

常温肝虚血 再灌流時の電気特性による

肝 viability の経時的評価法の検討

岐阜大学第 1 外科

伊藤 英夫 廣瀬 一 佐々木栄作 石川 真
片桐 義文 松友 寛和 林 昌俊 千賀 省始
林 勝知 鬼束 惇義

肝切除時に用いられる肝門部血行遮断により肝虚血が生じる。そこで、電気インピーダンス(EI)を用いたラット虚血肝の viability 評価法を検討した。肝虚血の前・中・後に経時的にE1,胆汁流量,肝ATP(HPLC法)を測定した。虚血時間15(n=2),30(n=2),60(n=6),120(n=4)分の4群とした。1KHzにおける抵抗率(ρ ,単位 $\Omega \cdot \text{cm}$)は,虚血後上昇し,平均 35.0 ± 5.9 分で最高値(ρ_m)に達し,その後は減少した。肝ATPと ρ の虚血前値との比(%ATP,% ρ)は虚血後20分, ρ_m に達した時の両者には有意な負の相関を認めた。胆汁流量の再灌流後の回復率は各群 98.2 ± 6.2 , 90.6 ± 0.5 , 23.9 ± 15.6 , $7.0 \pm 4.2\%$ であった。再灌流直前値 ρ_r と ρ_m の比(ρ_r/ρ_m)と胆汁流量の回復率は15,30,60分の各群では有意な正の相関があった。組織学的には虚血30分では変化はないが,60分では構造破壊がみられた。以上の結果より,EIは虚血肝の viability を経時的に示す指標となる可能性が示唆された。

Key words: liver, viability, electrical impedance, normothermic ischemia, bile flow

1. はじめに

肝切除術において,出血量の減少をはかり,手術時間の短縮をはかる目的で肝門部血行遮断による肝虚血手技が用いられている¹⁾。その虚血中に経時的にかつ簡便に肝の viability を評価することが出来れば有用である。そこで本研究では肝の誘電体としての性質に着目し,電気抵抗率(resistivity;以下 ρ)の変化から,肝の viability の経時的評価が可能か否かを検討した。

2. 方 法

①材料および方法

5週齢のWistar系雄性ラットを用い,Meredithら²⁾の方法に準じ以下のごときモデルを用いた。エーテル麻酔下に左肋弓下切開にて開腹し,胃脾間膜を切開し,脾臓を有茎で腹腔外に取り出した。その後,脾臓被膜を剥離し脾実質を露出させ,肋骨部皮下に脾臓を移植し,皮膚を縫合した。このようなモデルでは術後約4週間まで門脈系と体静脈系にシャントが形成され腸管嚢血を来たすことなく肝門部で全肝虚血の実験が可能となると報告されている³⁾。

②電気インピーダンスの計測方法

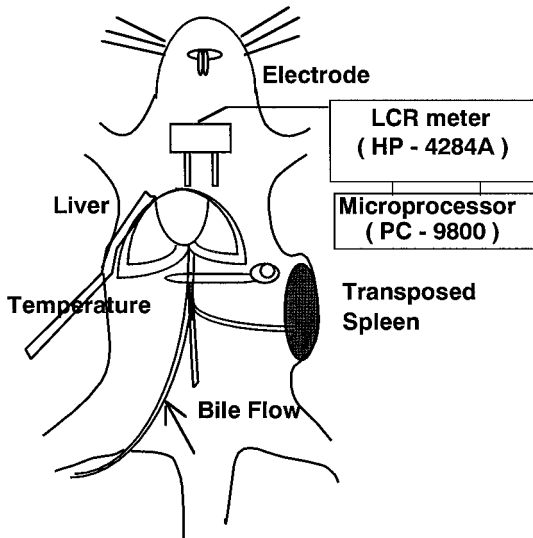
上記のごとき処置を行った脾臓皮下固着ラットを用い,Pentobarbital 30mg/kgの腹腔内投与により麻酔し,全肝虚血は,門脈および肝動脈を血管用クリップにより遮断することで行った。また,虚血開始5分前にヘパリン500IU/kgを静脈内投与し,その後5%グルコース加生理食塩水を15分ごとに2ml/kgを静脈内投与した。なお,実験中ラット体温を 37 ± 0.5 とほぼ一定に保った。虚血時間を15分,30分,60分,120分とし,虚血再灌流を行った。それぞれ15分群(n=2),30分群(n=2),60分群(n=6),120分群(n=5)の4群に分けた。

