

# 有茎分節腸管内肝組織片充填式補助肝臓の開発—第1報

小暮公孝,<sup>1</sup> 石崎政利,<sup>2</sup> 根本雅明<sup>3</sup>  
桑野博行,<sup>4</sup> 小島至,<sup>1</sup> 磯村寛樹<sup>5</sup>  
星野洪郎,<sup>6</sup> 幕内雅敏<sup>7</sup>

## 要旨

【背景・目的】 肝不全の治療には肝移植が効果的な方法であるがドナー不足の現状がある。本研究はドナー不足を補えるような効果的な補助肝臓の開発を目指している。【対象と方法】 雄性ウイスター系ラット 300-400g を用いた。2-3 cm の分節空腸をその栄養動静脈を温存して単離する。その粘膜を削除した中に同じラットから摘出した左葉をミンチし、これを充填して補助肝臓を作成した。決められた期間に犠牲死させ腸管グラフト内の肝組織片の状態を組織学的に検討した。【結果】 移植後 10 日までは充填した肝組織片はお互いに融合し肝の小葉構造を形成して増殖を続けたがそれ以降になると次第に壊死融解する部分が大きくなった。【結語】 腸管グラフト内への肝組織片移植法は補助肝臓として有望であると考えられたが肝組織片の増殖、増大に伴う血流の維持をどのように計るのが今後の課題である。(Kitakanto Med J 2013 ; 63 : 133~140)

キーワード：肝不全, 補助肝臓, 肝組織片充填有茎腸管

## はじめに

肝不全に陥った患者を救命するには現在では肝移植が最も効果的な治療法であるが、ドナー不足の現状を見ると何らかの代替物-補助肝臓が求められている。例えば、肝硬変症では肝不全に陥る手前で新たに肝組織の再生を促すような有効な手段があれば肝不全に陥るまでには至らないであろうし、また、急性肝不全症では効果的な補助肝臓が在り bridge use としてこれを用いて急性期を乗り切れば障害された肝臓の再生と回復を期待することも出来る。しかし、主流の体外型補助肝臓は装置が複雑で、また、高価であり、一般化するには難点がある。<sup>1</sup> 現在、一般の施設でも導入可能な安価で効果的な補助肝臓の開発が求められている。

上記の目的を実現するために肝細胞を移植して不全肝の補助肝臓としての機能を持たせようとする研究が従前から行われてきているが不全肝を代償できるほどの大き

さの人工肝を作り出せていない。

今回、我々が開発を目指している有茎腸管内肝組織片直接充填式補助肝臓は Guputa らの開発した有茎腸管内肝組織片充填式移植法を参考にして試みられた。<sup>2,3</sup> この有茎腸管内肝組織片充填式補助肝臓は門脈血の関与と充分量の肝組織片の移植を保証する効果的な方法になるものと考えている。今回、有茎腸管内肝組織片充填式補助肝臓の開発の試みたなかで、比較的、典型的な経過を示したケースを中心にしてその第1報を報告したい。

## 対象と方法

Guputa らの方法を参考にして雄性ウイスター系ラット (300-400g, 各実験毎, 3-5 匹を用いる) の空腸起始部から数 cm のところで長さ 2-3 cm ほどの上腸間膜動静脈の枝の一对を付けた有茎腸管 (グラフト) を作成した。有茎腸管を切り出した後の空腸は断端をブルドック鉗子 (FST) でクランプした後、7-0 針付き絹糸 (HANDAYA

1 群馬県前橋市昭和町3-39-15 群馬大学生体調節研究所細胞調節分野 2 群馬県藤岡市藤岡942-1 公立藤岡総合病院

3 群馬県渋川市有馬237-1 北毛病院 4 群馬県前橋市昭和町3-39-22 群馬大学大学院病態総合外科学 (第一外科)

5 群馬県前橋市昭和町3-39-22 群馬大学大学院分子予防医学 6 群馬県前橋市昭和町3-39-22 群馬大学先端科学研究指導者育

成ユニット 7 東京都渋谷区広尾4-1-22 日本赤十字社医療センター

平成25年2月21日 受付

論文別刷請求先 〒371-8512 群馬県前橋市昭和町3-39-15 群馬大学生体調節研究所細胞調節分野 小暮公孝

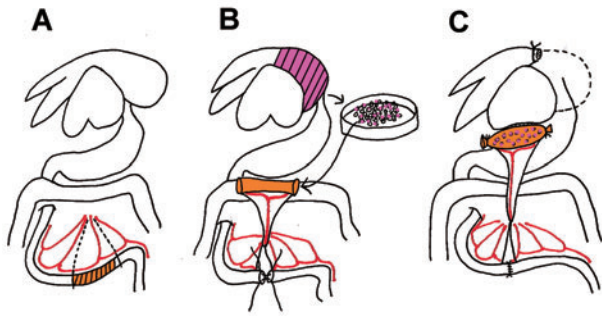


図1 肝組織片充填有茎腸管グラフトの作成  
A: 分節腸管の単離, B: 肝左葉の摘出とミンチ,  
C: ミンチした肝組織片のグラフト内充填.

