誘電特性を用いた腸管の viability判定に関する実験的検討

誘電特性を用いた腸管のviability判定に関する実験的検討

松尾　浩

岐阜大学医学部臓器病態学講座高度先進外科学分野
（主任　広瀬　一教授）

Experimental Studies to Estimate the Intestinal Viability Using Dielectric Parameter

Hiroshi MATSUO

Department of Advanced Surgery, Division of Organ Pathobiology, Gifu University School of Medicine

（Director : Prof. H.HIROSE）

Background: This study aimed at establishment of evaluation of intestinal viability before release of the strangulated intestine by measuring electrical properties.

Methods: In the rats, the 20 cm segment of the distal ileum and mesentery with the blood vessels were strangulated with compression device consisting of an acrylic ring and a balloon. The intestine was strangulated for 0, 2, 15, 45, 90, and 120 minutes. The conductance and capacitance obtained by impedance analyzer were used to calculate %tan δ m in the strangulated intestine. ATP was measured as well. In another experiment, after the various periods of strangulation, %tan δ m was measured just before release of the strangulation. Rats were divided into Group A (survived for 7 days) and Group D (died within 6 days).

Results: There was a positive correlation between %tan δ m and ATP levels ($R=0.80$). Additionally, %tan δ m was significantly more in Group A than in Group D ($p<0.05$). There was no death at 80 % or more in %tan δ m, and was no survival at less than 74 % in %tan δ m except for two rats.

Conclusions: These results suggested that %tan δ m may be a useful index of the viability of the strangulated intestine before reperfusion.

Acta Sch Med Univ Gifu 51：61－66（2003）
Key words : intestinal viability, dielectric properties, ATP, strangulated ileus, ischemia

緒　　言

臨床において絞扼性イレウスが原因で，虚血に陥った小腸のviabilityが保たれているか否かを手術中に簡便に判定することは難しい。絞扼により虚血に陥った腸管の状態によっては，術後のcomplicationを回避し，消化吸収を保持するために腸管の温存が必要であっても，広範囲の腸切除が必要となる事がある。そのような場合，手術中に腸管切除の可否判断をするために虚血腸管のviabilityを評価することは重要であり，様々な客観的な検査[1)~6)]による評価が試みられている。しかし，一般にはこれらの評価法はあまり用いられることはなく，虚血解除後に術者の経験的な判断で腸切除が施行されている。

一方生体試料の誘電特性は組織構造や化学的組成を反映し，簡便にかつリアルタイムに測定可能であると報告されている[7)~14)]。もし組織の誘電特性の測定によって虚血に陥った小腸の状態を評価できれば，腸管ダメージの効果的な診断方法になり得ると考えられる。今回我々はラット虚血腸管の誘電特性を経時的に測定することによって，小腸のviability評価が可能か否かを検討したので報告する。

材 料 と 方 法

Wistar rat（clean：280～350 g）を用い，実験前24時間絶食とし，飲水は自由に可能とした。エーテル麻酔で導入し，ペントバルビタール25 mg/kgを筋注後，尾静脈に静脈路を確保した。同部よりペントバルビタール5.0～12.5 mg/kg/hで，乳酸リンゲル液10 ml/kg/hで輸液す

2003年1月7日受理

ることによって麻酔を維持した[15)16)]。腹部正中切開で開腹し，回腸末端より約20cmの回腸を，腸間膜の血管と共に内径9mm幅7mmのアクリル製のリングを用い，バルーンをinflate（内圧200mm Hg）してFig. 1, 2の如く絞扼した。一定時間後バルーンをdeflateして絞扼を解除した。解除後，腸循環は末梢血管の拍動および腸管の色調変化にて確認した。実験中腹腔内温度は36.5±0.5℃，虚血部位の腸管の温度は35.5±0.5℃に保った。腸管の表面温度は熱電対（ユニークメディカル社digital thermometer PTC-201）を用いて測定した。

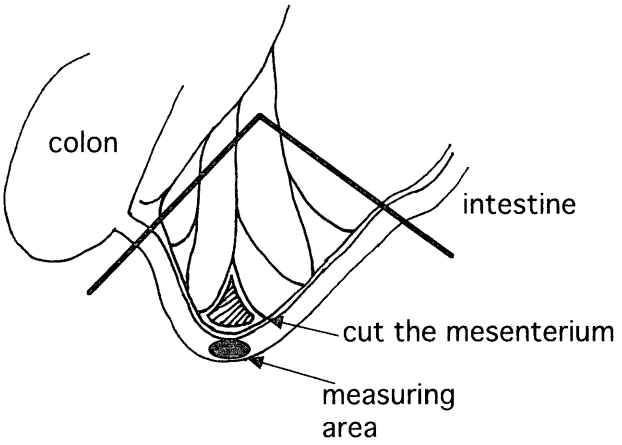

Fig. 1　The 20cm segment of the distal ileum was strangulated.

