

小腸伸長術に小腸再生医療を 応用した小腸再生伸長術

氏名 中尾 光宏

所属 山口大学大学院 医学系研究科

博士後期課程

応用分子生命科学系専攻

平成 27 年 1 月

目次

1. 要旨	1
2. 背景	1
3. 目的	3
4. 方法	3
5. 結果	6
6. 考察	8
7. 結語	12
8. 謝辞	12
9. 参考文献	12

1. 要旨

本研究の目的は、再生医療素材（ブタ小腸粘膜下組織（SIS））を小腸伸長術（Bianchi 手術）に応用し、SIS を用いた小腸壁の再生が実現可能かどうかを評価することにある。

5 頭のビーグル犬で、Bianchi 手術と同様の方法で、小腸腸間膜の主幹動静脈から腸管への血管を温存しながら、小腸の長軸方向に前葉・後葉に二分した後、小腸半周にあたる 2×7cm の小腸を切除し、そこを SIS で修復した。6 ヶ月後、SIS による再生部における腸運動を *in vivo* で測定し、また再生組織の生理的な機能再生を、オーガンバス法を用いて *in vitro* で検討し、形態学的な再生の評価を、免疫組織染色にて行った。

すべてのビーグル犬は縫合不全を認めることなく生存した。空腹時に認める伝播性小腸消化管運動が再生部を通過して伝達されることを観察した。またアセチルコリン作動薬や電気刺激による正常組織に類似した反応性を確認した。粘膜は正常上皮で覆われ、神経および平滑筋細胞の再生を観察した。

SIS は、物理学および生理学的に、新しい腸管の形成を促進する足場となる可能性を有していた。今回の我々が発案した小腸再生伸長術は、将来的に短腸症候群患者における新規の外科的治療となることが期待される。

2. 背景

Bianchi が短腸症候群患者における新しい外科的治療法の最初の報告として小腸伸長術（Bianchi 手術）を発表してから 30 年以上が経過した。Bianchi 手術とは、短腸症候群患者で、拡張した小腸を腸管の長軸方向に二分して、それを

縦列につながるといった手術である[1]。この30年の間にいくつかの改良が行われ、その結果が報告されている[2-5]。拡張した小腸を持つ短腸症候群の患者に、そのような小腸伸長術や小腸形成手術を行う目的は、腸内の通過時間を遅らせることによる腸の吸収能力を期待し行われる。

1996年にSadayとMirは、漿膜パッチ法による粘膜増成術と小腸伸長術を組み合わせた非常にユニークな新たな術式を動物実験で行っているが[6]、その後の臨床試験を行うことができないまま経過している。一方、組織工学の分野における最近の技術の進歩によって、様々な組織や臓器を再生させることができるようになった。消化管における組織工学の分野でも短腸症候群患者に対する可能性を持った治療法の導入が検討されている。様々な研究者が組織工学に基づく足場の技術を開発してきており、ブタ由来の小腸粘膜下組織（SIS）は、そのような足場の一つで、脱細胞化され、コラーゲンを多く含む生体足場である。SISは組織修復のために不可欠であると思われる機能的な成長因子を含有し[7-9]、細胞接着因子や分裂促進因子、走化性サイトカイン、血管形成因子などの生物活性因子が含まれていることが報告されている[8, 10]。動物モデルを使用した消化管組織工学におけるSISの有用性はいくつか報告されている[11-16]。多くが、SISを使用する組織工学が正常な腸の構造的特徴を有する新しい小腸を作成するには有用であると報告されている[11-14]。ChenとBadylakは犬モデルでSISを使用して、消化管組織工学を研究した[17]。彼らは小腸の一部欠損に対しSISによるパッチによる修復術を行い、粘膜上皮、平滑筋、漿膜層からなる小腸壁を再構築することに成功した。しかしながら、小腸の間に管状のSISを置換したものは全くうまくいかなかったとも報告している[11]。したがって、

生体足場として SIS を使用する場合、パッチした SIS への血液供給を維持することは、小腸を再生伸長する上で、極めて重要と考えられる。

我々は小腸組織工学技術を用いて、Bianchi 手術とは異なり、小腸の拡張に関係なく、短腸症候群患者の治療に有益な革新的手術手技である小腸再生伸長術を発案した。まず Bianchi の血管処理に準じて間膜を二葉に分け、小腸を二分する。そして、腸間膜とともに二葉に分けた小腸の口側および肛門側の一端の小腸壁を半周切離し、間膜ごと長軸方向にずらす。ずらした小腸は一定の幅で小腸壁同士を吻合し、二か所の小腸壁全層欠損部には等面積の SIS を吸収糸で縫着する。欠損部を SIS にて置換し、小腸を再生させることによって、理論的には、小腸の内腔径を変えることなく、吸収面積を元の二倍に増加させるという新規術式である。

3. 目的

今回の研究の目的は我々が発案した小腸再生伸長術を行うにあたり、大動物で Bianchi 手術の腸間膜血流に基づき SIS をパッチしたときに SIS が足場として適しているか検証することであり、SIS が小腸再生の材料として実現可能かどうか生理学的、組織学的に評価することを目的とした。

4. 方法

4-1. 外科的手技

11. 1~16. 4kg の雌のビーグル犬 5 頭を研究に使用した。手術の 12 時間前より絶食とし飲水は制限しなかった。麻酔の導入は 5 mg/kg のプロポフォール（ディプ