プラチナ性平行2針電極(針の半径0.0225mm,針の間隔6mm,刺入部針の長さ9mm)を使用し,LCRメータ(YHP社製,HP4284A)を用いて,コンダクタンス(G)を計測した。その測定結果より,抵抗率 ρ (以下, $\Omega \cdot \text{cm}$ と略記)を $\rho = \pi t / G (\ln(r-a/a))$ の計算式により求めた。なおここでtは針の長さ,rは2針間の距離,aは針の半径とした。測定周波数は1回ごとに20Hzから1MHzまでの39周波数とした。

上記の方法により虚血前,虚血中5分ごと,再灌流後5分から10分ごとに測定した。電極の刺入部位は肝

Fig. 1 Schema of the experiment

Wistar rats, which had received a portal bypass by the subcutaneously transposed spleen, were used. Conductance was measured with an LCR meter. The electrode was stung to the liver. Hepatic ischemia was caused by clamping the hepatic artery and portal vein.



の中間葉とした (Fig. 1).

③ 肝内 ATP 含有量の測定

虚血前, 虚血後10分ごとに微量の肝臓組織片を凍結採取し, 凍結乾燥した後, 高速液体クロマトグラフィ (high pressure liquid chromatography: 以下, HPLC, TOSO社製) を使用して adenosine triphosphate (ATP) 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, pH6) を使用した.

④ 胆汁流量の測定

千賀ら⁴⁾の方法にならない総胆管に留置針を挿入し, それにあらかじめ目盛りを付けた外径1.9mmのポリエチレンチューブを接続し, チューブ内を流れる5分間の胆汁流量を平均することにより算出した. 虚血前の5分間の胆汁流量を100とした時の再灌流後の胆汁流量を回復率で表した.

⑤ 肝組織学的検討

60分群の4肝において虚血前, 虚血後30分, 60分, 再灌流後60分に組織を採取し, 10%ホルマリンで固定し, Hematoxylin Eosin 染色にて組織標本を作成した.

統計学的処理

結果は平均値 ± 標準偏差で示し有意差検定には Stu-

Fig. 2 The relationship between resistivity and frequency

The curve shifted upward after ischemia. After reperfusion the curve shifted downward near the preischemic base curve.

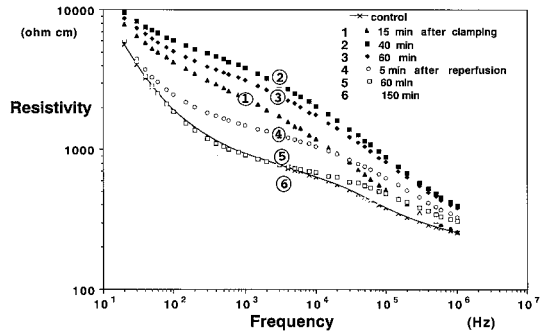
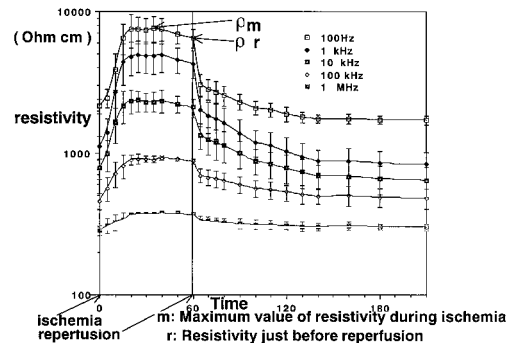


Fig. 3 The change in average resistivity

The resistivity value rose rapidly until 20 minute ischemia. After 20 minutes ischemia it rose slowly to maximum value. After the peak, the resistivity value decreased down to the point of reperfusion. The number of 60 minutes ischemia was six. The value was expressed as mean + / - SD.



dent's t-test を用い, 危険率0.05以下を有意差ありとした.