黒バージンシルク7-0)で端々吻合を行った。この後、ラット肝左葉基部を5-0絹糸で結紮した後、左葉を切除し滅菌シャーレの中でメスを用いて十分にミンチ(mince)し生理的食塩水を含んだガーゼで覆い保存した。次に有茎腸管グラフト内を生理的食塩水に浸した最小の綿棒で十分に清拭、洗浄してからN0.4鋭匙を用いて有茎腸管内の粘膜を削いだ後、1mlツベルクリン用シリンジを用いてミンチした肝組織を有茎腸管内に充填して断端を閉鎖した。断端は5-0絹糸を用いて単結紮で閉鎖した。この後、肝組織片を充填した有茎腸管を遺残肝中葉にアロンアルファあるいは7-0針付き絹糸で逢着させて固定した。術後、7日-10ヶ月の間に犠牲死させ肝組織片充填腸管グラフトを摘出し組織学的(HE染色, PAS染

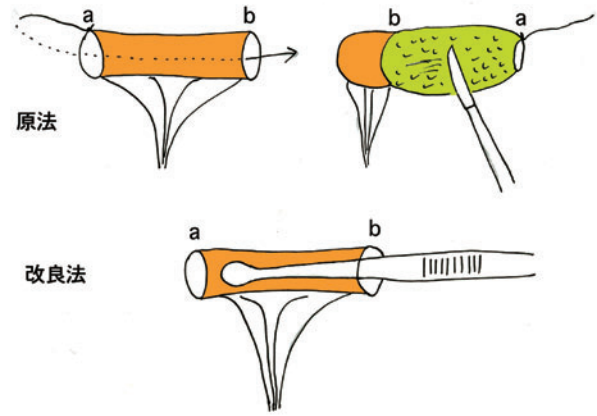


図2 有茎腸管の粘膜削除法; 腸管を翻転しメスで削除, 翻転しないで鋭匙で削除.

色)に検討した(図1, 2, 3).

## 結 果

### 1. 腸管グラフト内肝組織片移植 7日群

図4-A and Bは肝組織片を腸管グラフト内に充填して7日目に摘出したグラフトの断面である。充填した組織片が腫大した腸管グラフト内に充満している。PAS染色も陽性で充填肝組織内でグリコーゲンの合成も行われていることが推測できる(図4-B)。HE染色の強拡大では中心静脈を中心にして肝細胞索構造が形成されているのが認められる(図4-C and D)。

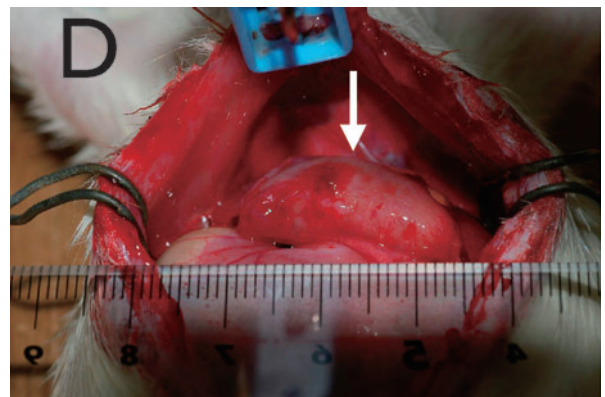
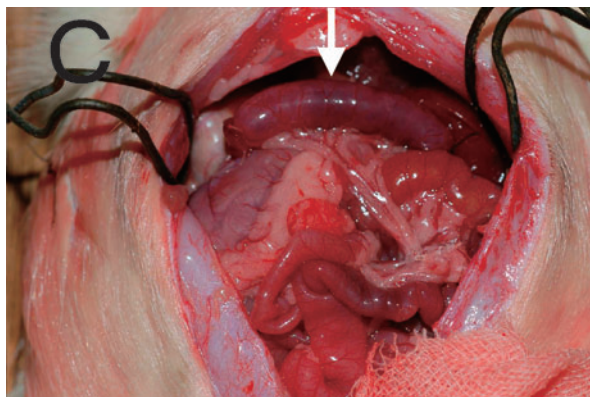
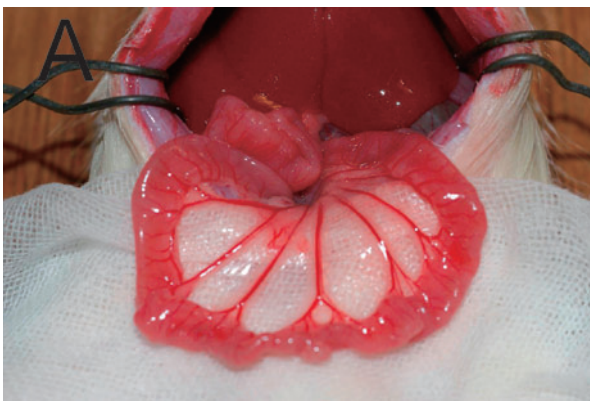


図3 実際の肝組織片充填有茎腸管グラフトの作成過程  
A: 分節腸管単離部位の選択, B: 肝組織片充填腸管グラフト (矢印), C: 肝組織片充填腸管グラフトの肝中葉への固定,  
D: 腫大, 増殖した肝組織片充填腸管グラフト.