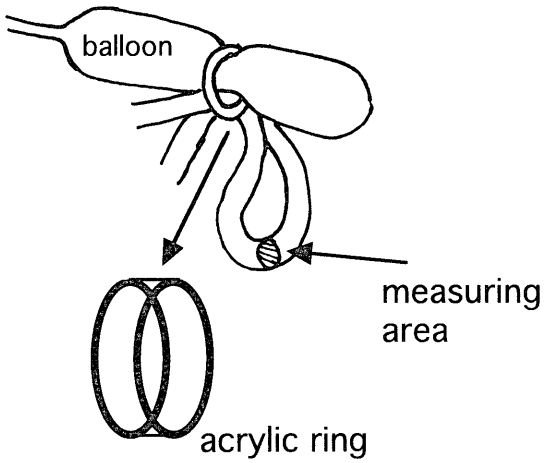

Fig. 2　Ileum and mesentery with the blood vessels were strangulated with compression device consisting of an acrylic ring and a balloon.

小腸組織ATP含有量の測定

腸管を絞扼し一定の時間経過後，小腸の試料を液体窒素にて凍結し，腸間膜の脂肪組織を取り除いた後，24時間凍結乾燥した。試料は乾燥重量を測定後，0.5N過塩素酸を加えホモジネートした。3000 rpm, 15分の遠心分離後上清を塩酸，水酸化カリウム水溶液を用いて中和し，更に12,000 rpm，3分の遠心分離を施行した[17)]。HPLC（Tosoh社製）を用いて単位乾燥重量あたりのATP含有量（μmol/gdw）を測定した。カラムはODS-80TM（Tosoh社製），緩衝液は燐酸緩衝液（0.5M，pH6.0）を使用した。

誘電特性の測定

小腸の誘電特性の測定は同軸平面電極を用いた2電極法で行った[18)]。腸管膜を切開後，Fig. 3の如く同軸平面電極を12gの圧力で小腸に固定した。小腸を腹腔内に戻し，電極部分を除いて閉腹した。インピーダンスアナライザー（Yokogawa-Hewlett-packard, Model 4194A）を用い10 kHz～100 MHzの42周波数におけるコンダクタンス（G）とキャパシタンス（C）を測定した。得られたGおよびCからtanδを算出し[19)]，10 MHz～100 MHzのピーク値をtanδmとした。虚血前のtanδmの値を100%とし虚血による変化を%tanδmとして評価した。

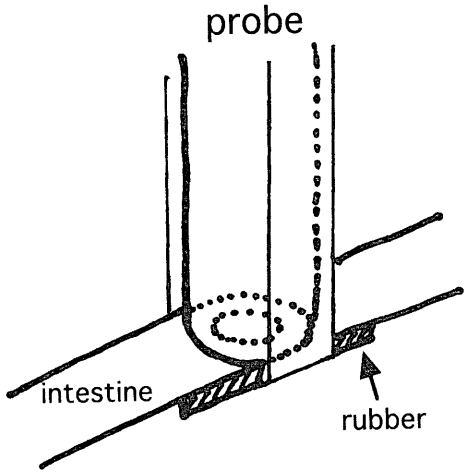

Fig. 3　The coaxial probe was placed on the small intestine and fixed.