3. 結 果

60分群の虚血再灌流時の抵抗率 ρ の周波数特性の1例を示す (Fig. 2). 虚血後15分から40分までは曲線は上方に移動し, 虚血後60分, 再灌流後5分, 60分, 150分では, 曲線は下方へ移動した. 再灌流後約60分で虚血前の曲線に近づいた. さらに再灌流後150分では虚血前の曲線より下方に移動した.

60分虚血群 (n=6) を100Hz, 1kHz, 10kHz, 100kHz, 1MHzの周波数で抵抗率 ρ の経時的变化を示す (Fig. 3). 虚血後各周波数とも15から20分の抵抗率 ρ は急激

Fig. 4 The change in average resistivity at 1kHz in each ischemic group
The number of 15, 30, 60, and 120 minutes ischemia was two, two, six, and five, respectively. The value was expressed as mean +/- SD.

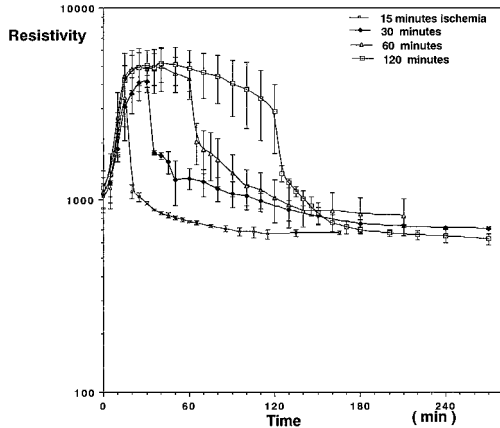
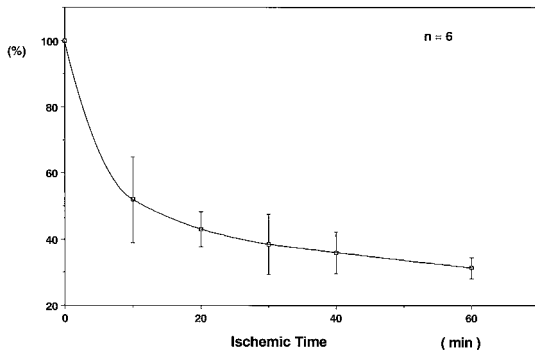


Fig. 5 The change of the ATP levels in tissue of the liver during 60 minutes ischemia
The ATP levels in the liver decreased gradually during ischemia.



に増加した。その後、緩徐に上昇し続け、虚血後25～40分で最高値に達し、その後は緩徐に減少し続けた。再灌流後5分間は急激に減少し、その後は緩徐に減少し続けた。

次に各群の1kHzでの抵抗率 ρ の経時的变化を示す (Fig. 4)。 ρ の虚血前値は $1,038 \pm 97.6$ であった。虚血中の ρ の最高値を ρ_m とする。 ρ_m に達する時間は60分群、120分群の2群を合わせると虚血後25分2肝、30分1肝、35分3肝、40分5肝であった。すなわち、虚血後25～40分の間で ρ_m に達しその平均は虚血後 35 ± 5.9 分であった。

Fig. 6 The relationship between % ATP and % resistivity at 20 minutes ischemia and the time of ρ_m
% ATP : the value of ATP after ischemia/the value of ATP before ischemia. % resistivity : the value of resistivity after ischemia/the value of resistivity before ischemia.

ρ has significant inverse correlations with ATP in the early ischemic period.