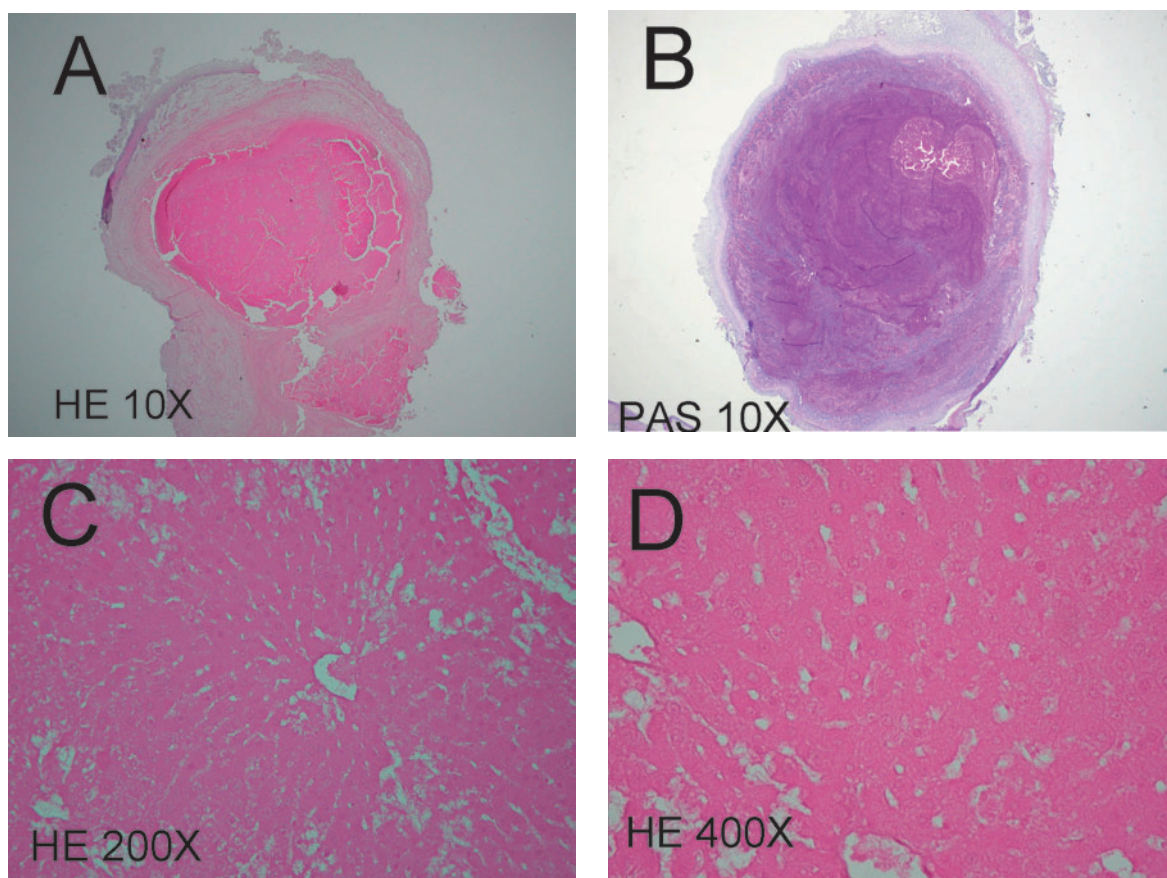


図4 グラフト作成7日後摘出例

A: 断面の HE 染色, B: 断面の PAS 染色, C, D: 充填肝組織の HE 染色. 肝小葉構造が認められる.

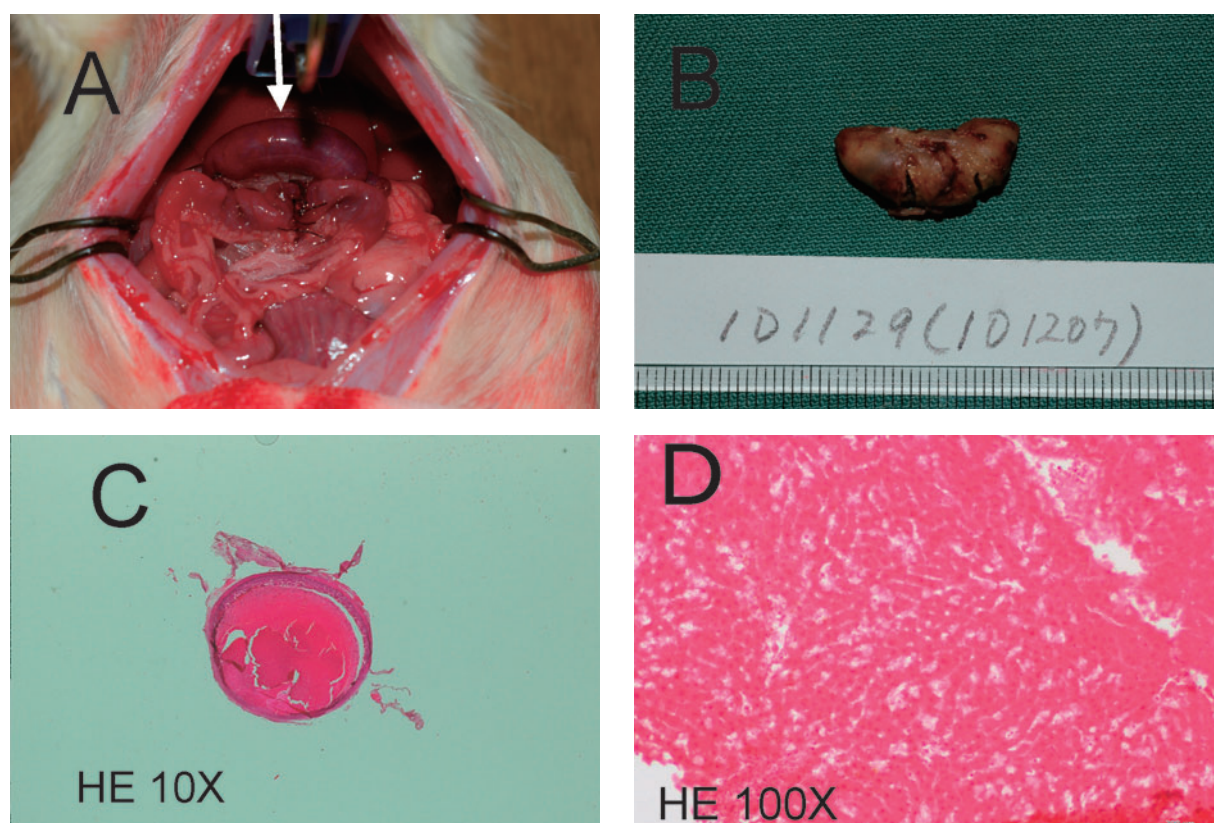


図5 グラフト作成8日後摘出例

A: 肝中葉へ固定された肝組織片充填腸管グラフト, B: フォルマリン固定された肝組織片充填腸管グラフト, C: 断面の HE 染色, グラフト一杯に肝組織が増殖している, D: 充填肝組織の HE 染色. 肝小葉構造が認められる.