リバン;AstraZeneca)と 0.1 mg/kg の臭化パンクロニウム (ミオブロック ; MSD) の単回静脈投与で行った。気管内挿管後、全身麻酔は酸素とイソフルランの気管内吸入によって維持した。腹部を消毒し 10 cm の正中切開にて開腹した。2.5 倍の拡大鏡装着下に、以下のように手術操作を行った (**Figure 1**)。トライツ靱帯から 40 cm 遠位の空腸で、7 cm にわたり、二分される腸間膜の片方だけ血管を犠牲にしながら切開し、他方の腸間膜は血管と共に温存した。空腸の切開は腸間膜対側で長軸方向に行った。血液供給の無くなった、小腸壁の半周にあたる、長軸方向に 7 cm、幅 2 cm の全層切除を行った。同部位に市販品の 4 層製品の SIS (SURGISIS、Cook Biotech) を 2 つ折りにして 8 層とし欠損部と等面積の 7x2 cm の大きさに調節、さらに 15 分間生食に浸したものを 5-0 PDS II (モノフィラメント吸収糸) にて連続縫合で縫着した。SIS は生体吸収性の材料であるので、将来的に同部位を識別するため SIS の両側の小腸壁に 5-0 プロリン (モノフィラメント非吸収糸) でマーキングを行った。止血を確認し、腹膜と筋肉は 2-0 ナイロン糸、皮膚は skin stapler で縫合し、閉創し手術を終了した。抗生剤 (フルマリリン ; 塩野義製薬) の投与は手術終了直後に一回だけ行った。術翌日より固形飼料の投与を再開した。

飼育管理・実験手順は、動物実験のためのガイドラインに従って実行した。

4-2. in vivo での消化管運動の評価

術後 6 ヶ月経って、全身麻酔下に再開腹した。小腸の再生領域は非吸収糸によるマーキングにて、すぐに同定することができた。4 個のフォーストランスデュースーを漿筋層に 5-0 プロリンにて固定した (**Figure 2**)。2 個のトランスデュースーは再生領域の口側 10 cm と 5 cm の空腸に植え込んだ。1 個は再生領域の真ん

中に、最後の1個は再生領域より5 cm肛門側に植え込んだ。ケーブルは脇腹から肋骨の皮下トンネルを経由して肩甲骨の間に皮膚切開を加え体外へ誘導、ケーブルの一端はジャケットプロテクターに格納した。トランスデューサーを植え込んでから1週間の回復を待ち、ケーブルの一端を無線式遠隔測定システムの送信器に接続した。覚醒した状態で空腹時の小腸運動を、コンピュータ支援システムを用いて観察し、分析を行った。

4-3. in vitro での筋運動の評価

in vivo で筋運動の評価を行った後に、動物を犠牲死とし、再生された領域を完全に含むように小腸を切除し標本を摘出した。2つの組織切片を縦走筋に沿うように再生領域から採取した。1片でin vitro での筋運動の評価を行い、もう1片で免疫組織学的解析を行った。in vitro での筋運動の評価は、再生部分に対して、薬剤濃度変化による反応性や、電気刺激の周波数変化による反応性を評価するため、オーガンバスシステム (AD Instruments) を用いた薬物・電気生理学的検査を行った。長さ10mm・幅5mmのストリップを作成し、10mlのオーガンバス内に装着した。Krebs-Henseleit buffer (118mM NaCl, 4.8mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, and 11mM glucose)を満たし、36°C環境で95%O₂ 5%CO₂のバブリングを継続して行った。静止荷重0.5 gでストリップを調整し、1時間平衡化した。筋収縮はisometric transducer (Nihon Kohden) にて検知して、Power Lab (AD Instruments) にて記録・解析を行った。carbachol hydrochloride (CCH、ムスカリン受容体作動薬; 1×10^{-8} to 1×10^{-4} M)による薬物刺激での運動機能評価を行った。Electrical stimulator (Nihon Kohden) を用いて、Electrical field stimulation (EFS; 50mV, 1.0msec.

duration, 10sec. trains at 2.5, 5, 10, 20, and 40Hz)による反応を評価した。

4-4. 免疫組織学的評価

組織切片を4%パラホルムアルデヒドに浸して固定し、パラフィン包埋し、薄切した。H.E.染色、PAS染色、EVG染色での観察評価のほか、腸管平滑筋の再生を観察するため α -smooth muscle actin (α SMA; abcam)やデスミン(abcam)に対して、また腸管壁内の神経線維再生を観察するためS-100 protein に対する免疫染色を行った。全層、粘膜層、筋層の厚さを測定し、正常部と比較した。

5. 結果

5-1. 臨床および肉眼的所見

全ての症例において、血管を傷つけることなく、腸間膜に沿って腸壁にSISを縫合することが可能であった。全てのビーグル犬はin vivo実験を行うまで変わりなく生存した。また全てにおいて有意な体重減少を示さなかった(術前, 13.04 \pm 0.96 kg; 6ヶ月後, 13.18 \pm 0.96 kg; $P = 0.732$)。穿孔による腹膜炎や腸閉塞の症状は認めず。6カ月後の再開腹所見では大網が軽度SISパッチ部に癒着する程度であった(**Table 1**)。パッチしたSISは肉眼的に消失しており、マーキングのためのポリプロピレン縫合糸により再生部を同定することができた。再生部に憩室の形成および狭窄を認めず(**Figure2**)、再生領域の口側の小腸に拡張を認めなかった。

5-2. in vivo での筋運動の評価

無線式遠隔測定システムを用い、無麻酔覚醒下で、空腹期における小腸消化管運動を観察したところ、順蠕動性の伝播性収縮波形を認めた(**Figure 3A**)。この伝播性収縮性の消化管運動は、これまで我々が観察してきたイヌの覚醒下空腹期に生じる自律運動に酷似していた[18]。

5-3. in vitro での筋運動の評価

CCH 刺激による濃度依存性の収縮力増強反応を認めた。SIS 再生部の CCH に応答した収縮の振幅はコントロールの 1/4 であった(**Figure 3Ba, 3Bb**)。SIS 再生部における電気刺激に対する収縮もコントロールと比べて 1/4 と低かったが、正常部と同様の反応性を認めた(**Figure 3Bc, 3Bd**)。

