

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 11 月 5 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592016

研究課題名(和文) 光による肝細胞機能の計測に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation of light scattering and absorption properties of in vivo rat liver using a single-reflectance-fiber probe during pre-ischemia and ischemia-reperfusion

研究代表者

山本 順司 (Yamamoto, Junji)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・教授)

研究者番号：40342654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：非侵襲性で高い透過性を有する可視～近赤外光を用いて、光の減衰、吸光度スペクトルを計測し、組織循環代謝情報を計測したり、近赤外分光での光の多重散乱を計測・分析したりすることで、細胞や細胞内小器官の形態に関する情報を得られるか、肝組織viabilityと経時的なスペクトルの変化を小動物肝虚血-再灌流モデルで観察・対比した。虚血下で拡散減衰係数 $ua(605)$ /吸収係数 $ua(620)$ の増加は、ミトコンドリアでのheme aa3の還元を示し、近赤外波長における拡散減衰係数の変化は細胞や細胞内構造の形態変化を表すと考えられた。拡散反射光スペクトル計測は生体肝組織の病態生理学的状態の評価に適応しうる。

研究成果の概要(英文)：To evaluate usefulness of diffuse reflectance spectroscopy for characterization of viability/microstructure of tissues, we evaluated us' (reduced scattering coefficient), ua (absorption coefficient), StO2 (tissue oxygen saturation), and the reduction of heme aa3 in CcO (cytochrome c oxidase) of in vivo liver tissue using a single-reflectance-fiber probe with two source-collector geometries. We performed in vivo recordings of diffuse reflectance spectra for exposed rat liver of the ischemia-reperfusion model. Significant increases in $ua(605)/ua(620)$ during ischemia indicate the reduction of heme aa3, representing a sign of mitochondrial energy failure. The change in us' at NIR wavelength region during ischemia might show morphological changes in the cellular and subcellular structures induced by the ischemia. The results of the present study indicate the potential application of the current DRS system to evaluating the pathophysiological conditions of in vivo liver tissue.

研究分野：肝臓外科

キーワード：虚血-再灌流 肝臓 光計測 拡散減衰係数 近赤外光 拡散減衰係数

1. 研究開始当初の背景

肝は生命維持に必要なさまざまな機能を有し、種々の病態(ウイルス感染、代謝異常、薬剤による肝炎、肝硬変や脂肪肝など)によりそれらが変化する。そのような病態で、肝機能は採取血液からの情報によって主に評価される。このような情報の問題点は肝以外の臓器や組織の影響を受けること、肝全体の機能評価しかできないことであり、臨床でしばしば要求される分肝機能を反映しない。一方、CTを始めとする画像検査の進歩により内部解剖や分肝容積を正確に非侵襲的に評価できるようになり、単一光子放射断層撮影(SPECT)や肝受容体シンチグラフィでは分肝機能の評価が可能であるが、手軽さと反復性、侵襲性に問題がある。

肝組織の一部を犠牲にすることで悪性腫瘍などを外科治療する際に、肝は予備能と再生能をもって、このような侵襲に対応するが、障害肝では術前の予測に反して致死的な機能不全(肝不全)に陥ることがある。術前に正確に肝機能の評価しても手術操作により残肝機能が変化するため、肝不全のリスクを100%予測することは不可能である。そのため安全性を重視するあまりの不十分な切除になってしまったり、予測に反して肝不全となったりする結果となる。

2. 研究の目的

手軽で低侵襲な肝機能検査法を新しく開発する。

3. 研究の方法

【原理】光源、2分岐ファイバー、反射光ファイバーとPC制御された2つの分光器からなる反射光ファイバースペクトルシステムを用いた(図1)。近赤外光をカバーするハロゲンランプ光を2分岐ファイバーの1本と反射光探索子の中心ファイバーを経由して試料に照射し、散乱された反射光を中心と周囲の6本のファイバーから集光する。中心ファイバーに集められた光は2分岐のもう片方のファイバーを経由して多チャンネル分光器に、6本の周辺ファイバーに集められた光は異なる多チャンネル分光器に分配される。10%イントラリピッド溶液を参照溶液とした。