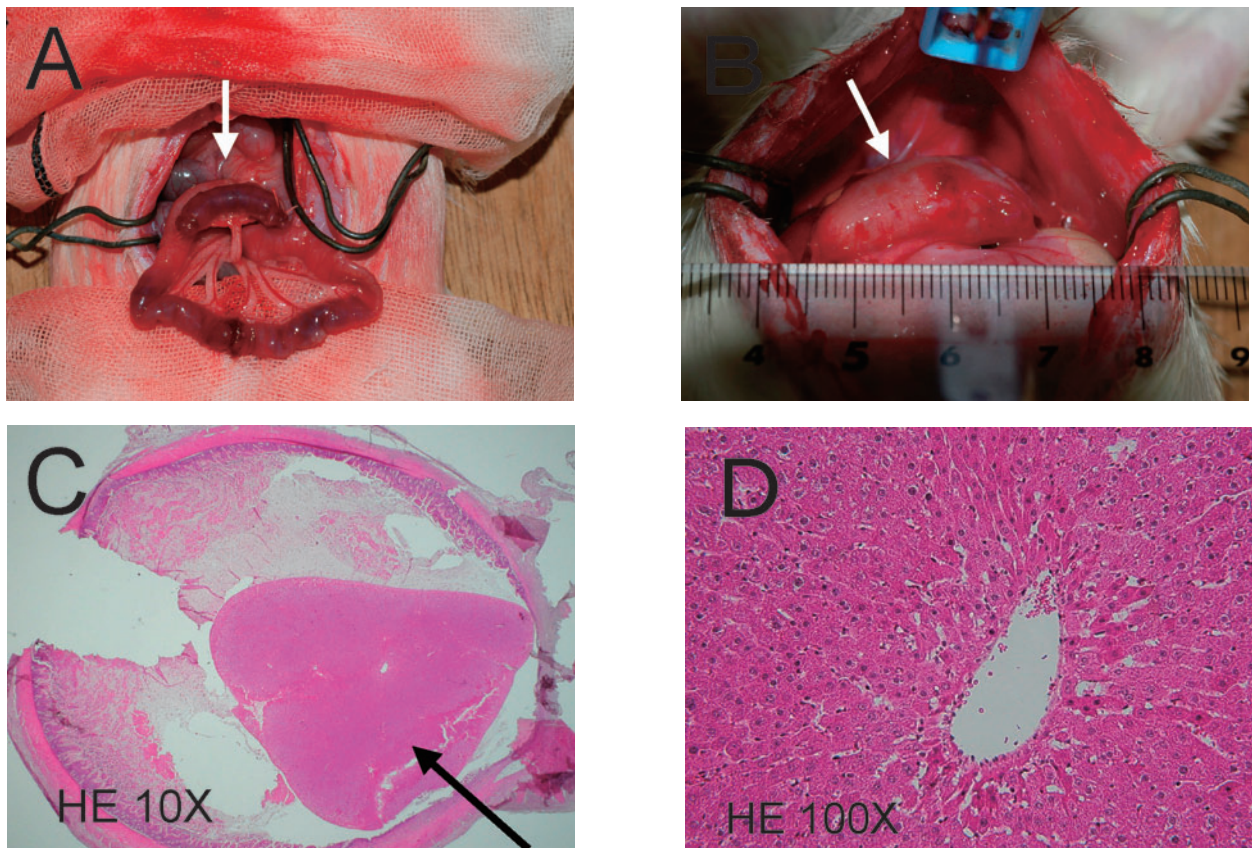


図6 グラフト作成 10 日後摘出例

A: 肝組織片充填腸管グラフト (矢印) と遺残腸管の端々吻合, B: 腫大した腸管グラフト, C: 断面の HE 染色, 肝組織塊の形成と浸出液の貯留, D: HE 染色. きれいな中心静脈と肝小葉構造が認められる.

## 2. 腸管グラフト内肝組織片移植 8日群

図5は肝組織片を腸管グラフト内に充填して8日目にそれを摘出したものである。図5-Aは肝組織片を充填したグラフトを肝中葉に接着して固定したところである。これにより腸管グラフトの捻転を予防することが出来る。また、癒着した肝から腸管グラフト内への血管新生も期待しておこなわれた。図5-Bは摘出した腸管グラフトをホルマリン固定した後のものである。固く腫大しているのが認められる。図5-Cはその断面をHE染色したものであるが充填した肝組織が腸管グラフト内腔一杯に充満しているのが認められる。図5-Dはその組織像であるが肝細胞索構造が形成されているのが認められる。

## 3. 腸管グラフト内肝組織片移植 10日群

図6は肝組織片を腸管グラフト内に充填して10日目にそれを摘出したものである。図6-Aは肝組織片を充填した腸管グラフトとグラフトを摘出した後の空腸を端々吻合したところである。図6-Bは10日目の腸管グラフトを示すが大きく緊満して腫大している。図6-Cはその断面のHE染色像である。増大した腸管グラフトのなかに肝組織塊が形成されているがグラフト腸管壁との間に浸出液が貯留していた。図6-Dはその組織像であるが中心静脈に向かって放射状に肝細胞索が形成されているの

が認められる。

## 4. 腸管グラフト内肝組織片移植 30日群

図7は肝組織片を腸管グラフト内に充填して30日目にそれを摘出したものである。図7-Aは肝組織片を充填した腸管グラフトとグラフトを摘出した後の空腸を端々吻合したところである。この例では腸管グラフトに貯留してくる粘液(浸出液)を排出することをねらってグラフトに3個の針穴を開けてみた。図7-Bは30日後にグラフトに癒着した大網を剥離したのち、グラフトを露出したものである。腸管グラフトを栄養する腸間膜動静脈の枝が太くなりよく発達しているのが分かる。図7-Cはその固定標本の断面をHE染色したものである。移植後30日経過しているにもかかわらずグラフト内には肝組織様の部分が多く充満している。驚いたことにこの例では充填した肝組織の一部がグラフトの腸管壁内に浸潤し増殖しているのが認められた。図7-Dはグラフトの腸管壁内に浸潤した肝組織の拡大像である。腸管壁の中に癌の浸潤のように伸展しているのが認められる。