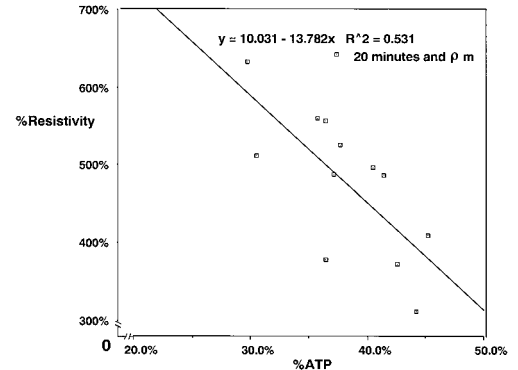
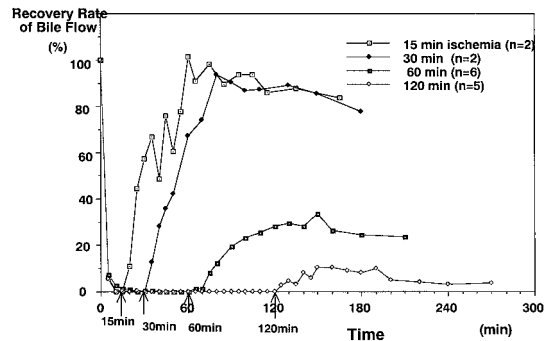


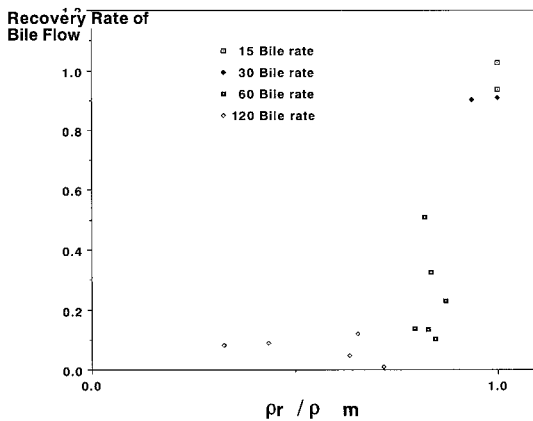
Fig. 7 Average recovery rate of bile flow
The bile flow rate was less than 1% of baseline during ischemia. After reperfusion bile started to reflow. The longer ischemic time was, the lower recovery rate of bile flow after reperfusion was.



ρ 測定中の60分群の肝組織 ATP の変化を示す (Fig. 5)。虚血前値との比を % ATP とすると、% ATP は虚血開始後10分には $43.5 \pm 3.4\%$ 、20分には $40.5 \pm 2.9\%$ 、40分には $34.5 \pm 5.5\%$ 、60分には $29.9 \pm 3.5\%$ と減少した。なお60分群の ρ_m に達した時点までの時間は 34.2 ± 7.4 分 (25～40分) で、 ρ は $5,171 \pm 1,132$ であった。

虚血後に減少する ATP と虚血後に増加する ρ との関係は、 ρ の虚血前値との比を % ρ とした時、虚血後20分および ρ_m に達した時点の % ρ と % ATP の間には

Fig. 8 The relationship between pr/pm and recovery rate of bile flow (15, 30, 60 and 120 minutes ischemia)



有意 ($p < 0.05$) な負の相関があった (Fig. 6). 60分群の虚血中の最高値 pm は 34.2 ± 7.4 分であった. その時の $\%p$ は $500 \pm 94.4\%$ であった.

胆汁流量の平均回復率を示す (Fig. 7). 再灌流後60分の値は15分群 $98.2 \pm 6.2\%$, 30分群 $90.6 \pm 0.5\%$, 60分群 $23.9 \pm 15.6\%$, 120分群 $6.96 \pm 4.2\%$ と虚血時間が長くなるに従い胆汁流量の回復率は減少した. なお60分群で胆汁流量の回復率が30%以上であったのは2例 (33%) であった.

再灌流直前値を pr とした時, 胆汁流量の回復率と虚血中の pr/pm を示す (Fig. 8). 120分群では胆汁流量の回復率が極めて不良であり, 120分に達する前に虚血による不可逆性変化が完成してしまっていると考え, これを除く可逆性変化の過程にあると推測される15分群, 30分群, 60分群のみを見ると両者の間には有意 ($p < 0.05$) な正の相関を示した (Fig. 9).