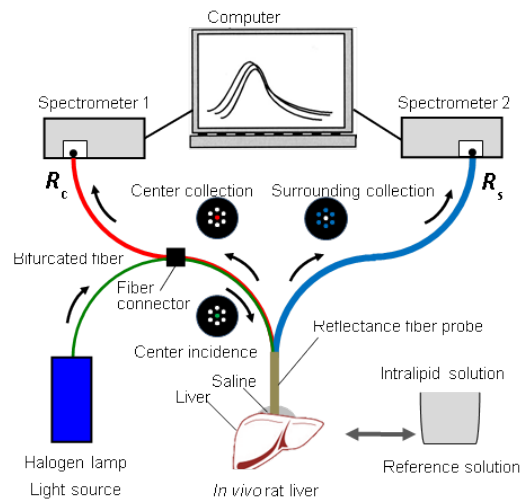


図1

500nm から 800nm の範囲の散乱反射スペクトル Rc と Rs は中心ファイバーと周辺ファイバーで集

められた光のスペクトル強度から参照溶液のスペクトル強度を基準として、それぞれ計算された。

Rc 値と Rs 値から吸収係数 μ_a と等価散乱係数 μ_s' を推計するためにモンテカルロ近似の結果から次の経験的公式を考案した。

$$\begin{bmatrix} \mu_s' \\ \mu_a \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_c & \alpha_s \\ \beta_c & \beta_s \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_c \\ A_s \end{bmatrix} \quad (1)$$

さらに正確度を向上させるために、 A_c and A_s の高次項を公式(1)に適用して、 $\mu_s'(\lambda)$ と $\mu_a(\lambda)$ の値を推計した。

次に、光吸収係数から $\mu_a(\lambda)$ 組織酸素飽和度を評価するために、以下の計算式を定義した。吸収係数スペクトルは、次のように酸化(HbO)および脱酸化ヘモグロビン(Hb)による吸収の和によって与えられる

$$\mu_a(\lambda) = C_{HbO} \times \varepsilon_{HbO}(\lambda) + C_{Hb} \times \varepsilon_{Hb}(\lambda) \quad (2)$$

(C=濃度、 $\varepsilon(\lambda)$ =消失係数スペクトル)ので、ヘモグロビン酸素飽和度 StO_2 は酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビン濃度から次のように定義される。

$$StO_2[\%] = \frac{C_{HbO}}{C_{HbO} + C_{Hb}} \times 100 \quad (3)$$

吸収係数スペクトル $\mu_a(\lambda)$ を反応変数、消失係数スペクトル $\varepsilon_{HbO}(\lambda)$ と $\varepsilon_{Hb}(\lambda)$ を予測変数とすると、多変量解析モデルは次のように公式(2)に当てはめられる。

$$\mu_a(\lambda_k) = a_{HbO} \times \varepsilon_{HbO}(\lambda_k) + a_{Hb} \times \varepsilon_{Hb}(\lambda_k) + a_0 + e(\lambda_k)$$

(a_{HbO} , a_{Hb} , a_0 は回帰係数; $e(\lambda_k)$ はエラー値、 λ_k は解析で処理された波長範囲における実測値)

a_{HbO} と a_{Hb} の回帰係数はそれぞれ、吸収係数スペクトル $\mu_a(\lambda)$ への $\varepsilon_{HbO}(\lambda)$ と $\varepsilon_{Hb}(\lambda)$ の配分を表しており、結果として C_{HbO} と C_{Hb} 濃度に密接に関連する。よって、酸素飽和度は回帰係数 a_{HbO} と a_{Hb} から次のように導かれる。

$$StO_2[\%] = \frac{a_{HbO}}{a_{HbO} + a_{Hb}} \times 100$$

また、チトクロム C 酸化酵素の heme aa3 中の酸化還元状態を計測するために吸収係数スペクトル $\mu_a(\lambda)$ を使用した。heme aa3 の等吸収点は約 620nm で、還元 heme aa3 と酸化 heme aa3 の吸収波長はこの波長で同じであるのに対して、還元 heme aa3 の吸収スペクトルは 605nm でピークを示す。605nm と 620nm での吸光度比率はミトコンドリアのエネルギー代謝を示す heme aa3 の酸化還元状態を評価するた