5-4. 組織学的所見

すべての再生部の標本でびらんや潰瘍とは異なる人工的な浅い陥凹が認められた。再生された領域は刷子縁を伴う多数の吸収円柱細胞と少数の杯細胞が含まれる円柱上皮層で覆われていた(**Figure 4A**)。粘膜固有層を中心とする細長い絨毛などの正常な外観を形成していた。再生された粘膜層には絨毛内に伸展する筋線維を認め、これは正常粘膜で粘膜筋板が絨毛内に入り込む構造に類似していた。HE 染色では SIS で再生された領域は平滑筋細胞の層で構成されていた。同部位には薄い筋層を認めているが、これらは癒痕組織にみられる無秩序な配列ではなく、層構造を保ちながら伸展していた。正常部の筋層から再生部の筋層への移行は滑らかであり、外側は漿膜で覆われていた。再生領域の血管新生

と新たな神経支配は EVG 染色ならびに S100 染色で観察された (Figure 4B)。 α -SMA およびデスミンによる免疫染色では筋層構造が認められた (Figure 5)。2 頭の犬ではこの二層ははっきりと識別できたが、残る 3 頭の犬ではこれらの異なる筋層の境界が不明瞭であった。5 頭すべての犬において二つの筋層を含むように筋層の厚みを測定した。再生領域と正常部を比較して粘膜、筋層、全層の厚みには有意な差を認めなかった (Table 1)。

6. 考察

短腸症候群は小腸の広範囲切除後に生じる吸収不良状態として定義される病態であり、長期生存率は 50%~75% である [19]。現在、短腸症候群と肝不全の患者に行う最も効果的な治療はおそらく臓器移植であると考えられる [20]。しかしながら、利用可能な臓器の数は限られており、小腸移植の安全性や死亡率の面では未だに不確実である。そのため外科医は手術によって、腸の長さが不十分であることが原因で生じる短腸症候群患者の問題を改善させようと試みている。これらの方法は腸の内容物と吸収面との接触時間を長くするために腸の体積に対する表面積の比を最適化しようとして考えられている [21]。Bianchi 手術は、近年でも短腸症候群の患者に対する外科的治療として用いられており、よく知られた技術の一つである。この手術では、拡張した小腸がリニアステープラーによって長軸方向に二分割するといった、腸管を栄養する血管が腸間膜において腸壁の手前で前後壁の二つに分岐するという走行知見に基づいて行われるものである。二つに分けられた腸管を順蠕動に縦列につなぐことによって連続性を復元させる [1]。しかしながら、この手術では拡張小腸の直径は 50% に減少し、長さは 200% 増加、つまり手術後すぐに小腸の吸収領域の総量はそのまま

で、小腸粘膜の吸収機能は、その後どれだけ順応していくかに期待されることになる。実際、Bianchi の最初のレビューでは、小腸伸長術を行った短腸症候群の子供の長期的な生存率はわずか 45%であった[22]。このような結果ではあるが、これについては縦列に腸をつなぎ直し、長くするこの手術が短腸症候群患者の予後を改善する唯一の方法だと述べられている[2-5]。

短腸症候群患者に対する最終的な治療目標は、小腸の吸収面積を増加させることである。Saday と Mir は漿膜パッチ法を用い新しい粘膜を成長させ腸の吸収面積を改善させるというウサギを実験動物として用いた面白い外科モデルを示している[6]。漿膜パッチ法は、新たな腸粘膜を成長させることで腸の表面積を増大させるという従来の方法である。しかし、Thompson と Quigley は漿膜パッチ法の有用性に疑問を呈している[23]。残念ながら、Saday と Mir の手法は複雑であり、また解剖学的な要因などにより臨床の現場で短腸症候群患者の治療法として応用されることはなかった。

前述のように、Bianchi 手術が、深刻な腸拡張を伴う短腸症候群患者のための外科的治療として臨床的に応用されている。我々は、腸が著しく拡張していない短腸症候群患者の治療にも有益で革新的な手術手技を考案した。Bianchi[1]の血管処理に準じて間膜を 2 葉に分け、小腸を二分する。そして、腸間膜とともに二葉に分けた小腸の口側および肛門側の一端の小腸壁を半周切離し、間膜ごと長軸方向にずらす。ずらした小腸は一定の幅で小腸壁同士を吻合し、二か所の小腸壁全層欠損部には等面積の SIS を吸収糸で縫着する。欠損部を SIS にて置換し小腸を再生させるという小腸組織工学と Bianchi 手術を組み合わせるため、施術前後の腸管径は変えずに小腸の吸収面積を二倍に増加させることができる。

ブタ小腸由来の SIS は再生過程に不可欠であろう機能的成長因子を含む細胞外マトリックスである [7-9]。SIS は、細胞接着因子、分裂促進因子、走化性サイトカイン、および血管新生因子を含む生物活性因子を有していると報告されている [10]。1966 年に、ヒトに初めて下大静脈壁の置換のために使用された [24]。SIS は動物における消化管再生の実験に広く使用されている。我々もまた、以前、げっ歯類の胃壁全層欠損モデルに使用し組織形態とともに機能的評価を行った [25-27]。他にも動物モデルを用いた腸組織工学における SIS の有用性を説明したいくつかの報告がある [11-16]。SIS を利用した新しい小腸組織工学により、正常の小腸の構造的特徴を再生できることが報告されている [11-14]。Chen と Badylak は犬モデルで SIS の実現可能性を観察した [11]。彼らは小腸に作成した欠損部に SIS をパッチし、粘膜上皮層、平滑筋、コラーゲン層、外側を覆う漿膜といった再構築された腸壁を再現することに成功していた。にもかかわらず、SIS を筒状に作成し部分移植した場合は、その再生が不可能であったと報告している。これは消化管の間に介在するように移植した筒状の SIS の中央部への血液供給が不十分であったために著しい狭窄を生じたと考えられている [15, 16, 28]。したがって SIS を用いた再生には移植片とレシピエントの間の血管新生が必須であると考えられる [29]。我々は Bianchi 手術におけるステープルラインを SIS の移植片によって置き換えることで、管状に移植したものとは異なり SIS の断端が正常の腸と接していたため血管新生を促進するための十分な血液供給を維持することができたと考えている。残念なことにビーグル犬では腸間膜の血管分岐と腸壁との間が短すぎるため、完全にビアンキ手術を再現することができなかった。