実験1

小腸の%tanδmを虚血群IS（n＝7）と虚血を加えないコントロール群C（n＝6）を用いて経時的に検討した。

実験2

虚血前（IS 0群），虚血後2分（IS 2群），15分（IS15群），45分（IS45群），90分（IS90群），120分（IS120群）の各群（n＝6）において虚血終了時の%tanδmを測定した。同時に採取した組織から小腸組織ATP含有量（μmol/gdw）を測定し，虚血中の両者を比較検討した。

実験3

虚血後%tanδmが様々な値（91.2%～64.2%,）に低下した時点で虚血を解除し閉腹した（絞扼時間は10～100分）（n＝29）。術後飲水，食餌は制限せず，7日間観察した。7日間生存したラットは犠死させ，生存群Group Aとし，一方7日未満に死亡したラットを死亡群Group Dとした。Group Aは犠死時，Group Dは死亡後直ちに開腹し腸管の標本を採取した。標本は固定後H.E. 染色し，虚血再灌流障害の程度をParkら[20)]の方法を用いて評価した（Grade 0 ; Normal mucosa, Grade 1 : Subepithelial space at villus tip, Grade 2 : More extended subepithelial space, Grade 3 : Epithelial lifting along villus sides, Grade 4 : Denuded villi, Grade 5 : Loss of villus tissue, Grade 6 : Crypt layer infarction, Grade 7 : Transmucosal infarction, Grade 8 : Transmural infarction）。

また%tanδmが80%以上の症例をH群，80%＞%tanδm≧74%の症例をM群，74%未満の症例をL群とした。

なお，上記の実験およびラットの取り扱いは岐阜大学動物実験指針および関連規定に従って行った。

統計学的検討

測定値は平均±標準偏差で表記し，実験2では回帰分析，実験3ではMann-Whitney's U testを用いて比較検討した。P<0.05を統計学的有意差とした。

結　　果

実験1

Fig. 4に%tanδmの虚血前，虚血中の変化を経時的に示した。IS群は2分，15分，45分，90分，120分でそれぞれ92.04±4.11，87.04±3.32，77.20±4.24，72.50±4.22，71.81±4.24であり，虚血後45分までは比較的速く低下し，45分以降特に90分以降は非常に緩やかに低下した。C群は2分，15分，45分，90分，120分でそれぞれ100.00±0.27，100.13±0.47，100.00±1.43，100.35±1.55，100.68±1.49であった。

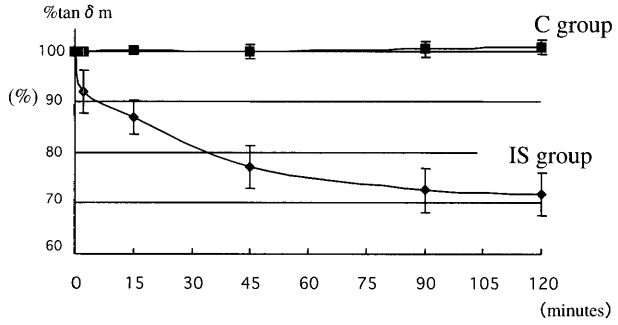

Fig. 4　Changes of %tanδm. : %tanδm decreased after establishment of strangulation for 45 minutes, thereafter it kept decrease relatively mild up to 120 minutes.

実験2

Fig. 5に各群の小腸ATP組織含有量を示した。虚血前，虚血2分，15分，45分，90分，120分においてATP含有量はそれぞれ10.4±1.2，6.6±0.6，4.1±0.2，3.4±0.5，3.1±0.4，3.5±0.5（μmol/gdw）で虚血後急速に低下し，その後非常に緩やかに低下しプラトーになった。

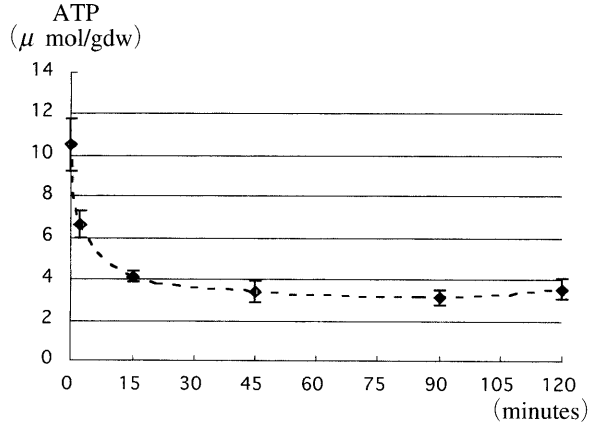

Fig. 5　Levels of ATP in the rat small intestine after strangulation. : The intestinal ATP levels decreased rapidly from the start of strangulation till 15 minutes.

