特集14

小腸移植における外来性神経再生の検討と外来性

神経温存移植手技の開発

愛媛大学第1外科

清地	秀典	小野	敦美	宮城	和富	山本	成尚
大西	克幸	嶌原	康行	小林	展章		

小腸移植後の機能障害の大きな原因の1つに通常の移植手技では避けることのできないグラフトの 外来性神経の遮断がある。今回我々はラット小腸移植後の外来性交感神経の再生をグリオキシル酸蛍 光組織化学法を用いて形態的に検討し、さらに外来性交感神経を温存したままグラフトとともに移植 する新しい移植手技を開発した。交感神経の再生は移植後3週目に動脈吻合部に始まり、腸間膜動脈 にそって順次末梢へ進展し、移植後1年目には腸間膜動脈において約70~80%の神経再生が認められ た。しかしながら、腸管機能により重要な役割をはたす腸管壁の交感神経の再生はようやく15週目に 始まったものの、1年目においてすらその密度はかなり低いものであった。これに対し我々が考案し た神経温存モデルにおいては3週目に腸間膜動脈で約75~90%の温存された神経が認められ、腸管壁 においては1週目よりほぼコントロールと変わらないほど十分な神経が温存された。

Key words: intestinal transplantation, extrinsic nerve reinnervation, extrinsic nerve preservation

はじめに

小腸移植は移植後の激しい拒絶反応や完全経静脈栄 養法(以下, TPN)の発達により,長い間顧みられる ことがなかった。しかし近年、移植外科および免疫抑 制法が進歩し、長期 TPN 時の肝機能障害などの合併 症が問題になってきたことから、再び注目されるよう になり,臨床においても長期グラフト生着例が報告さ れるようになってきた1). これに伴い, 移植後のグラフ ト機能障害が問題になってきている。この機能障害の 大きな原因の1つに小腸移植後のグラフトの神経障害 がある.この神経障害には、(1)低温、低酸素、再灌 流障害,拒絶反応などによる内在性神経の障害,(2)腸 管切断による、口側から肛門側へ伝わる腸管壁に添っ た神経刺激伝導の障害、(3) グラフト摘出による外来 性神経の断裂,の3つの側面がある。(1)に関して、グ ラフトとともに移植された内在性神経は移植後一時障 害されるものの、機能的にも形態的にもほぼ完全に回

*第46回日消外会総会シンポ2・臓器移植の現況と21 世紀への展望

<1995年12月6日受理>別刷請求先:清地 秀典 〒791-02 愛媛県温泉郡重信町志津川 愛媛大学医学 部第1外科

復し,移植小腸の基本的な運動,吸収は保たれ2)3),(2) に関しても一時障害されるものの、時間が経過するに したがって吻合部を越えて再構築されることが報告さ れている⁴. (3)に関しては臨床での小腸移植におい て、これが原因と思われる胃内容物の停滞、腸管通過 時間の異常が指摘されい、実験的にも外来性神経の遮 断は腸管運動3,吸収5,腸内細菌叢6,胆汁酸分泌7な どに影響を及ぼすと報告されている、しかしその回復 に関しては,移植後1年目以後に腸管壁で形態的に再 生が認められ始めたとする報告⁸⁾が散見されるように なってきたものの詳細は明らかではない。今回我々は ラットを用いて小腸移植後の外来性神経の再生を外来 性神経である交感神経を経時的に染色することによ り,形態的に観察,検討を行い(実験①),さらに外来 性交感神経を温存したままグラフトとともに移植する 新しい移植手技を開発した(実験②)。

方 法

実験動物:体重250~300g雄性Lewis ラット (Lew, RT1[!], Charles River Japan Inc.)をドナーお よびレシピエントとする同系小腸移植を行った.

移植手技:麻酔はペントバルビタール (50mg/kg body weight)腹腔内投与にて行い,必要に応じてエー

Fig. 1 Schematic representation of the operative procedures: (A) the extrinsic denervation model (DN model); note the division of axons of the sympathetic postganglionic nerve, and (B) the extrinsic nerve preservation model (NP model); note the preservation of the graft superior mesenteric ganglion (SMG) and axons of the sympathetic postganglionic nerve. The shaded portions are the grafts. Samples were obtained from six portions of the graft; 1) the proximal superior mesenteric artery (PSMA), 2) the distal superior mesenteric artery (DSMA), 3) the proximal jejunal artery (PJA), 4) the distal jejunal artery (DJA), 5) the straight artery entering the jejunal wall (SAE) and 6) the submucosal artery in the jejunal wall opposite the mesenteric attachment (SAO).