本研究では、大型動物において、二分した腸間膜の片側だけの血流、すなわち Bianchi 手術と同様の血流支配下で全層欠損部にパッチした SIS が生着できることを示した。全症例において腸間膜側からの血管を損傷することなく SIS 移植片と縫合でき、これは腸管を均等に二分したときでも、技術的にはうまくいくことを意味している。すべての犬が縫合不全を認めず、生存し、成長した。組織学的に、我々も、Chen および Badylak の記述と同じように、再生小腸に粘膜、平滑筋および漿膜からなる三層を観察した[11]。再生領域と正常部を比較して粘膜、筋層、全層の厚みには有意な差を認めなかった。さらに遠隔測定フォーストランスデューサーシステムを用いた *in vivo* における空腹期の小腸の蠕動性消化管運動の観察では、正常ビーグル犬の覚醒下消化管自律運動に類似する消化管運動が再生領域を通過するように測定された[18]。また再生部の組織片は、*in vitro* で、濃度および周波数依存性の筋収縮を示した。これは、SIS 移植片が薬理学的および電気生理学的に消化管の再生を強く誘導することができることを意味する。我々の結果は、大動物で SIS を用いて小腸再生伸長術を実施したとき、SIS が生分解性の足場として使用できることを示している。最終的な臨床上の目標はヒト由来の SIS と Bianchi 手術を用いて小腸組織工学と組み合わせた技術によって短腸症候群患者のための普遍的な治療法を開発することである。ヒト由来の SIS は単孔手術によって生体ドナーから採取することを想定している。実際に我々は現在、腸間膜の構造がヒトと類似している大動物にこの考えを応用し、検証中である。ブタ由来の SIS を用いて我々が考案した Bianchi 手術を応用した手技をブタに行い、成功した（未発表研究）。今回の研究により、二分した腸間膜の片側のみの血液供給でパッチした SIS が生着することを立証でき、次の段階に進む上で最も基礎的な研究であると考えてい

る。いくつかのグループは最近、上皮幹細胞の知見に基づいて新しい粘膜の作成に関する研究を加速してきた[30-33]。それらの知見とさらに組み合わせることで、SISが新しい小腸吸収面積の増大化においてより現実的に工夫が可能と考えている。今回の我々の新術式は小腸拡張の有無にかかわらず、短腸症候群患者における新規の外科的治療へのアプローチとしての可能性が期待できる。

7. 結語

SISは小腸再生において有用な足場素材であり、SISを用いて小腸再生伸長術が行える可能性が示唆された。

8. 謝辞

本研究を遂行するに当たり直接指導いただきました消化器・腫瘍外科学 講師 上野富雄博士に感謝いたします。また実験にご助言いただきました分子病理学 小賀厚徳先生（講師・博士）、プロテオーム・蛋白機能制御学 藏満保宏先生（准教授・博士）に感謝いたします。本研究遂行にあたりご指導、ご助言をいただきました消化器・腫瘍外科学 岡正朗教授に深謝いたします。

9. 参考文献

- [1] Bianchi A. Intestinal loop lengthening—a technique for increasing small intestinal length. *J Pediatr Surg* 1980;15:145-51.
- [2] Walker S.R., Nucci A., Yaworski J.A., et al. The Bianchi procedure: a 20-year single institution experience. *J Pediatr Surg* 2006;41:113-9; discussion 113-9.

- [3] Sudan D., Thompson J., Botha J., et al. Comparison of intestinal lengthening procedures for patients with short bowel syndrome. *Ann Surg* 2007;246:593-601; discussion 601-4.
- [4] Reinshagen K., Kabs C., Wirth H., et al. Long-term outcome in patients with short bowel syndrome after longitudinal intestinal lengthening and tailoring. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;47:573-8.
- [5] Pakarinen M.P., Kurvinen A., Koivusalo A.I., et al. Long-term controlled outcomes after autologous intestinal reconstruction surgery in treatment of severe short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 2013;48:339-44.
- [6] Saday C.Mir E. A surgical model to increase the intestinal absorptive surface: intestinal lengthening and growing neomucosa in the same approach. *J Surg Res* 1996;62:184-91.
- [7] Voytik-Harbin S.L., Brightman A.O., Kraine M.R., et al. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem* 1997;67:478-91.
- [8] McDevitt C.A., Wildey G.M.Cutrone R.M. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:637-40.
- [9] Hodde J., Janis A.Hiles M. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part II. Bioactivity and matrix interaction. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18:545-50.
- [10] Yang B., Zhou L., Sun Z., et al. In vitro evaluation of the bioactive factors preserved in porcine small intestinal submucosa through cellular biological approaches. *J Biomed Mater Res A* 2010;93:1100-9.
- [11] Chen M.K.Badylak S.F. Small bowel tissue engineering using small intestinal submucosa as a scaffold. *J Surg Res* 2001;99:352-8.
- [12] Wang Z.Q., Watanabe Y.Toki A. Experimental assessment of small intestinal submucosa as a small bowel graft in a rat model. *J Pediatr Surg* 2003;38:1596-601.
- [13] Demirbilek S., Kanmaz T., Ozardali I., et al. Using porcine small intestinal submucosa in intestinal regeneration. *Pediatr Surg Int* 2003;19:588-92.
- [14] Wang Z.Q., Watanabe Y., Noda T., et al. Morphologic evaluation of regenerated small bowel by small intestinal submucosa. *J Pediatr Surg* 2005;40:1898-902.