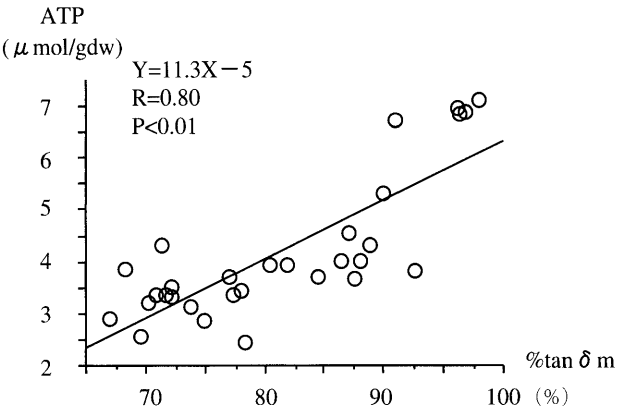

Fig. 6　Correlations of %tanδm with ATP levels. : There was a positive correlation between %tanδm and ATP levels during ischemia. (P<0.01, R=0.80).

虚血後の%tanδmと組織ATP含有量の関係はFig. 6の如く正の相関関係（P<0.01，R=0.80）を認めた。

実験3

Group D（n=14）では術後1日目に3匹，2日目に8匹，3日目に1匹，4日目に2匹がそれぞれ死亡した（平均2.1日）。死後の虚血部腸管組織学的検査では全例Grade 7または8であった。一方7日間生存したGroup A（n=15）の虚血部腸管は全例Grade 0であった。再灌流直前の%tanδmはGroup Aで有意に高値（P<0.05）であった（Fig. 7）。特に%tanδmが80%以上の症例（H群，n=5）は全例生存し（5／5），74%未満の症例（L

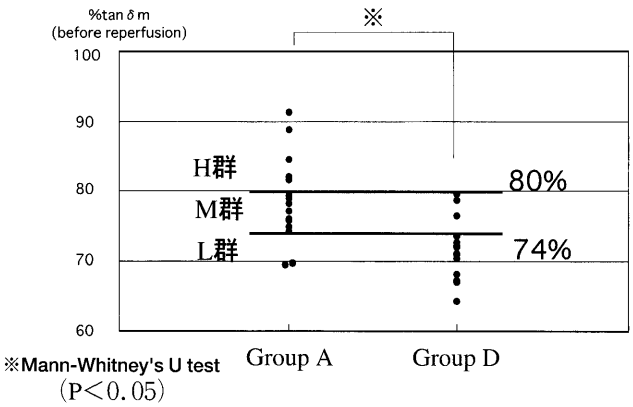

Fig. 7　Relationship between 7 days survival group and %tanδm. : The %tanδm just before reperfusion in group A was significantly higher than that in group D (P<0.05).

Table 1　Relationship between %tanδm and survival for 7 days. : There was no death in group H, while no survival in group L except for two rats.

	H群	M群	L群
survival rate	100%	72%	15%
Group A	5	8	2
Group D	0	3	11

群，n＝13），は2匹をのぞいて全例死亡した（2／13）。74％以上80％未満の症例（M群，n＝11）は8匹が生存した（8／11）（Table. 1）。

また，虚血時間と再灌流直前の％tanδmの関係を表したFig. 8の如く虚血時間60分を越えた症例は全例死亡した。

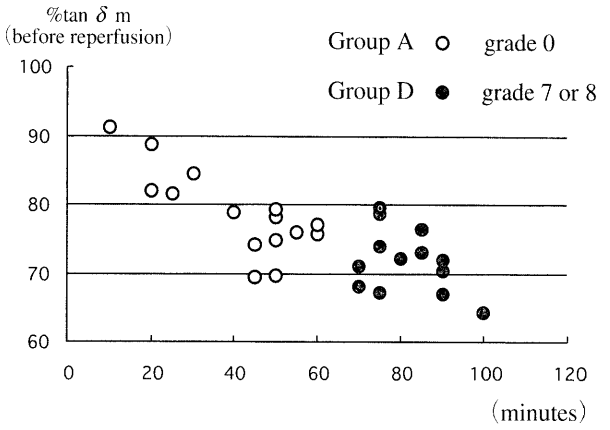

Fig. 8　Relationship between ischemic periods and %tanδm just before reperfusion. : All the rats strangulated over 60 minutes died within 4 days.