## 5. 腸管グラフト内肝組織片移植 40日群

図8は肝組織片を腸管グラフト内に充填して40日目にそれを摘出したものである。図8-Aは肝組織片を充填



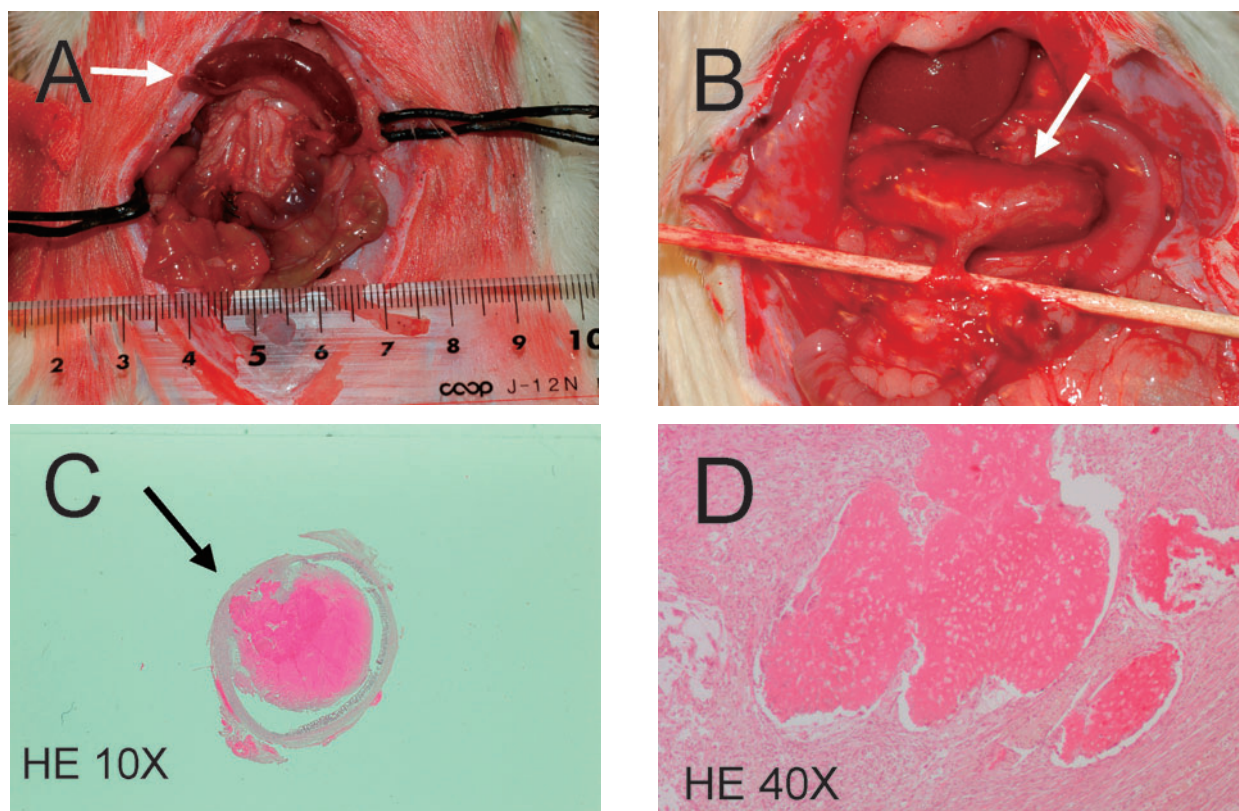


図7 グraft作成 30日後摘出例

A: 肝組織片充填腸管グラフト (矢印) と遺残腸管の端々吻合, B: 腫大した腸管グラフト (矢印) と増大した栄養動静脈, C: 充填肝組織の腸管グラフト壁への浸潤 (矢印), D: 腸管グラフト壁へ浸潤した充填肝組織, 肝細胞索が認められる.