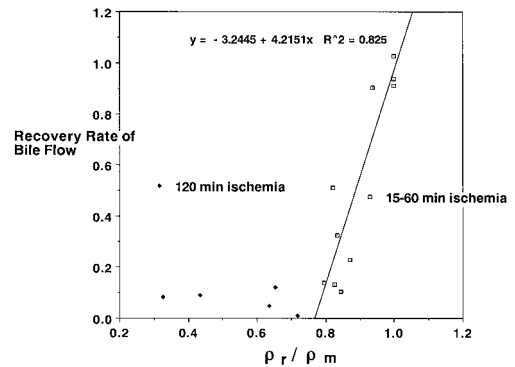
肝の組織学的変化の光顕像を示す. 虚血前に比べて虚血後30分では肝細胞が腫大し, 肝細胞胞体中に空胞が出現し始めている. 類洞の狭小化も認められた (Fig. 10a, b). 虚血後60分では類洞の狭小化が, 虚血後30分より進行し胞体内の空胞の増加がみられ核の淡染も見られるようになった. また肝小葉構造の不鮮明化もみられる (Fig. 10c). 再灌流60分後では肝細胞の腫大が減少し, 類洞も虚血前の状態に近づき, 組織学的に回復を示した (Fig. 10d).

4. 考 察

肝切除術において, 出血量の減少および手術時間の短縮をはかる目的で, 肝門部血行遮断による肝虚血手

Fig. 9 The relationship between pr/pm and recovery rate of bile flow except 120 minutes ischemic group

A pr/pm has significant positive correlations with recovery rate of bile flow one hour after reperfusion.

