浸漬保存におけるviabilityの予測に一律の基準を設定することは不可能であり、保存液別に一定の基準を設けることで保存中の経時変化から、移植後のviabilityを予測することが可能になりうるとの報告²⁶⁾がある。本実験では保存液として生理食塩水を用い、保存温度を変化させることによって経時的な% $\tan\delta$ の変化を観察し、組織の阻血による物理的な因子を反映して% $\tan\delta$ が変化していると考えた。しかしながら、一方ではこのモデルにおいてはこれが生化学的な%ATPの変化と相関した。したがって%ATPおよびそれに付随して生じる生化学的变化ならびに組織の物理的因子が引き起こす変化の総和として% $\tan\delta$ が変化すると考えられる。したがって虚血肝における電気インピーダンス変化の意義についてはこれらの因子が一つ一つ解明されて行くべきであるが、このモデルのような特定のモデルにおいては% $\tan\delta$ は%ATPに相関することが示唆された。将来はこれらの% $\tan\delta$ の変化に関連する因子の果たす役割が一つ一つ解明されて行かねばならないと考える。

本論文の要旨は第46回日本消化器外科学会総会(福井)において報告した。

文 献

- 1) Starzl TE, Iwatsuki S, Shaw BW et al: Orthotopic liver transplantation in 1984. *Transplant Proc* 17: 250-258, 1984
- 2) Delmonico FL, Jenkins RL, Freeman R et al: The high-risk liver allograft recipient: should allocation policy consider outcome? *Arch Surg* 127: 579-584, 1992
- 3) Show BW, Gordon JRD, Starzl TE: Hepatic retransplantation. *Transplant Proc* 145: 264-271, 1980
- 4) Oscar B, John JF, Andreas I et al: Prioritization and organ distribution for liver transplantation. *JAMA* 271: 140-143, 1994
- 5) 藤波隆夫, 高田和夫, 奥田宣明ほか: 胸部電気インピーダンス法による心機能の評価. *現代医療* 19: 1785-1793, 1987
- 6) 奥田宣明, 家田幸一, 堀江健司ほか: 胸部電気抵抗率による肺水腫の診断. *医用電子と生体工学* 29: 105-108, 1991
- 7) 金井 寛: 生体電気インピーダンスとその臨床応用. *医用電子と生体工学* 120: 140-146, 1982
- 8) 石川 真, 広瀬 一, 佐々木栄作ほか: 電気インピーダンスを用いた保存心のviability評価法の確立に関する実験的研究. *移植* 29: 128-136, 1994
- 9) Andrzej S, Stainslaw SS: Use of loss-tangent function in dielectric spectroscopy. *Bioelectromagnetics* 7: 259-269, 1986
- 10) Flameng W, Marcel B, Daenen W et al: Ultrastructural and cytochemical correlates of myocardial protection by cardiac hypothermia in man. *J Thorac Cardiovasc Surg* 79: 413-424, 1980
- 11) Moore FD, Wheeler AB, Demissianos HV et al: Experimental whole-organ transplantation of the liver and of the spleen. *Ann Surg* 152: 374-387, 1960
- 12) Labotte L, Pontegnie IS, Otto JB et al: The effect of isoproterenol and Collins' solution on the preservation of canine livers with simple cooling. *Transplant Proc* 6: 301-303, 1974
- 13) Jamieson NV, Sundberg R, Lindel S et al: Preservation of the canine liver for 24-48 hours using cold storage with UW solution. *Transplantation* 46: 517-522, 1988
- 14) Olthoff KM, Millis JM, Imagawa DK et al: Comparison of UW solution and Euro-Collins' solution cold preservation of human liver grafts. *Transplantation* 49: 284-290, 1990
- 15) 森 道夫, 小川勝洋: 病理からみた壊死. *細胞* 16: 216-220, 1984
- 16) 小泉雅典, 大河内信宏, 佐々木崇ほか: 肝保存における類洞内皮細胞の超微形態. *移植* 25: 30-38, 1989
- 17) 村川真司, 鬼束惇義, 森 義雄ほか: ³¹P-NMR法を用いた肝虚血障害時のリン化合物の変動の検

- 討. *Cyto-prot Biol* 8:255-262, 1990
- 18) Lanir A, Jenkins RL, Caldwell C et al: Hepatic transplantation survival: Correlation with adenine nucleotide level in donor liver. *Hepatology* 8:471-475, 1988
- 19) Gonzales FX, Rimola GA, Antonin M et al: Adenine nucleotides in liver tissue and organ viability human liver transplantation. *Transplant Proc* 24:133-134, 1992
- 20) 平良健康: 肝虚血の耐用性と機能維持に関する実験的研究. *日外会誌* 81:427-440, 1980
- 21) Geddes LA, Baker LE: The specific resistance of biological materials. *Med Biol Eng Comput* 5:271-293, 1967
- 22) 小西康備, 森本忠興, 木内陽介ほか: 摘出ラット肝の電気インピーダンスの経時的変化に関する研究. *医用電子と生体工学* 31:233-238, 1993
- 23) Farber JL, Chien KR, Mittnacht S: The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 102:271-281, 1981
- 24) 西田俊明, 川島康生, 田川邦夫: 虚血障害の分子機構. *代謝* 24:379-387, 1987
- 25) Grant EH, Sheppard RJ, South GP: Dielectric behaviour of biological molecules in solution. Clarendon Press. Oxford, 1978
- 26) 石川 真, 広瀬 一, 佐々木栄作ほか: 電気インピーダンスを用いた単純浸漬保存の保存時間限界の予測に関する実験的研究. *日胸外会誌* 43:1579-1586, 1995

Detection of Hepatic Ischemic Injury in Simple Storage by Electrical Impedance

Kimi Yamauchi, Hajime Hirose, Syoushi Senga, Katutomo Hayashi,
 Atsuyoshi Onituka and Shizuko Syoumura*
 First Department of Surgery, First Department of Anatomy*,
 Gifu University School of Medicine

Electrical properties of the liver, especially when they are measured at various frequencies, reflect its structural and physiological changes. This study was designed to examine viability during preservation of the liver by measurement of electrical impedance. The liver was preserved by simple storage in saline. Livers were divided into three groups according to the preserving temperature: Group I, 4°C (n=6); Group II, 15°C (n=6) and Group III, 25°C (n=6). They were examined for morphological changes by electron microscopy during the preservation. Two hundred and forty minutes in Group I, 120 minutes in Group II, 60 minutes in Group III were the times for a mitochondrial score below 3. Adenine nucleotide (ATP) levels of the preserved liver were measured by high pressure liquid chromatography. Percent ATP decreased 18-21% of the preischemia level at the same times described above in each group. Permittivity and conductivity in measurement of electrical impedance were measured at 39 frequency points in the 20 Hz-1 MHz range with an LCR meter system. Then $\tan \delta$ was calculated from the permittivity and conductivity, as a function of frequency. Percent $\tan \delta$ decreased immediately after ischemic injury and changed between 0.033-0.086%/min at the time for a mitochondrial score below 3. Significant correlation between percent ATP and percent $\tan \delta$ was found in all groups. These results suggest that measurement of electrical impedance could be an index of the viability of the preserved liver.

Reprint requests: Kimi Yamauchi First Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
 40 Tukasa-cho, Gifu-city, 500 JAPAN