考　　察

虚血に陥った小腸のviabilityを簡便に評価するため，一般には虚血解除後の腸管の肉眼的色調や辺縁動脈の拍動の有無，腸管断端の出血の有無等が検討されている。しかしそれらの評価は客観的でなく信頼性に欠ける[21]。

虚血の解除後に小腸のviabilityを評価するためには水素ガスクリアランス[1]，組織酸素分圧測定[2]，組織pH測定[3]，fluorescein注入[4]，ドップラー法，レーザードップラー法[5][6]などの検査法も報告されている。しかしそれらは侵襲，客観性の欠如，正確な評価が困難な事などから一般に普及するには至っていない。また腸管に対するダメージは虚血中のみならず再灌流後にも起こることが知られている[22]~[24]ため，再灌流後に腸管のviabilityを評価する方が信頼性が高いと考えられる。しかし虚血に陥った腸管を再灌流すれば遠隔臓器障害を起こすことが知られており[25][26]，再灌流前にそのviabilityが予測できれば腸管の切除によって遠隔臓器障害を回避する事が可能となる。

一方虚血の解除前に腸管のviabilityを評価する方法として組織診，細胞診が考えられる。組織診は虚血再灌流障害の評価によく用いられているが，ラットのSMA閉塞モデルにおいては虚血中の組織診によるviabilityの評価は適切でないと報告されている[15]。また組織診，細胞診もその評価には数十分を要し，臨床上再灌流前のviability検査としては不適切であると思われる[24]。そこで再灌流前に腸管のviabilityを迅速に評価する方法が確立されれば，臨床上非常に有用である。今回我々は誘電特性を用いた虚血腸管のviabilityの評価が可能か否かを検討するため，虚血前と虚血後の誘電特性の変化に着目して評価を試みた。

誘電特性の測定は簡便で，迅速，非侵襲的である。1950年頃より，臨床において肺水腫[27]，腫瘍[28]，心拍出量[29]を誘電特性を用いて評価する報告が散見される。生体が交流電流にさらされると分散現象を生じ，そのうちのβ分散はMaxwell-Wagner効果といわれる細胞膜や核膜，ミトコンドリア膜と細胞外液との界面分極よりなり，それぞれの組織によって特異的である[7][8]。β分散の程度はtanδによって評価可能であり[19]，ラットの正常肝においてβ分散は1M～10MHz周辺に出現するとされている[11][19]。今回のラット小腸においてβ分散は10MHz周辺に出現した。我々はこれまで誘電特性の測定とtanδmを用いて心移植時の心筋のviability[13]，虚血中および再灌流時の肝機能評価[14]，肝移植後の機能評価[11]を報告してきた。

実験1では温虚血時％tanδmはATP含有量と同様，虚血後比較的急速に減少し，その後45分以降は緩やかに減少した。

組織ATP含有量は移植後や保存中の腎[30]，心[31]，肝[32]などの臓器のviabilityを反映するパラメーターであると報告されている。小腸においては移植時にATP含有量が腸管のviabilityを反映しているという報告や[33]，SMA閉塞モデルにおいてATP含有量が虚血前値の20％以下になるとviabilityが失われるという報告[15]があり，組織ATP含有量は小腸のviability評価に用いられている。実験2において，％tanδmは小腸組織ATP含有量と相関関係を認め，小腸のviabilityの指標となりうる可能性が示唆された。しかしATP含有量の測定には長時間を要するので，虚血腸管のviabilityの評価法としては不適切である。

そこでリアルタイムに測定可能な誘電特性を用いた評価法がviability判定に有用か否かを検討するため，実験3では％tanδmを測定し，その腸管のviabilityをラットの生存率と組織学的評価を傍証として検討した。小腸粘膜の細胞は粘膜最下層のcryptで分裂し，絨毛の先端方向に徐々に押し出され，最後はそこから剥離し腸管腔内にこぼれ落ちる。その粘膜細胞が分化し始めてから剥離するまでの時間は2～3日と報告されている[34][35]。そこで我々は7日間生存したラットを生存とみなし，その虚血腸管の粘膜が再生するのに十分な時間と判断した。Group Aのラットの虚血後の腸管は全例grade 0で虚血再灌流障害より回復したものと考えられた。％tanδmを用いて虚血腸管のviabilityを評価した結果，％tanδmが74％以上の症例は81％が生存し，粘膜が再生した。とりわけ％tanδmが80％以上の症例では生存率は100％であった。一方％tanδmが74％未満の症例は，その生存率は15％と著しく低下し，死亡したラットの腸管に壊死を認めた。これらから％tanδmを用いた評価法は虚血腸管のviabilityを反映し，特にこのモデルにおいては％tanδmが74％以上の腸管は回復の可能性が高く，74％未