テル吸入にて麻酔を維持した.

実験①;外来性神経再生を検討するため、外来性神 経が完全な除神経となるモデル(extrinsic denervation model;以下, DN model)を用いた。このモデ ルにおいては外来性神経の軸索を断裂させる目的で, 上腸間膜動静脈の末梢部を血管茎として用いた(Fig. 1).

実験②:大動脈前面の上腸間膜動脈起始部に存在す る上腸間膜動脈神経節(以下 SMG)に由来する交感神 経節後神経を温存し、グラフトとともに移植するモデ ル (extrinsic nerve preservation model;以下, NP model)を考案した.大動脈カフ付きの上腸間膜動脈お よび門脈を血管茎として用い、大動脈カフ前面に SMG を損傷することなく付着させたまま、また SMG より分枝する軸索の通り道である腸間膜動脈周囲組織 を損傷しないよう温存しつつ愛護的にグラフトを摘出 した。

両モデルとも血管茎はレシピエントの大動脈,下大 静脈におのおの異所性に端側吻合した.移植腸管は空 腸40cm 長とし,レシピエント回腸を40cm 切除した部 位に1期的に吻合した(Fig. 1).

組織学的検討:実験①においては移植後1,3,6, 9,15,27週目および1年目に,実験②においては1, 3週目に各群6匹ずつラットを犠牲死させ,グラフト

Weeks after transplantation	PSMA	DSMA	РЈА	DJA	
1W(n=6)	0	0	0	0	
3W(n=6)	17.7 ± 3.9	6.6±4.4	4.9 ± 4.0	0	
6W(n=6)	30.6 ± 6.3	25.9±5.7	22.6±8.0	7.2±5.8	
9W(n=6)	42.5 ± 4.0	38.3 ± 5.1	38.6 ± 7.5	30.3 ± 11.1	
15W(n=6)	49.5 ± 7.4	47.8 ± 8.1	48.1±11.1	47.2 ± 6.4	
27W(n=6)	72.8 ± 8.5	68.8 ± 7.6	64.9 ± 6.1	66.0 ± 17.0	
1Y(n=6)	82.8 ± 10.8	69.9 ± 9.7	69.2±8.9	70.6 ± 14.7	

% of control; mean \pm S.D. Abbreviations: PSMA, proximal superior mesenteric artery; DSMA, distal superior mesenteric artery; PJA, proximal jejunal artery; DJA, distal jejunal artery; SAE, straight artery entering the jejunal wall; SAO, submucosal artery in the jejunal wall opposite the mesenteric attachment.

およびレシピエント空腸より6か所 [腸間膜動脈より 4か所 {上腸間膜動脈中枢側(以下, PSMA),同末梢 側(以下, DSMA),空腸動脈中枢側(以下, PJA), 同末梢側(以下, DJA)},腸管壁より2か所 {腸管壁 間膜側(以下, SAE),同間膜対側(以下, SAO)}]標 本を採取し(Fig. 1),グリオキシル酸蛍光組織化学 法⁹⁾を用いて,交感神経線維のノルアドレナリンを染 色し観察した.さらに各標本の任意の6視野より神経 線維をトレースし,画像解析装置(Luzex III, Nireco Corp., Tokyo, Japan)を用いて総長を計測,6視野 の平均値をとり,レシピエント空腸をコントロールと した形態的神経支配率を算出した.

結果および考察

実験①:DN model の腸間膜動脈 4 か所における神 経支配率すなわち神経再生率は Table 1 のごとくで, 腸間膜動脈,腸管壁,各標本における再生率を6 段階 に分けると Table 2 のごとくであった.