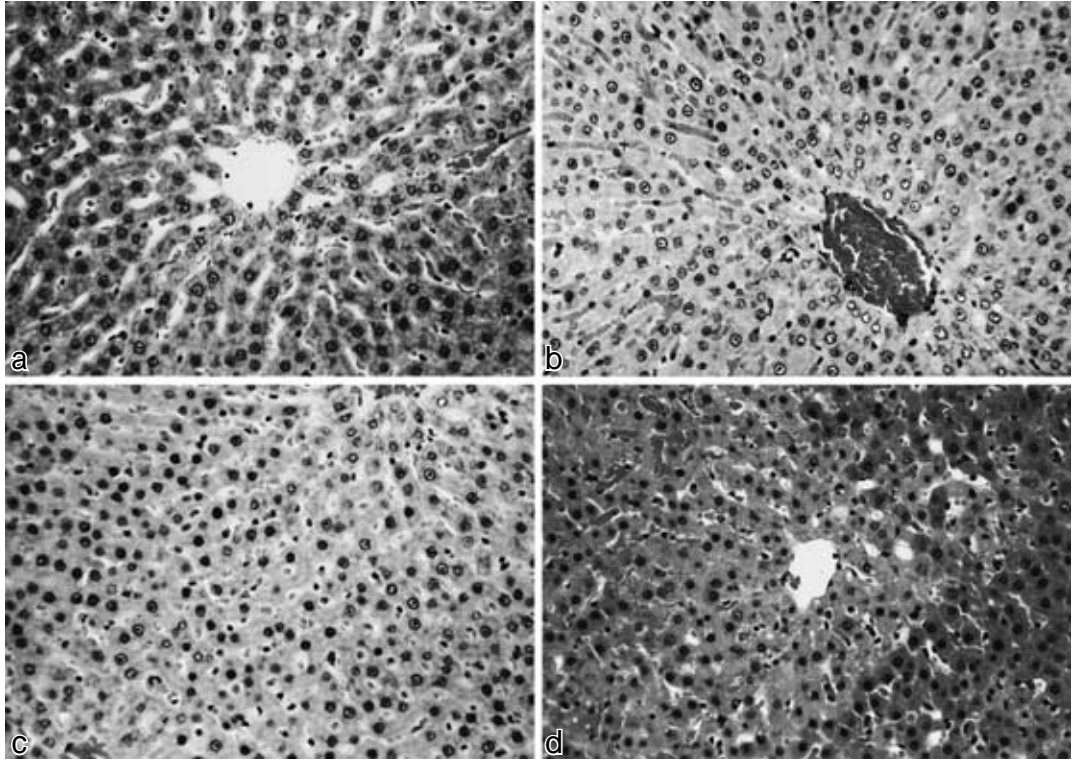


技 (Pringle 法) が用いられている¹⁾. しかし, 虚血時間が延長すると再灌流後の肝不全発症の危険性が増加する. そこで肝虚血中に肝の viability を経時的かつリアルタイムに評価することが可能であれば, 虚血再灌流後の肝不全発症を防止する上で有用である. そこで, ここでは肝組織中の ATP 量と再灌流後の胆汁流量の回復率とを指標にして, 肝虚血時における電気的特性 p ならびに pr/pm の変化とこれらの指標との相関を検討した.

肝臓における電気インピーダンスの測定は1900年の Galeotti⁴⁾ による報告に始まる. 最近では1967年に Geddes ら⁵⁾ が, それまでの文献をまとめて報告しているが, 周波数や種によりこの値が異なることを述べている. 金井⁶⁾ は, 一般に組織の抵抗率は組織の異方性および非線形性の影響を受け, 周波数依存性, 温度依存性があるとしている. 共著者の石川ら^{7,8)} はイヌの心臓の単純浸漬保存中の電気インピーダンスの変化と心筋 viability との相関を検討しているが, 保存温度の差, 保存液の差により電気インピーダンスが異なる事を報告している.

Schwan ら⁹⁾ は, 周波数1kHz において麻醉下常温のイヌ肝の抵抗率は $800 \sim 1,000 \Omega \cdot \text{cm}$ と報告している. 今回のラット肝を用いた結果は $1,038 \pm 97.6 \Omega \cdot \text{cm}$ であった. 臨床においては, 清水ら¹⁰⁾ は, ヒトの肝癌と正常肝の電気インピーダンスを測定している. 小西ら¹¹⁾ はセル内に肝組織片を置き, 細胞内・外抵抗, 細胞膜容量を測定している. しかし本研究のごとく in situ

Fig. 10 a : Microscopic findings of the liver at preischemic state (× 200)
 b : Microscopic findings of the liver at 30 minutes after ischemia (× 200) The hepatic cells swelled and then the sinusoid became narrow.
 c : Microscopic findings of the liver at 60 minutes after ischemia (× 200) The hepatic cells swelled more and the sinusoid became narrower than before.
 d : Microscopic findings of the liver at 60 minutes after reperfusion (× 200)
 The sinusoid recovered to preischemic state but the structure destroyed partially.



肝臓において虚血中に経時的に電気インピーダンスを測定し、肝の viability を推定しようとする報告はない。

また、本研究では60分虚血群の各周波数の抵抗率 ρ の経時変化により、1kHz の ρ の変動幅が最も大きいため、1kHz の ρ について検討した。

一方、常温虚血中に酵素法により測定した肝組織高エネルギー磷酸化合物特に ATP 残存量が虚血再灌流障害の程度や再灌流後の肝の viability とよく相関することが知られている¹²⁾。本研究では ATP を HPLC 法で測定した。ATP は37%、20分虚血後では虚血前の41%、その後到達する ρ_m の時点では $36 \pm 5.6\%$ が残存していた。

今回測定した%ATP と% ρ は20分での値と ρ_m との値をみると有意な負の相関を認めた。これは ρ_m に

達するまでは% ρ の増加にともない ATP が減少する事を示している。したがって、虚血後抵抗率の最高値 ρ_m に達するまでの ρ の変化は、もちろん ATP 以外の因子によるものも考えられるが、少なくともこのモデルにおいては ATP の減少と平行しておこる化学的、物理的变化の総和を表現している可能性が示唆された。この事実は Ishikawa ら⁸⁾の心筋において電気インピーダンスは心筋内 ATP と相関しさらにこれは移植後の心機能とも相関したという報告と矛盾しない。