満の腸管は回復の可能性が低いと考えられた。

今回の実験では虚血時間が60分を越えた症例は全例死亡し，腸管の viability に関して虚血時間が最も重要な要因と考えられる。しかし，臨床においては絞扼性イレウス症例において虚血時間が正確に把握できる症例は稀であり，このような誘電特性を用いた指標が確立されれば有用である。

以上より%tanδm を用いた指標は腸管の viability を判断する一つの指標となる可能性が示唆された。

結　　語

絞扼により虚血に陥ったラットの小腸誘電特性を測定し，実験2では%tanδm と組織 ATP 含有量の関係，実験3では%tanδm とラットの生存率の関係を検討した結果次の結論を得た。

1）絞扼中の%tanδm と小腸組織 ATP 含有量の間には，有意な正の相関関係を認めた。

2）絞扼解除直前の%tanδm が74%以上の症例は81%が生存し，小腸粘膜が再生した。一方%tanδm が74%未満の症例は，生存率が15%と低下し，死亡したラットの腸管に壊死を認めた。

したがって，誘電特性の測定によって腸管の viability の予測ができる可能性が示唆された。

文　　献

1）Mackie DB, Chir M, Turner MD: The effect of vagotomy on jejunal and ileal blood flow. J Surg Res **11**, 356－363（1971）

2）DeNobile J, Guzzetta P, Patterson K: Pulse oximetry as a means of assessing bowel viability. J Surg Res **48**, 21－23（1990）

3）Myers MB, Cherry G, Gesser J: Relationship between surface pH and pCO_2 and the vascularity and viability of intestine. Surg Gynecol Obstet **134**, 787－789（1972）

4）Silverman DG, Hurford WE, Cooper HS, Robinson M, Brousseau DA: Quantification of Fluorescein distribution to strangulated rat ileum. J Surg Res **34**, 179－186（1983）

5）Cooperman M, Pace WG, Martin EW, Pflug B, Keith LM, Evans WE, Carey LC: Determination of viability of ischemic intestine by Doppler ultrasound. Surgery **83**, 705－710（1978）

6）Shephered AP, Riedel GL: Continuous measurement of intestinal mucosal blood flow by laser-Doppler velocimetry. Am J Physiol **242**, 668－672（1982）

7）Foster KR, Schwan HP: Dielectric properties of tissues and biological materials. Crit Rev Biomed Eng **17**, 25－104（1989）

8）Foster KR, Schwan HP: Dielectric properties of tissues. In C. Polk and E. Postow (Eds.), Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, 2 nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 25－102（1996）

9）Hayashi M, Hirose H, Sasaki E, Senga S, Murakawa S, Mori Y, Furusawa Y, Bando M: Evaluation of ischemic damage in the skeletal muscle with the use of electrical properties. J Surg Res **80**, 266－271（1998）

10）Miyauchi T, Hirose H. Sasaki E, Hayashi M, Mori Y, Murakawa S, Takagi H, Yasuda H, Kumada Y, Iwata H: Predictability of dielectric properties for ischemic injury of the skeletal muscle before reperfusion. J Surg Res **86**, 79－88（1999）

11）Yamada T, Hirose H, Mori Y, Sasaki E, Onitsuka A, Hayashi M, Senga S, Futamura N, Sakamoto K, Sago T, Yasumura M, Iwata H: An experimental estimation of the maximum period of liver preservation using dielectric parameters. Transplantation Proc **34**, 1098－1104（2002）

12）Ishikawa M, Hirose H, Sasaki E, Mori Y, Murakawa S, Fuwa S, Ito H: Detection of myocardial ischemic injury during simple cold storage by measurement of myocardial electrical impedance. J Cardiovasc Surg **37**, 261－267（1996）