DN model において交感神経線維は,移植後1週目 にはいずれの部位にも認められなかった(**Table 1, 2, Fig. 2**). 腸管を支配する交感神経のノルアドレナリン は除神経後5日目までに消失することが報告されてお り¹⁰⁾,本モデルにおいてグラフトの交感神経は完全に 除神経され,1週目の時点では再生はまだ始まってい ないことが示された.移植後3週目に吻合部に近い腸 間膜動脈(PSMA,DSMA,PJA)においておのおの 17.7±3.9%,6.6±4.4%,4.9±4.0%(mean±SD) の神経再生が認められ始めた(**Table 1, Fig. 2**). 厳 密に言えば,この時点でグラフトはすでに形態的にレ

 Table 2
 Grade of density of reinnervated sympathetic nerve fibers of extrinsic denervation model

Weeks after transplantation	PSMA	DSMA	PJA	DJA	SAE	SAO
1W(n=6)	-	-		-	-	-
	-	-	-		-	-
	-	-	-	-	_	-
	<u></u>	-	_	_	-	
	-	-			-	_
	-	-	-	-		-
3W(n=6)	+	±	-	-	- 1	_
	±	±	±	-	-	-
	+	-	<u>+</u>	-		_
	+	±	±	-	-	-
	+	±	±			-
	+	±	±	-	-	—
6W(n=6)	++	+	+	-	-	
	++	+	+	±	-	-
	++	++	+	±	-	-
	++	+	++	±	- 1	-
	+	++	++	±	- 1	
	++	++	++	±	-	-
9W(n=6)	++	++	#	+	- 1	
	++	++	++	+	-	-
	++	++	++	++		-
	-++-	++	++-	++	-	
	++	++	++	++	-	-
	++	++	++	++	-	-
15W(n=6)	#	++	##	++	-	
	+++	++	+!!	++	-	-
	++	++	++	++	±	-
	+++	+++	++	++	±	-
	++	++	#	+++	±	
	+++	+++	+++	+#	±	—
27W(n=6)	+++	+++	+++	+++	±	-
	+##	+++	+++	++	±	-
	++++	+++	+++	++++	±	_
	+++	+++	-+++	++++	+	—
	+++	+++	+#+	++++	+	
137(n-6)	++++	 		++++	+	±
1 Y (n=6)	+++	+++	+++	+#+	±	_
	111)	#11	+++	+++	±	-
	###	****	+++	+++	±	-
	****	###	+++	++++	±	_
	+++	111	+++	+++	+	-
	tttt		+H+	++++	+	±

Grade: -, negative staining; \pm , staining only in some fields; +, staining in every field<25% of control; ++, \geq 25%, <50% of conreol; ++, \geq 50%, <75% of control; +++, \geq 75% of control. Abbreviations: PSMA, proximal superior mesenteric artery; DSMA, distal superior mesenteric artery; PJA, proximal jejunal artery; DJA, distal jejunal artery; SAE, straight artery entering the jejunal wall; SAO, submucosal artery in the jejunal wall opposite the mesenteric attachment. Fig. 2 Fluorescent photomicrographs showing the glyoxylic acid induced noradrenalin containing perivascular sympathetic nerve fibers in the whole-mount stretch preparation of the proximal superior mesenteric artery (PSMA) in the extrinsic denervation model (DN model). (a) No sympathetic nerve fiber was recognized 1 week after intestinal transplantation. (b) Three weeks after transplantation, a few nerve fibers began to appear. (c) About 83% of control nerve fibers were found to reinnervate 1 year after transplantation. (d) Control.



Fig. 3 Fluorescent photomicrographs showing perivascular sympathetic nerve fibers in the whole-mount preparation of the distal jejunal artery (DJA) in the extrinsic denervation model (DN model). (a) No sympathetic nerve fiber was observed up to 3 weeks after intestinal transplantation. (b) Six weeks after transplantation, fibers began to be recognized. (c) About 70% of control nerve fibers were found to reinnervate 1 year after transplantation. (d) Control.



シピエントの交感神経支配を受けているといえる。以後、神経線維は6,9,15,27週,1年目と順次神経

Fig. 4 Fluorescent photomicrographs showing sympathetic nerve fibers in the preparation of the straight artery entering the jejunal wall (SAE) in the extrinsic denervation model (DN model). (a) No sympathetic nerve fiber was observed up to 9 weeks after intestinal transplantation. (b) Fibers began to be recognized 15 weeks after transplatation. (c, d) Density of reinnervated fibers at 1 year was rather sparse compared with the control.