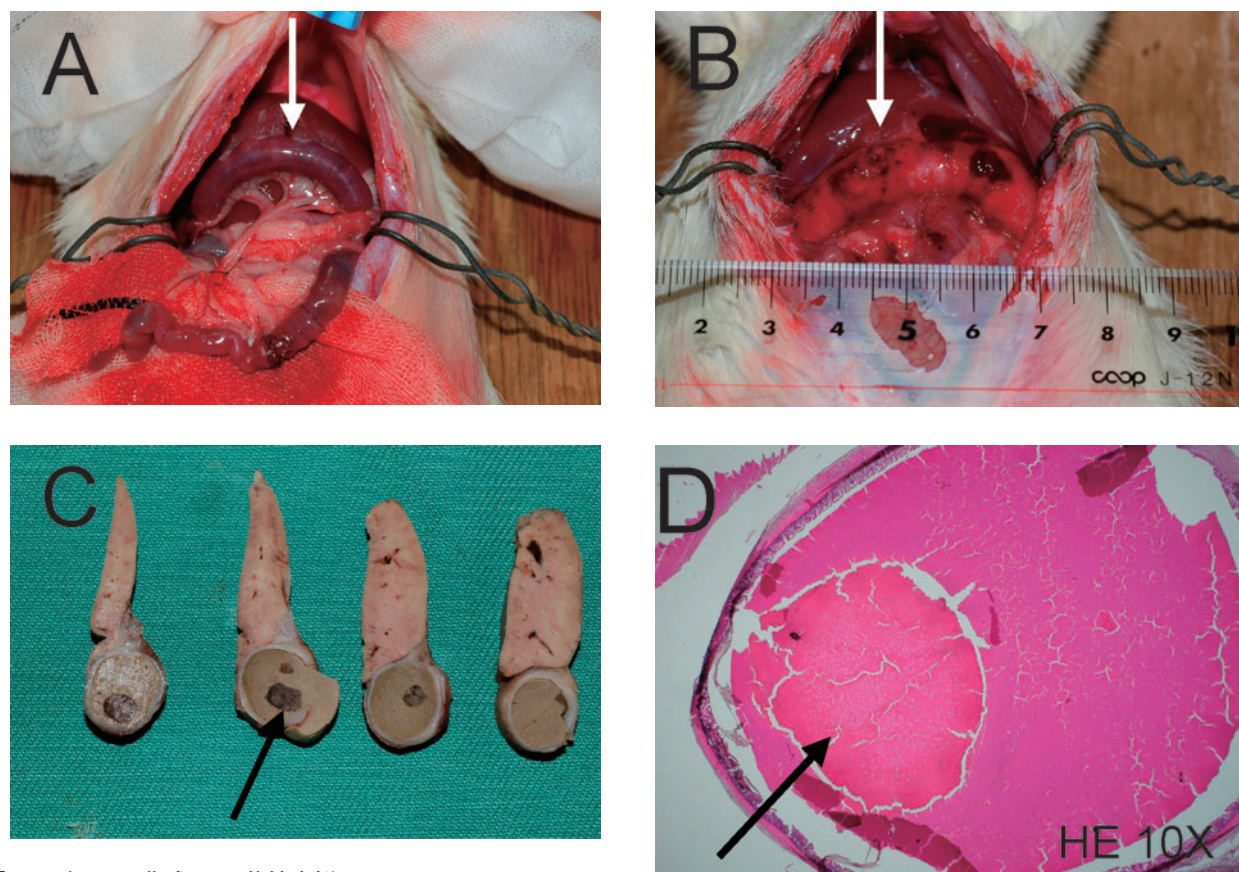


図8 グraft作成 40日後摘出例

A: 肝組織片充填腸管グラフト (矢印) と遺残腸管の端々吻合, B: 腫大した腸管グラフト (矢印), C: フォルマリン固定された肝組織片充填腸管グラフトの剖面. 充填した肝組織が一部遺残している. D: 剖面の HE 染色, 遺残肝組織 (矢印) には明らかな肝小葉構造は認められない.



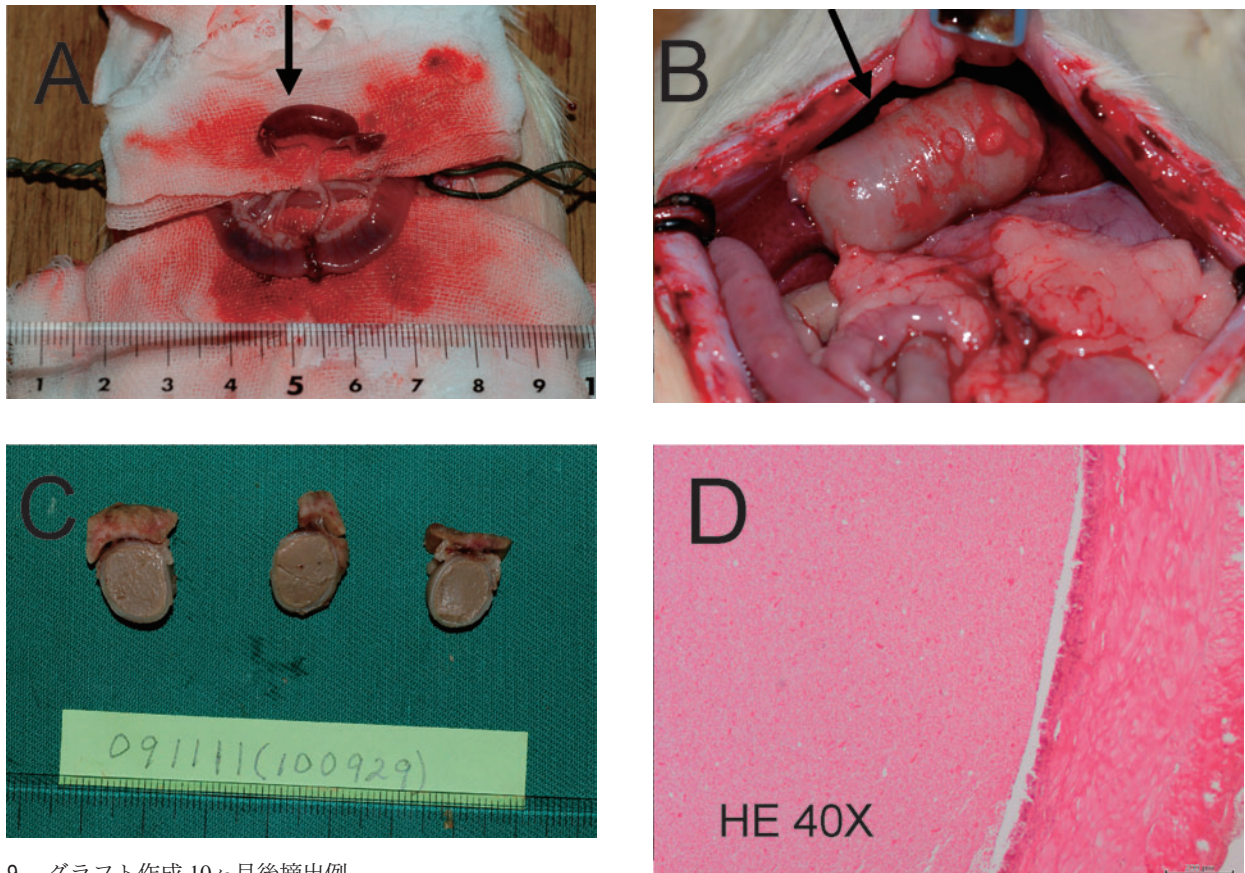


図9 グラフト作成 10ヶ月後摘出例

A: 肝組織片充填腸管グラフト (矢印) と遺残腸管の端々吻合, B: 大きく腫大した腸管グラフト (矢印), C: フォルマリン固定された肝組織片充填腸管グラフトの断面. 肝組織は全く遺残していない. D: HE 染色, 肥厚した腸管グラフト壁と充填した壊死物質.