- [15] Lee M., Chang P.C., Dunn J.C. Evaluation of small intestinal submucosa as scaffolds for intestinal tissue engineering. *J Surg Res* 2008;147:168-71.
- [16] Qin H.H., Dunn J.C. Small intestinal submucosa seeded with intestinal smooth muscle cells in a rodent jejunal interposition model. *J Surg Res* 2011;171:e21-6.
- [17] Chung S.Y., Krivorov N.P., Rausei V., et al. Bladder reconstitution with bone marrow derived stem cells seeded on small intestinal submucosa improves morphological and molecular composition. *J Urol* 2005;174:353-9.
- [18] Ueno T., Uemura K., Harris M.B., et al. Role of vagus nerve in postprandial antropyloric coordination in conscious dogs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G487-95.
- [19] Vanderhoof J.A., Langnas A.N. Short-bowel syndrome in children and adults. *Gastroenterology* 1997;113:1767-78.
- [20] Fryer J.P. The current status of intestinal transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:266-72.
- [21] Thompson J.S., Rochling F.A., Weseman R.A., et al. Current management of short bowel syndrome. *Curr Probl Surg* 2012;49:52-115.
- [22] Bianchi A. Experience with longitudinal intestinal lengthening and tailoring. *Eur J Pediatr Surg* 1999;9:256-9.
- [23] Thompson J.S., Quigley E.M. Motor and absorptive function of the canine intestine following serosal patching: the effects of a lateral enterotomy on small intestinal myoelectrical activity. *J Invest Surg* 1991;4:203-15.
- [24] Matsumoto T., Holmes R.H., Burdick C.O., et al. Replacement of large veins with free inverted segments of small bowel: autografts of submucosal membrane in dogs and clinical use. *Ann Surg* 1966;164:845-8.
- [25] Ueno T., de la Fuente S.G., Abdel-Wahab O.I., et al. Functional evaluation of the grafted wall with porcine-derived small intestinal submucosa (SIS) to a stomach defect in rats. *Surgery* 2007;142:376-83.
- [26] Ueno T., Oga A., Takahashi T., et al. Small intestinal submucosa (SIS) in the repair of a cecal wound in unprepared bowel in rats. *J Gastrointest Surg* 2007;11:918-22.
- [27] Nishimura T., Ueno T., Nakatsu H., et al. In vivo motility evaluation of the grafted gastric wall with small intestinal submucosa. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1761-8.

- [28] Doede T., Bondartschuk M., Joerck C., et al. Unsuccessful alloplastic esophageal replacement with porcine small intestinal submucosa. *Artif Organs* 2009;33:328-33.
- [29] Rafii S., Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-12.
- [30] Sato T., Vries R.G., Snippert H.J., et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459:262-5.
- [31] Jung P., Sato T., Merlos-Suarez A., et al. Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nat Med* 2011;17:1225-7.
- [32] Sato T., Stange D.E., Ferrante M., et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 2011;141:1762-72.
- [33] Yui S., Nakamura T., Sato T., et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5(+) stem cell. *Nat Med* 2012;18:618-23.

Table 1. Characteristics of clinical, macroscopic, and microscopic findings

Clinically & Macroscopically									
	Postoperative complication		Body weight loss		Adhesion of omentum		Stenosis of intestinal tract		
Dog 1	none		none		presence		absence		
Dog 2	none		none		presence		absence		
Dog 3	none		none		presence		absence		
Dog 4	none		none		presence		slightly		
Dog 5	none		none		presence		absence		

Microscopically(1)									
	Regeneration of mucosa		Regeneration of muscularis mucosae		Regeneration of submucosa		Regeneration of tunica muscularis		
Dog 1	presence		presence		presence		presence		
Dog 2	presence		absence		absence		presence		
Dog 3	presence		presence		presence		presence		
Dog 4	presence		absence		absence		presence		
Dog 5	presence		absence		absence		presence		

Microscopically(2)									
	Length of mucosa (mm)			Length of tunica muscularis (mm)			Length of whole layer (mm)		
	Regenerated area	Control	ratio	Regenerated area	Control	ratio	Regenerated area	Control	ratio
Dog 1	1.52	1.60	0.95	0.60	0.80	0.75	2.56	3.40	0.75
Dog 2	1.80	1.88	0.96	0.60	1.00	0.60	2.60	2.80	0.93
Dog 3	1.04	1.40	0.74	0.40	0.80	0.50	1.80	3.00	0.60
Dog 4	0.72	1.68	0.43	0.32	0.60	0.53	1.12	2.72	0.41
Dog 5	1.80	1.80	1.00	1.00	1.20	0.83	3.00	3.20	0.94
ave. ± s.e.	1.38 ± 0.21	1.67 ± 0.08	0.82 ± 0.11	0.58 ± 0.12	0.88 ± 0.10	0.64 ± 0.06	2.22 ± 0.34	3.02 ± 0.13	0.73 ± 0.10