めに使用できる。よって本研究では、605nm と 620nm 波長で測定された吸光係数比率 ($\mu_a(605)/\mu_a(620)$) から heme aa3 の酸化還元状態を評価した。

【方法】雄 Wister 系ラットを気温 27 °C で昼夜 12 時間ずつの日内周期で摂食摂水を自由にさせて飼育した。-chloralose (50 mg/kg) と Urethane (600 mg/kg) を腹腔内投与による麻酔下に肝の 90% を虚血再灌流するラットモデルを使用した。肝虚血導入前に、基礎値として、肝組織の散乱反射スペクトルを記録した。肝十二指腸間膜(肝動脈、門脈、総胆管)を 30 分間クランプして、肝虚血を行った。60 分間の再灌流の後、100% 窒素を吸入させた。尾状葉は門脈血流路として保存した。反射光ファイバー探索子は肝表面に設置した。 $R_s(\lambda)$ と $R_r(\lambda)$ の計測は、500nm から 800nm 波長間で 30 秒間隔で 160 分間(酸素吸入 5 分、空気吸入 5 分、虚血 30 分、再灌流 60 分、窒素吸入 60 分)同時に行った。呼吸停止または安楽死を確定するために、ラットの呼吸は実験中、腹部外側領域の規則的運動を観察することで確認した。 $\mu_s'(\lambda)$ と $\mu_a(\lambda)$ は上述の過程をもとに推算した。データは平均 \pm 標準偏差で表記される。2 つの相の比較には Unpaired *t*-test を使用し、 $P < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

【結果と考察】虚血前(酸素吸入、空気吸入)、虚血、再灌流と窒素吸入の期間に特定の波長について 6 検体で平均した吸光係数 μ_a の時間経過から、波長 530 と 570 nm での μ_a の基準値は明らかに他の波長でより高かった。これはヘモグロビンの吸収スペクトルと一致した。虚血導入後の μ_a の低下や再灌流後の回復は波長 500, 530, 570, 584 nm で観察された。これらの波長は可視波長域におけるヘモグロビンの等吸収波長に一致するので、吸光係数の変化は総ヘモグロビン濃度を示している。500, 530, 570, 584 nm で虚血により μ_a は基準値から減少し($P < 0.05$)、再灌流によりゆっくりと旧値に復した。以上より等吸収波長での吸光係数は阻血再灌流障害下の総ヘモグロビン濃度変化を評価するパラメータとして使用できることが示された。

虚血前(酸素吸入、空気吸入)、虚血、再灌流と窒素吸入時の 6 検体平均の特定波長では、虚血 30 分後の波長 700 と 800nm での等価散乱係数 μ_s' 値は基準値より有意に低値($P < 0.05$)であった。一方で、虚血時の波長 500, 530, 570, 585 nm での μ_s' 値は、窒素吸入後に最大値を示したが、基準値および再灌流後の値に比較して有意に低下($P < 0.05$)した。

$\mu_a(605)/\mu_a(620)$ 値は虚血開始から有意に増加し再灌流後 30 分で旧値に復した。低酸素状態で顕著に増加し窒素吸入開始から 10 分で最大値に達した。

【考察】吸光係数 μ_a は虚血により可視波長範囲でヘモグロビンの等吸収波長点で急峻に低下したが、これは肝門部での血流遮断による肝

組織ヘモグロビン濃度の減少を示している。ヘモグロビンは 500 から 600nm 波長域で光を強く吸収するので、500, 530, 570, 585 nm (図 2(a), 3(b), 3(c), and 3(d))の各波長点で肝虚血後に吸収係数が減少するのは主に正常肝より虚血肝の血液量が少ないためである。