した腸管グラフトとグラフトを摘出した後の空腸を端々吻合したところである. 図8-Bは40日後にグラフトに癒着した大網を剥離したのち, グラフトを露出したものである. グラフトは長さ, 太さとも著明に増大している. 図8-Cはその固定標本の断面を示す. 腸管グラフト内は大部分が灰黄色の壊死物質様のもので満たされ, 中に, 肝組織様の塊が遺残している. 図8-Dはその固定標本の断面をHE染色したものである. 断面で肝組織様に見える部分には変性した肝の索状構造様のものが遺残していたが核も認められず, 既に壊死に陥りつつあることを示していた. その他の部分には泥状の物質が充填していて, 一度腫大した肝組織が壊死に陥ったことを推測させた.

## 6. 腸管グラフト内肝組織片移植 10ヶ月群

図9は肝組織片を腸管グラフト内に充填して10ヶ月目にそれを摘出したものである. 図9-Aは肝組織片を充填した腸管グラフトとグラフトを摘出した後の空腸を端々吻合したところである. 図9-Bは10ヶ月後にグラフトに癒着した大網を剥離したのち, グラフトを露出したものである. 腸管グラフトは長さ, 特に太さが著明に増大し繭玉状を呈していた. 図9-Cはその固定標本の断面を示す. 腸管グラフト内は全て灰黄色の壊死物質様のもので満たされ, 肝組織様の塊の遺残を全く認めない. 図

9-Dはその固定標本の断面をHE染色したものである. 断面で壊死組織様に見える部分には泥状の物質が充填していた. 強拡大で見ると核を持った生細胞が散在していたがどのような細胞であるか判定は出来なかった.

## 考 察

肝細胞を生体に移植して補助肝臓を作成する試みは本邦では水戸らによる脾内肝細胞移植の研究<sup>4</sup>を嚆矢とするが, これまでに前眼房, 腎被膜下, 腹腔内, 腸間膜脂肪織, 腹壁皮下など20個所以上の部位への肝細胞移植が試みられてきた(図10).<sup>5</sup> 近年, その肝細胞移植法にも工夫が凝らされ, 不活化処置を施した肝細胞の移植,<sup>6</sup> 増殖力と多分化能を有する肝の幹様細胞の移植,<sup>7</sup> 胚性幹細胞を肝細胞に分化させ, それを特殊コーティングした人工膜の袋に充填し, それを皮下に移植,<sup>8</sup> 肝細胞を特殊コーティングした人工膜に播種し, あらかじめ皮下に埋め込んでおいたvascularizationを促す処置を施したプレートを引き抜いたところにそれを移植,<sup>9</sup> などの方法が行われて効果を上げてきている. しかし, 脾臓内移植法は移植される肝細胞の量が限定され充分量の移植が出来ないきらいがある. また, 皮下移植法に関しては我々もラットに腹壁皮下に肝細胞を移植して長径10mmの肝細胞塊を形成させることに成功させてきたが, これでも大き

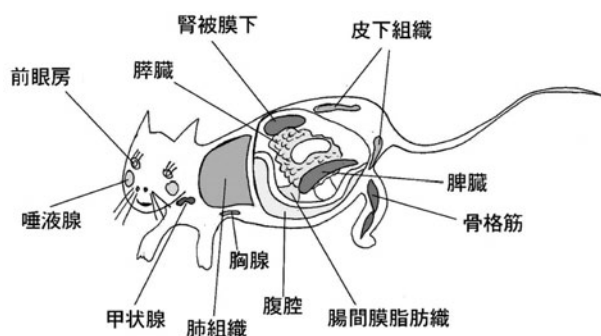


図10 肝細胞の各種移植部位. いろいろな部位に移植が試みられてきている.

さとしては不十分であると考えている. また, 移植肝細胞の増殖には門脈血の関与が必要であるとされており,<sup>10</sup> 皮下移植法は生体に与える影響が小さく簡便であるという利点があるがこの点が弱点となっている.

ところが2003年, 2004年にGuputa等はラット小腸グラフトを作成しその粘膜を削り取る, また, その同一ラットの肝左葉を切除し, これをメスで1mm<sup>3</sup>以下にミンチする, そしてミンチした肝組織片を粘膜を削除した小腸グラフトに充填し適当な間隔をあけて42日後まで観察するという補助肝臓作成に関する興味ある実験を報告した. 彼らの実験ではグラフト内に充填された肝組織片は42日後まで肝の小葉構造を保って生着し肝臓に関連する多くの遺伝子を発現していた. また, その移植肝組織片には新たに栄養血管が新生していたという. この方法では肝細胞移植法に比べると遙かに大量の肝組織片の移植が可能であり, 肝の立体的小葉構造も形成されるので補助肝臓として有望であると考えられた. また, Guputa等はこの方法を用いれば図11のように肝組織片以外の機能細胞の移植も可能であり遺伝子欠損病の治療にも応用可能であると報告している.<sup>2,3</sup>

著者等も彼らの実験を追試してみたが今回報告したように小腸グラフトはviableで大きく腫大するのが認められたが充填した肝組織片は40日後には大部分が壊死におちいり遺残している肝組織片はグラフト容積に比べると僅かなものになってしまっていた. それでもグラフトそのものが腫大しているので体積としては充填した時の肝組織片とほぼ同量の肝組織が遺残しているものと思われた. これは分節腸管内に充填した肝組織片が移植後, 10日前後までは急速に増殖するが, その後はその増殖した肝組織を支えるだけの血流が発達しないために壊死に陥ってしまったのではないかと推測した.