Table 1

全症例における臨床的、肉眼的、組織学的所見の特徴

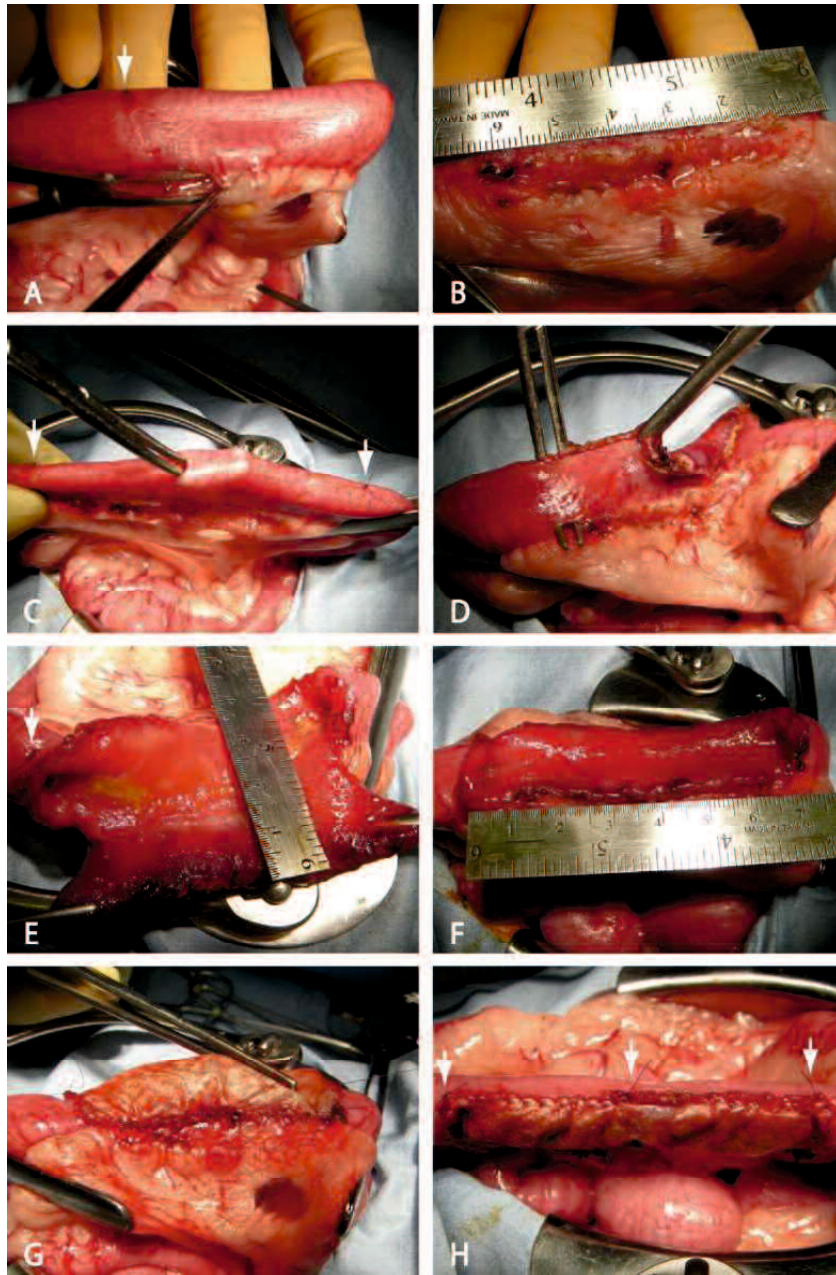


Figure 1 外科的手技

(A)空腸を7 cmにわたり、二分される腸間膜の片方だけ、血管を犠牲にしながらか開。
 (B)残りの腸間膜は血管と共に温存。(C)腸間膜対側で長軸方向に切開。(D)小腸壁の半周にあたる短軸方向の壁を切離。(E)血液供給の無くなった腸管壁。(F)長軸方向に7 cm、幅2 cmの大きさに全層切除。(G)欠損部に SIS を7x2 cmの大きさに調節し5-0 PDS IIにて連続縫合で縫着。(H)手術終了。