13）Ishikawa M, Hirose H, Sasaki E, Bando M, Mori Y, Murakawa S: Evaluation of myocardial viability during cold storage with the use of electrical properties in broad frequencies. J Heart Lung Transplant **15**, 1005－1011（1996）

14）Sasaki E, Hirose H, Ito H, Bando M, Senga S: Dielectric spectrogram for instantaneous evaluation of ischemic injury of the liver. ASAIO **41**, 356－359（1995）

15）Sato A, Kuwabara Y, Sugiura M, Seo Y, Fujii Y: Intestinal energy metabolism during ischemia and reperfusion. J Surg Res **82**, 261－267（1999）

16）Blum H, Barlow C, Chance B, Summers JJ, Leigh JS, Buzby GP, Schnall BS: Acute intestinal ischemia studies by Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Ann. Surg. **204**, 83－88（1986）

17）Kamiike W, Watanabe F, Hashimoto T, Tagawa K, Ikeda Y, Nakao K, Kawashima Y: Change in cellular levels of ATP and its Catabolites in ischemic rat liver. J Biochem **91**, 1349－1356（1982）

18）Raicu V, Kitagawa N, Irimajiri A: Quantitative approach to the dielectric properties of the skin. Phys Med Biol **45**, 1－4（2000）

19）Surowiec A, Stuchiy SS: Use of the loss-tangent function in dielectric spectroscopy. Bioelectromagnetics **7**, 259－269（1986）

20）Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K: The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. Surgery **107**, 574－580（1990）

21）Thomas FG: The recovery of intestine after ischaemic injury. Br J Surg **67**, 699－702（1980）

22) Yamada T, Taguchi T, Suita S: Energy metabolism and tissue blood flow as parameters for the assessment of graft viability in rat small bowel transplantation. J Pediatr Surg **31**, 1475－1481（1996）
23) Boros M, Takaichi S, Hatanaka K: Ischemic time-dependent microvascular changes and reperfusion injury in the rat small intestine. J Surg Res **59**, 311－320（1995）
24) Taguchi T, Yamada T, Suita S, Ohta M: The significance of cytological examination on reperfusion in rat small intestinal transplantation. Virchows Arch **427**, 71－76（1995）
25) Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Bensard DD, Anderson BO, Banerjee A: Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. Arch Surg **127**, 175－179（1992）
26) Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI: Evidence for tumor necrosis factor-induced plumonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. Ann Surg **212**, 694－700（1990）
27) Okuda N, Ieda K, Horie K, Fujinami T, Fuse M: Diagnosis of pulmonary edema with thoracic electrical resistivity. Jpn J Med Electrobiol Eng（Jpa. Soc. ME&BE）**29**, 105－108（1991）
28) Mitsuyama N, Morimoto T, Kinouchi Y, Iritani T, Sumi T, Kimura S, Monden Y: In vivo measurement and evaluation of bioimpedance of breast tumors. Nippon Geka Gakkai Zassi（J Jpn Surg Soc）**89**, 251－255（1988）
29) Kubicek WG, Karnegis JN, Patterson RP, Witsoe DA, Mattson RH: Development and evaluation of an impedance cardiac output system. Aerospace Med **37**, 1208－1212（1966）
30) Bore PJ, Papatheofanis I, Sells RA: Adenosine triphosphate regeneration and function in the rat kidney following warm ischaemia. Transplantation **27**, 235－237（1979）
31) Nishioka K, Jarmakani J M: Effect of ischemia on mechanical function and high-energy phosphates in rabbit myocardium. Am J Physiol **242**, 1077－1083（1982）
32) Marubayasi S, Takenaka K, Dohi K, Ezaki H, Kawasaki T: Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. Transplantation **30**, 294－296（1980）
33) Hirata Y, Taguchi T, Suita S, Takeshige K: Adenine nucleotide metabolism in relation to graft viability in rat small-bowel transplantation. Eur Surg Res **26**, 309－317（1994）
34) Leblond CP: The time dimension in histology. Am J Anat **116**, 1－27（1963）
35) Sunshine P, Herbst JJ, Koldovsky O, Kretchmer N: Adaptation of the gastrointestinal tract to extrauterine life. Ann NY Acad Sci；**176**：16－29（1971）