組織学的検討では虚血後30分では肝細胞の腫大があり、類洞の狭小化が認められるものの、構造的には保たれていた。さらに虚血後60分では類洞の狭小化はさらに進行し、小葉の強い極度的変化が認められ、肝に不可逆性変化が生じていた。したがって、 ρ_m 以降の ρ の低下の原因の一つとして、肝の構造的破壊が関係し

ている可能性が示唆される。Baker¹³⁾はラットにおける常温虚血再灌流後の肝組織中壊死部の比率を報告しているが、30分虚血では12.7%であるのに対して45分虚血では53.5%と著しく壊死部の比率が増加することより、ラットの虚血耐容限界時間は30～45分としている。これは ρ_m 値に達するまでの平均時間が35分であったこととほぼ一致する。すなわち ρ_m を示す時点は電気的特性の変化が肝の不可逆性変化が起こり始める時点を表している可能性が示唆された。ただし ρ_m は25分から40分の間であったことは個体によりその虚血耐容性に差があることを示していると考えられる。

ρ_r は再灌流直前の抵抗率であり、 ρ_m からの時間経過による電気特性の変化の程度を表すと考えられ、したがって、 ρ_m との比、すなわち ρ_r/ρ_m は虚血肝に生じている種々の不可逆変化の程度を示している可能性がある。今回の結果では ρ_r/ρ_m は再灌流前後の胆汁流量の回復率と正の相関があった。Kamikeら¹⁴⁾は肝組織中のATP量と胆汁流量とは相関があると報告している。また、千賀ら³⁾は虚血再灌流後の胆汁流量の回復率が、再灌流後の生存率の指標になると報告している。これらの事実から、 ρ_m に達した以降は、 ρ_r/ρ_m により虚血中に虚血再灌流後の肝のviabilityを推測する指標となりうる可能性が示唆された。

千賀ら³⁾は我々と同じモデルを用いて常温下90分虚血後の生存率は30%と報告している。また、虚血再灌流後の胆汁流量の回復率30%が生死の臨界点であるとしている。今回は生存率を求めていないが、30分群では胆汁流量の回復率は90.6%と良好であったのに対して、60分群では胆汁流量が30%以上の回復率を示したのは33%にすぎない。したがって、我々の用いたモデルでは胆汁流量の回復率からみると虚血30～60分までの間の変化が大きく、また組織学的にみてもこの間に比較的大きな変化が生じていたと考えられる。このことから虚血中の30分から60分間の間で肝の部分的不可逆性変化が始まっており、大きく生存率に影響する変化が起こり始め、虚血60分では不可逆的变化が生じている可能性が示唆された。

ρ で示した電気的特性はあくまでも種々の変化の総和が表現されているものであり、今後さらに多くの因子の変化による電気特性への影響の分析が必要であろう。しかしながら、今回の結果から37の肝虚血において虚血後25分から40分の間すなわち平均35分に、 ρ の最高値 ρ_m に達し、この ρ_m はその時点における肝用ATPと相関した。また虚血後30分の肝の組織学的

変化は軽度であった。一方、再灌流後の胆汁流量は虚血60分までは ρ_r/ρ_m と相関した。したがって、電気インピーダンスの測定により、虚血後30分までは ρ_m で、虚血後30分から60分までは ρ_r/ρ_m で肝のviabilityがリアルタイムに判定できる可能性が示唆された。今後は ρ_r/ρ_m の指標化により電気インピーダンスを用い、手術時のリアルタイムの肝viabilityの評価を行えるよう臨床応用される可能性が示唆された。