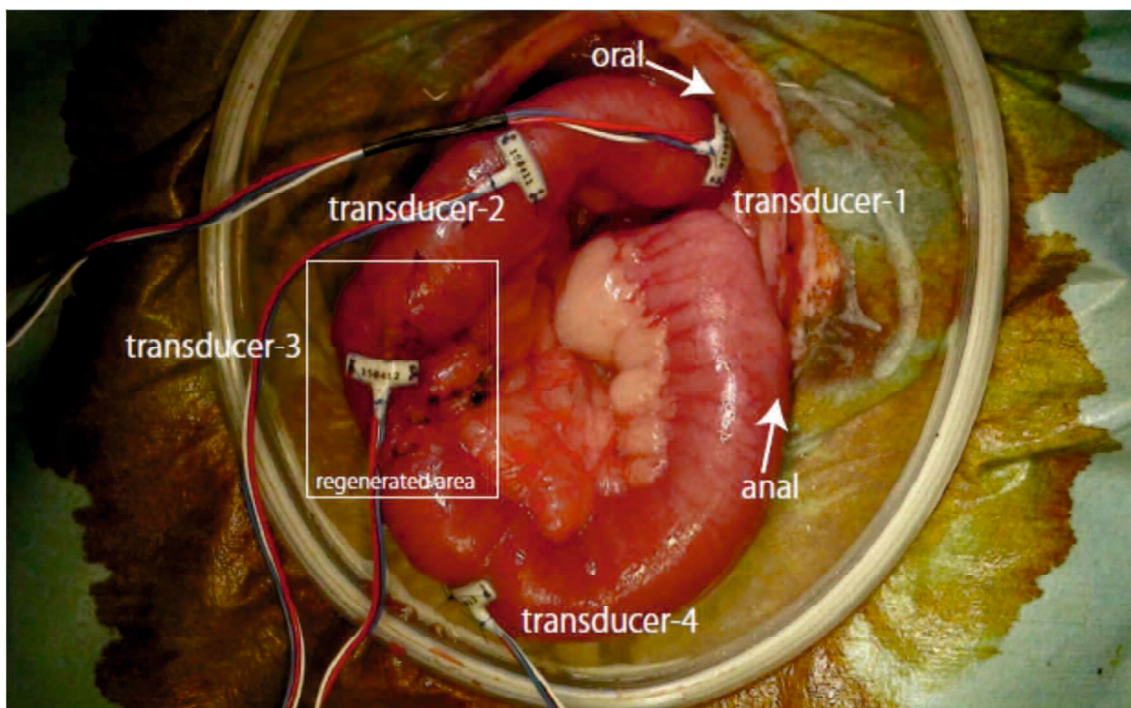
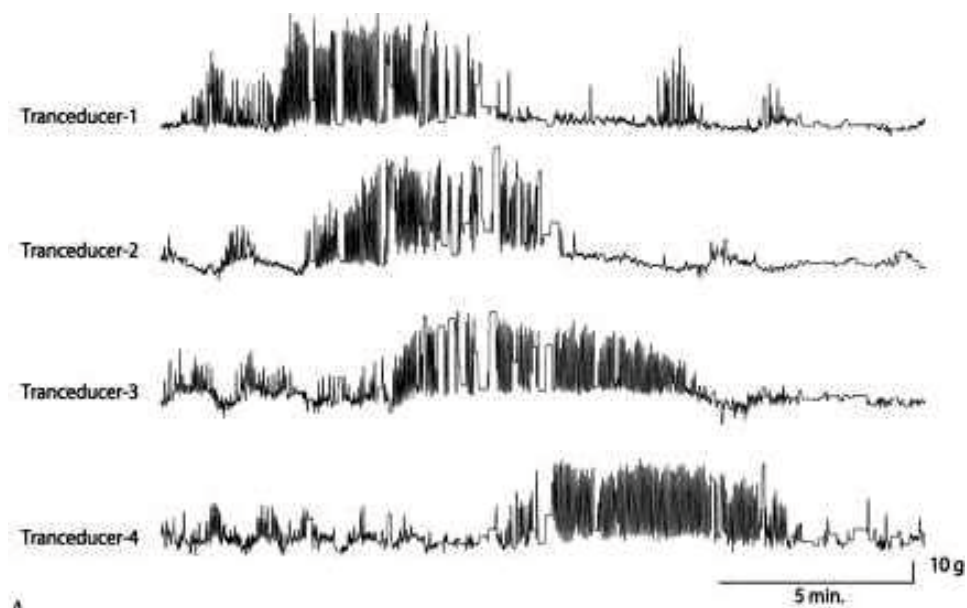
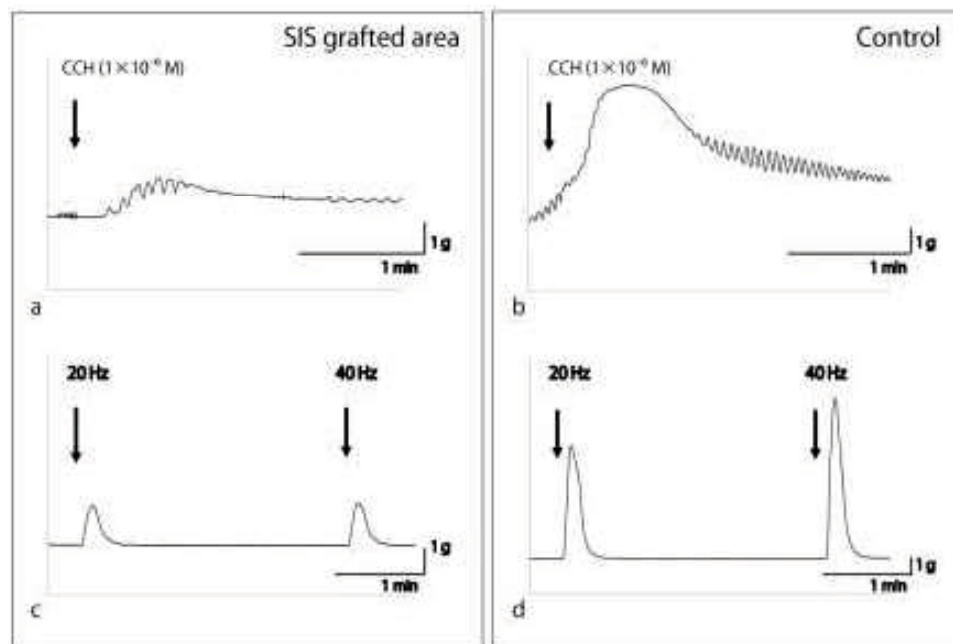


Figure 2 肉眼的所見とトランスデューサーの位置

パッチした SIS は肉眼的に消失しており、マーキングのためのポリプロピレン縫合糸により再生部を同定することができた。再生部に憩室の形成および狭窄を認めず。2 個のトランスデューサーは再生領域の口側 10 cm と 5 cm の空腸に植え込んだ。1 個は再生領域の真ん中に、最後の 1 個は再生領域より 5 cm 肛門側に植え込んだ。