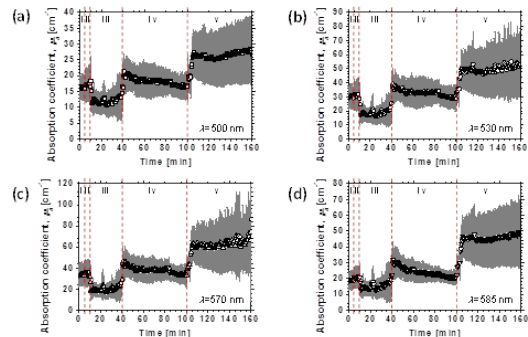


図 2

同波長点で死亡後に吸光係数が増加するのはおそらく肝内の血液量が増加するためであり、これは急激な出血なしに死亡した動物で肝重量の増加が観察されることと矛盾しない。虚血中の組織酸素飽和度 StO_2 値は虚血開始後すぐに $2.09 \pm 1.31\%$ まで低下する一方で、空気呼吸の条件下では再灌流すると $46.10 \pm 12.89\%$ まで回復し、これは虚血前の $45.86 \pm 11.95\%$ とほぼ同値であった。この結果は今回のシステムは肝の流入血遮断によって結果する StO_2 の低下を効率よく検知できることを示した。虚血中や窒素吸入後の $\mu_a(605)/\mu_a(620)$ の有意な増加が観察された(図 3)が、これはミトコンドリアのエネルギー欠乏のサインである heme aa3 の還元を表していると考えられた。

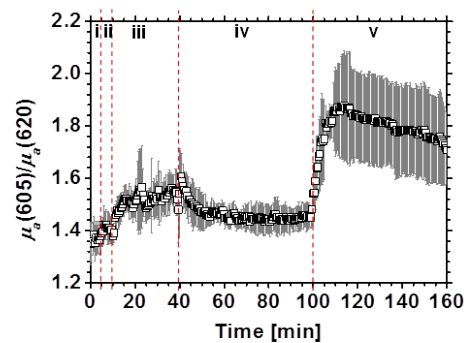


図 3

【結論】波長 500, 530, 570, 584 nm での吸光係数 μ_a の経時的変化は肝組織の血流動態と同様に組織酸素飽和度 StO_2 をよくあらわした。虚血時あるいは窒素吸入による安楽死後に吸収係数比 $\mu_a(605)/\mu_a(620)$ は有意に増加したが、これはミトコンドリアのエネルギー障害の徴候を表す heme aa3 の還元を示している。波長 500, 530, 570, 584 nm での等価散乱係数 μ_s' の経時的変化は赤血球による散乱を表す吸光係数 μ_a とよく相関した。一方で、波長 700、800nm では、虚血再灌流で μ_s' の一過性増加が

窒素吸入で不可逆的減少がそれぞれ観察された。虚血時の近赤外波長域での μ_s 'の変化は虚血による細胞や細胞内構造の形態変化を示唆しており、死後の変化は肝細胞の空胞化を意味すると推測された。本研究の結果はこのシステムを生体肝組織の病態生理学的状態の評価に応用できる可能性を示している。必要な装置は白色光源、ファイバーと2つのスペクトル計だけなので、提示した方法の利点は単純で可搬性であることである。提示した方法は、血流動態、ミトコンドリアエネルギーレベルと組織形態を同時に評価するのに使用できる。我々は、肝移植のような肝組織の病態生理学的状態を探索するために、本方法を、さらに拡張することを考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Sharmin A, Maejima S, Kawauchi S, Sato S, Hinoki A, Aosasa S, Yamamoto J, Nishidate I. Evaluation of light scattering and absorption properties of in vivo rat liver using a single-reflectance fiber probe during preischemia, ischemia-reperfusion, and postmortem. Journal of Biomedical Optics 20(7), 076010 (July 2015)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 順司 (YAMAMOTO Junji)
防衛医科大学校(医学教育部医専門課程)教授

研究者番号: 40342654

(2)研究分担者

佐藤 俊一 (SATO Shunichi)
防衛医科大学校(防衛医学研究センター)准教授

研究者番号: 90502906

川内 聡子 (KAWAUCHI Satoko)
防衛医科大学校(防衛医学研究センター)講師

研究者番号: 20506505

初瀬 一夫 (HATSUSE Kazuo)
防衛医科大学校(その他の部局等)准教授

研究者番号: 40082284