Fig. 5 Fluorescent photomicrographs showing perivascular sympathetic nerve fibers in the whole-mount preparation of the proximal superior mesenteric artery (PSMA) and the submucosal artery in the jejunal wall opposite the mesenteric attachment (SAO) 3 weeks after transplantation in the extrinsic nerve preservation model (NP model). (a, b) About 80% of control nerve fibers were preserved and transplanted in PSMA. (c, d) Density of preserved nerve fibers in SAO was almost identical to the control level.



支配率を増やしつつ,腸間膜動脈にそって中枢側から 末梢側へ血管伴行性に進展し,移植後1年目には腸間 膜動脈 (PSMA, DSMA, PJA, DJA) においておの

Weeks after transplantation	PSMA	DSMA	РЈА	DJA	SAE	SAO
1W(n=6)	49.5±14.0	59.3 ± 9.8	64.6±10.7	85.9±12.0	98.1 ± 10.3	107.8 ± 18.6
3W(n=6)	79.6 ± 6.9	79.9 ± 8.9	75.1±9.2	92.0 ± 4.7	96.7 ± 22.7	102.6 ± 15.5

 Table 3 Sympathetic innervation rate of extrinsic nerve preservation model

% of control; mean±S.D. Abbreviations: PSMA, proximal superior mesenteric artery; DSMA, distal superior mesenteric artery; PJA, proximal jejunal artery; DJA, distal jejunal artery; SAE, straight artery entering the jejunal wall; SAO, submucosal artery in the jejunal wall opposite the mesenteric attachment.

おの82.8±10.8%, 69.9±9.7%, 69.2±8.9%, 70.6± 14.7%の神経再生が認められた(**Table 1, Fig. 2, 3**). 吻合部近傍の陽間膜動脈 (PSMA) における神経再生 は 3 週目に認められ始め, 6 週目で約30%, 27週目で 約70%であった (**Table 1, Fig. 2**). この結果は以前 に報告のあるラット陽間膜動脈単純除神経後の除神経 部近傍における交感神経再生の結果¹⁰とほぼ同じで あった.本実験のように異所性の移植においても, 腸 間膜動脈に関しては単純除神経後と同様な神経再生が なされることが示された.

これに対し,腸管壁 (SAE, SAO) に関してはよう やく15週目に SAE の一部の視野で神経線維が認めら れ始めたものの,27週目においても SAE の半数の標 本は一部の視野に線維が認められたのみであり,全視 野で認められたものでもその密度は25%以下と低いも のであった.また SAO では,わずかに1標本の一部の 視野に再生が認められたのみであった.さらに腸管壁 における神経再生は1年経過しても27週目と同様で増 加が認められなかった (Table 2, Fig. 4).これらの 結果より腸管機能に影響を及ぼす腸管壁における交感 神経の再生は27週目が限界で,かつ十分にはなされえ ないと思われ,このことは移植腸管が機能的に長期に わたり,外来性除神経状態が続くという報告®に一致 すると思われた.

実験②:NP model における神経支配率すなわち神 経温存率は **Table 3**のごとくであった。

実験①より腸管壁における交感神経の再生が十分に なされえなかったことから,SMGに由来し,腸管を支 配する交感神経節後神経細胞¹¹⁾を,内在性神経の場合 と同様に神経細胞全体を温存しグラフトとともに移植 することができないかと考え,NP model を考案した. NP model においては DN model において完全な除 神経状態であった移植後1週目からすべての部位で神 経線維が認められ,交感神経がこのモデルによって温 存,移植されることが示された(Table 3).移植後3 週目には腸間膜動脈 (PSMA, DSMA, PJA, DJA) でおのおの79.6±6.9%, 79.9±8.9%, 75.1±9.2%, 92.0±4.7%と DN model において1年かけて再生が なされる以上の神経支配がなされ,特に腸管機能に影 響を及ぼす腸管壁 (SAE, SAO) においては96.7± 22.7%,102.6±15.5%とコントロールと変わらない十 分な神経が温存された (Table 3, Fig. 5). このよう に温存,移植された神経細胞がうまくレシピエントの 神経系と連結することができるかどうかは不明である が,実験①より動脈吻合部近傍 (PSMA) における神 経再生は移植後1年目に80%以上なされたことから, 連結する機会は十分にあると思われ,もし連結するこ とができれば NP model によって小腸移植後早期の 交感神経の機能回復が期待できると思われた.