A

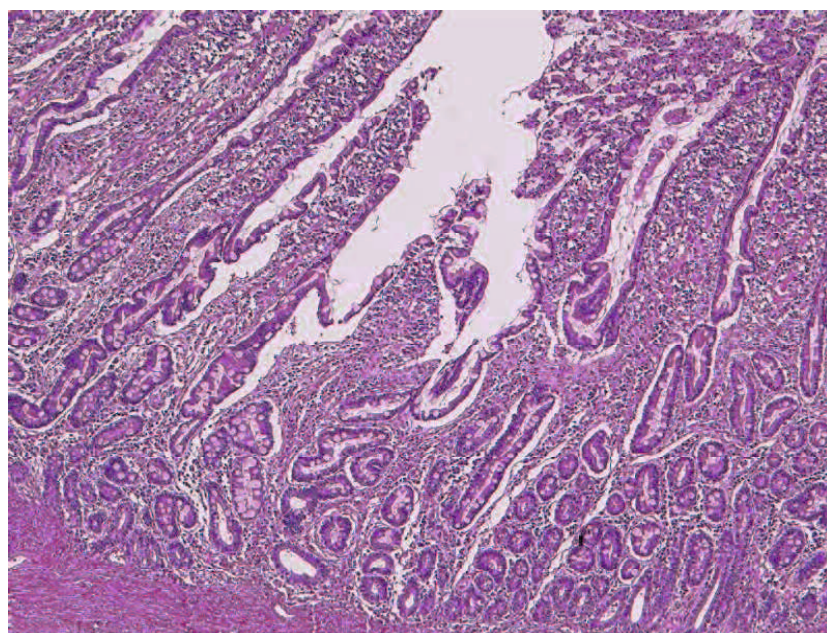


B

Figure 3 収縮機能評価

無線式遠隔測定システムを用い、無麻酔覚醒下で、空腹期における小腸消化管運動を観察したところ、順蠕動性の伝播性収縮波形を認めた(Figure A)。

CCH 刺激による濃度依存性の収縮力増強反応(Figure B-a,B-b)および電気刺激に対する収縮反応を認めた(Figure B-c, B-d)。



A

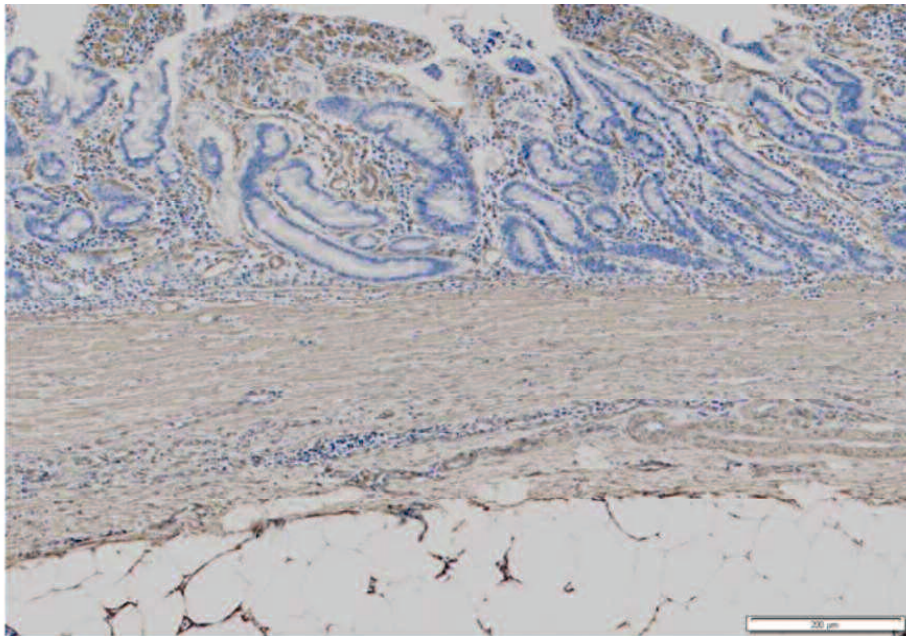


B

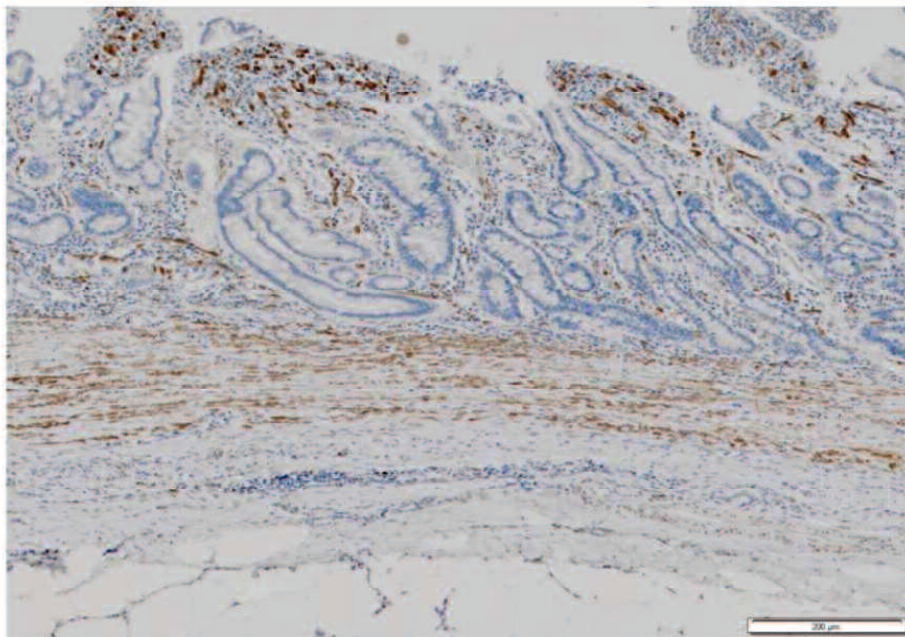
Figure 4 組織学的所見 (PAS(A)、S100(B))

すべての再生部の標本でびらんや潰瘍とは異なる人工的な浅い陥凹が認められた。再生された領域は刷子縁を伴う多数の吸収円柱細胞と少数の杯細胞が含まれる円柱上皮層で覆われていた(A)。

S100染色で再生領域に神経線維ならびにS100陽性細胞(矢印)が観察された(B)。



A



B

Figure 5 免疫組織化学染色所見 (α -SMA(A)、デスミン(B))

α -SMA(A)およびデスミン(B)による免疫染色では、粘膜下組織と固有筋層の構造が認められた。