## 結 語

肝組織片充填有茎腸管グラフト法は大量の肝組織片を一度に移植することができ補助肝臓として有望な方法で

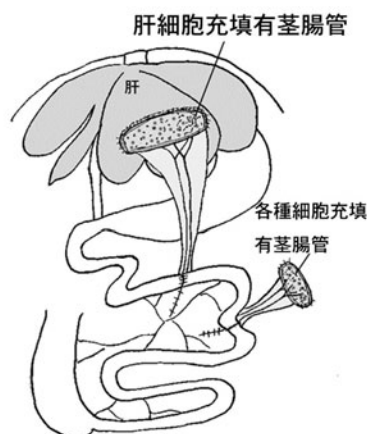


図11 有茎腸管内機能細胞充填概念図; 有茎腸管グラフトは複数作成可能であり, それぞれに様々な細胞を充填し機能を発揮させることも可能である.

あると考えられる. しかし, 腸管グラフト内に充填した肝組織片の増殖に見合う血流をどのように維持するのかが課題が残っている. それに関して著者等は腸管グラフト内への大網の共充填, 脾臓の接着, 遺残肝臓の接着等の方法を考えているがその結果は第2報で報告する予定である.

## 謝 辞

本研究は群馬大学動物実験委員会の承認の元に群馬大学医学系研究科動物実験施設で行われた. また, 科学研究費 (挑戦的萌芽研究 21659314, 2365936) の補助金によって行われた.

## 文 献

1. Strain AJ, Neuberger JM. A bioartificial liver-state of the art. *Science* 2002; 295(5557): 1005-1009.
2. Berishvili E, Liponava E, Kochlavashvili N, et al. Heterotopic auxiliary liver in an isolated and vascularized segment of the small intestine in rats. *Transplantation* 2003; 75(11): 1827-1832.
3. Joseph B, Berishvili E, Benten D, et al. Isolated small intestinal segments support auxiliary livers with maintenance of hepatic functions. *Nat Med* 2004; 10(7): 749-753.
4. Mito M, Ebata H, Kusano M, et al. Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation* 1979; 28(6): 499-505.
5. Gupta S. Hepatocyte transplantation: novel applications. In: Strain AJ, Diehl AM.(eds). *Tissue engineering, stem cells, and gene therapies*. Chapman & Hall London 1998: 577-607.
6. Ohashi K, Park F, Kay MA. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application. *J Mol Med (Berl)* 2001; 79(11): 617-630.

7. Shibata C, Mizuguchi T, Kikkawa Y, et al. Liver re-population and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation. *Liver Transpl* 2006 ; 12(1) : 78-87.
8. Soto-Gutiérrez A, Kobayashi N, Rivas-Carrillo JD, et al. Reversal of mouse hepatic failure using an implanted liver-assist device containing ES cell-derived hepatocytes. *Nat Biotechnol* 2006 ; 24(11) : 1412-1419.
9. Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, et al. Engineering functional two- and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* 2007 ; 13(7) : 880-885.
10. de Jonge J, Madern GC, Terpstra OT, et al. Directing portal flow is essential for graft survival in auxiliary partial heterotopic liver transplantation in the dog. *J Pediatr Surg* 1999 ; 34(8) : 1265-1268.

## Development of an Auxiliary Liver Using a Small Intestinal Segment Packed with Liver Microfragments

Kimitaka Kogure,<sup>1</sup> Masatoshi Ishizaki,<sup>2</sup> Masaaki Nemoto,<sup>3</sup>  
Hiroyuki Kuwano,<sup>4</sup> Itaru Kojima,<sup>1</sup> Hiroki Isomura,<sup>5</sup>  
Hiroo Hoshino<sup>6</sup> and Masatoshi Makuuchi<sup>7</sup>

- 1 Laboratory of Cell Physiology, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, Graduate School of Medicine, 3-39-15 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8512, Japan
- 2 Public Fujioka General Hospital, 942-1 Fujioka, Fujioka, Gunma 375-8503, Japan
- 3 Hokumou Hospital, 237-1 Arima, Shibukawa, Gunma 377-0005, Japan
- 4 Department of General Surgical Science (Surgery I), Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan
- 5 Department of Hygiene, Gunma University Graduate School of Medicine, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan
- 6 Advanced Scientific Research Leaders Development Unit of Gunma University, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511 Japan
- 7 Japanese Red Cross Medical Center, 4-1-22 Hiroo, Shibuya, Tokyo 150-8935, Japan

**Objective :** Liver transplantation is an effective method for the treatment of hepatic failure, but donor shortage remains problematic. This study was conducted to develop an effective auxiliary liver capable of compensating for the donor shortage. **Design :** Male Wistar rats (300–400g) were used. A jejunal segment (2–3 cm) was isolated together with a feeding pedicle. After the removal of the mucosa, the intestinal segment was filled with liver microfragments obtained from the left liver of the same individual rat. Groups of 3–5 rats were killed at various intervals and the viability of the liver graft was analyzed histologically. **Results :** Within 10 days after transplantation, the confluence of the transplanted liver tissue was restored and the tissue exhibited a normal hepatic architecture. However, the confluent and enlarged liver tissue gradually became necrotic, and nearly 70% of the liver tissue had been lost at 40 days after transplantation. After 10 months, almost all the liver tissue had become necrotic, although the intestinal segment remained viable. **Conclusions :** This method has the potential to construct an effective auxiliary liver ; however, further improvement to obtain sufficient blood flow will be required to maintain the transplanted liver tissue. (*Kitakanto Med J* 2013 ; 63 : 133~140)

**Key words :** liver failure, auxiliary liver, small intestinal segment