献

 Todo S, Tzakis AG, Abu-Elmagd K et al: Intestinal transplantation in composite visceral grafts or alone. Ann Surg 216: 223-234, 1992

文

- Hirose R, Taguchi T, Hirata Y et al: Patterns of enteric nervous distribution after small bowel transplantation. Transplant Proc 24: 1108-1109, 1992
- Quigley EMM, Spanta AD, Rose SG et al: Long-term effects of jejunoileal autotransplantation on myoelectrical activity in canine small intestine. Dig Dis Sci 35: 1505–1517, 1990
- 4) Galligan JJ, Furness JB, Costa M: Migration of the myoelectric complex after interruption of the myenteric plexus: Intestinal transection and regeneration of enteric nerves in the guinea pig. Gastroenterology 97: 1135–1146, 1989
- 5) Watson AJM, Lear PA, Montgomery A et al: Water, electrolyte, glucose, and glycine absorption in rat small intestinal transplants. Gastroenterology 94: 863-869, 1988
- 6) Thompson JS, Rose SG, Spanta AD, Quigley EMM: The long-term effect of jejunoileal autotransplantation on intestinal function. Sur-

gery 111:62-68, 1992

- Soper NJ, Sarr MG, DiMagno EP et al: Effect of jejunoileal autotransplantation (extrinsic denervation) on postprandial pancreatobiliary secretion. Surg Forum 40: 168-170, 1989
- Sugitani A, Reynolds JC, Tsuboi M et al: Extrinsic reinnervation of the intestine after small bowel autotransplantation in dogs. Transplant Proc 26: 1640-1641, 1994
- Furness JB, Costa M: The use of glyoxylic acid for the fluorescence histochemical demonstration of peripheral stores of noradrenaline

and 5-hydroxytryptamine in whole mounts. Histochemistry **41**: 335-352, 1975

- Hill CE, Hirst GDS, Ngu MC et al: Sympathetic postganglionic reinnervation of mesenteric arteries and enteric neurones of the ileum of the rat. J Auton Nerv Syst 14: 317-334, 1985
- Costa M, Furness B, Llewellyn-Smith IJ: Histochemistry of the enteric nervous system. Edited by Johnson LR. Physiology of the gastrointestinal tract. 2nd edition. Raven Press, New York, 1987, p1-40

Extrinsic Reinnervation and Extrinsic Nerve Preservation on Intestinal Transplantation in Rats

Hidenori Kiyochi, Atsumi Ono, Kazutomi Miyagi, Naritaka Yamamoto, Katsuyuki Ohnishi, Yasuyuki Shimahara and Nobuaki Kobayashi First Department of Surgery, Ehime University School of Medicine

Extrinsic denervation is inevitable after a conventional intestinal transplantation procedure and leads to poor intestinal function. In this study, reinnervation by extrinsic sympathetic nerves was investigated in rats morphologically by a glyoxylic acid fluorescence histochemical method. Further, a new intestinal transplantation procedure, in which extrinsic sympathetic nerves are preserved and transplanted with the intestinal graft, was developed. Reinnervation began in the arterial anastomosis 3 weeks after transplantation and extended from proximal to distal following the course of the mesenteric arteries. Reinnervation by fairly dense sympathetic nerve fibers, about 70 to 80% of the control, was found up to the distal portion of the mesenteric arteries 1 year after transplantation. However, in the intestinal wall itself, although reinnervation began 15 weeks after transplantation, the density of reinnervating fibers was rather low even 1 year after transplantation. These results indicate that innervation of the intestinal wall, which plays an important role in graft function, remained poor, while sufficient reinnervation of the mesenteric arteries took place. In contrast, in our new experimental method, in which sympathetic postganglionic nerves remain attached to the intestinal graft, about 75 to 90% of control sympathetic nerve fibers were preserved and transplanted in the mesenteric arteries 3 weeks after transplantation and the innervation of arteries in the intestinal wall was almost identical to the control level from 1 week after transplantation. Recovery of the sympathetic function may be achieved early on, if the grafted sympathetic nerves become appropriately connected to the recipient's nervous system.

Reprint requests: Hidenori Kiyochi First Department of Surgery, Ehime University School of Medicine

Shitsukawa, Shigenobu-cho, Onsen-gun, Ehime, 791-02 JAPAN