本研究の要旨は第28回日本移植学会総会、第41回日本消化器外科学会総会、第94回日本外科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Pringle JH : Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 48 : 541-549, 1908
- 2) Meredith CG, Duffield PH, Dougan DFH et al : The concentration in brain of octopamine and tyramine after portal-systemic bypass in rats. *Life Sci* 38 : 1701-1705, 1986
- 3) 千賀省始, 伊藤英夫, 林昌俊ほか : ラット肝虚血障害時の胆汁流量の回復率と生存率の関係に関する実験的検討。移植 29 : 6-12, 1994
- 4) Galeotti G : Über die elektrische Leitfähigkeit der tierischen Gewebe. *Z Biol* 63 : 289-340, 1900
- 5) Geddes LA, Baker LE : The specific resistance of biological material-A compendium of data for the biomedical engineer and physiologist. *Med Biol Eng Comput* 5 : 271-293, 1967
- 6) 金井 寛 : 生体物性(2) 電気特性。医用電子と生体工学 13 : 307-315, 1975
- 7) 石川 真, 廣瀬 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検討。移植 29 : 127-136, 1994
- 8) Ishikawa M, Hirose H, Sasaki E et al : Detection of myocardial injury during simple cold storage by measurement of myocardial electrical impedance. *J Cardiovasc Surg* 37 : 261-267, 1996
- 9) Schwann HP, Kay CF : Specific resistance of body tissue. *Circulation Res* 4 : 664-670, 1956
- 10) 清水 淳, 桜林 忍, 杉浦 玄ほか : 肝癌における肝比抵抗値(肝組織インピーダンス)測定。Gastroenterol Endosc 28 : 1519-1527, 1986
- 11) 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
- 12) 平良健康 : 肝虚血の耐容性と機能維持に関する実験的検討。日外会誌 81 : 427-440, 1980
- 13) Baker HC : Ischaemic necrosis in the rat liver. *J Pathol Bacteriol* 71 : 135-143, 1956
- 14) Kamiike W, Nakahara M, Nakao K et al : Correlation between cellular ATP level and excretion in the rat liver. *Transplantation* 39 : 50-55, 1985

Dielectric Properties for Instantaneous Evaluation of Ischemic
Injury of the Liver in the Rats in Normothermia

Hideo Itoh, Hajime Hirose, Eisaku Sasaki, Makoto Ishikawa, Yoshifumi Katagiri,
Hirokazu Matsutomo, Masatoshi Hayashi, Shoushi Senga,
Masatomo Hayashi and Atsuyoshi Onitsuka
First Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

The purpose of this study was to evaluate ischemic injury of the liver by Pringle method during hepatectomy. Electrical impedance was used for instantaneous evaluation of the normothermic ischemic injury of the liver in Wistar rats, which had received a portal bypass by the subcutaneously transposed spleen. Four ischemic groups (15, 30, 60, and 120 minutes) were studied and then received a reperfusion. Conductance was measured with an LCR meter and then resistivity was calculated. Bile flow during experiments was measured. The preischemic value of ρ at 1kHz was $1,038 \pm 98$ (mean \pm SD) ohm \cdot cm. In the early phase of ischemia ρ increased and reached a peak (ρ_m) After the peak, ρ decreased to the point of reperfusion (ρ_r) The time from initiation of the ischemia to ρ_m was 35 ± 5.9 minutes. Adenosine triphosphate(ATP)in the liver was measured by high performance liquid chromatography. The ATP level in the liver decreased with ischemic time, $40.5 \pm 2.9\%$ at 20 minutes and $36 \pm 5.6\%$ at the time of ρ_m . Microscopically, the ischemic damage of the liver was little up to 30 minutes and severe at 60 minutes of ischemia. Recovery of the bile flow one hour after reperfusion in each group was 98.2 ± 6.2 , 90.6 ± 0.5 , 23.9 ± 15.6 , and $6.96 \pm 4.2\%$. ρ has significant inverse correlations with ATP in the early ischemic period to ρ_m and then a ρ_r/ρ_m has positive correlation with recovery of the bile flow one hour after reperfusion. These results suggests that electrical impedance is one of the indices for viability of ischemic injury of the liver in rats.

Reprint requests : Hideo Itoh First Department of Surgery, Gifu Univ. School of Medicine
40, Tsukasa-machi, Gifu 500 8705 Japan
