

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)  
総括研究報告書

小児期からの消化器系希少難治性疾患群の包括的調査研究と  
シームレスなガイドライン作成  
( H24 - 難治等(難) - 一般 - 037 )

研究代表者 田口 智章 国立大学法人九州大学医学研究院 教授

## 研究要旨

### 【研究目的】

消化器系の希少難治性疾患群は、ヒルシュスプルング病類縁疾患（慢性特発性偽性腸閉塞症を含む、以下H類縁と略す）、先天性胆道閉鎖を含む新生児胆汁うっ滞症候群、乳幼児巨大肝血管腫、腹部リンパ管腫、顕微鏡的大腸炎、原因不明小腸潰瘍など、胎児期・新生児期や小児期に発症し成人に至る長期的な経過をたどるものが多い。したがって胎児期、新生児期、乳幼児期、学童期から成人までシームレスな診療が提供できるような、的確な分類に基づく重症度の階層化や診断基準や治療指針を提供するガイドラインの作成が急務とされている。

この研究では、初年度に関連学会を基盤とした全国調査の準備を整え文献的考察を行い、次年度に全国調査の実施と症例の集積と分析を行い、疾患別に重症度による新分類を提唱し、小児から成人へのトランジションを考慮に入れたシームレスな医療を提供できる診断・治療のガイドラインの作成に着手する。さらにすでに登録制度が確立されている胆道閉鎖症をモデルとして、他の疾患の登録システムを発足し、中長期的な追跡調査が可能な登録体制を構築することを目的とする。

### 【研究方法】

消化器系の希少難治性疾患群である、(1)H類縁（慢性特発性偽性腸閉塞症を含む）、(2)先天性胆道閉鎖を含む新生児胆汁うっ滞症候群、(3)乳幼児巨大肝血管腫、(4)腹部リンパ管腫、(5)顕微鏡的大腸炎および原因不明小腸潰瘍各疾患の5つの疾患群に分類し全数把握と診断法と治療に関する調査研究を実施する。

本疾患群はかなり専門的で特殊な疾患のため、本疾患群をとり扱っている関連7学会の代表すべてを分担研究者とし、全数調査および情報交換が容易に行える協力体制を構築する。

さらに疾患横断的に(a)病理学的検討、(b)胎児診断、(c)疾患 iPS 細胞の作成の3つのグループがそれぞれの疾患グループに情報提供や検体の検索を行う。病理は特にH類縁、新生児胆汁うっ滞、胎児診断は胆道閉鎖、新生児胆汁うっ滞症候群、乳幼児巨大肝血管腫、腹部リンパ管腫。iPS 細胞の作成はHおよびH類縁に限定してスタートし可能であれば他の疾患にも広げる。

## 【研究結果】

### 1)H 類縁

一次調査で集計した 353 例の二次調査を督促し、ほぼ全例のデータが集まった。症例数から CIPS と Congenital Hypoganglionosis が二大疾患であることが判明。これらのデータを分担研究者に配布し疾患別の分析を開始。分類についてグループ会議を 1 回開催。

### 2)新生児胆汁うっ滞

胆道閉鎖症についてオンライン登録への移行を計画し準備を行った。また現状にあった疾患分類の改定のためグループ会議を 2 回開催。非胆道閉鎖胆汁うっ滞について実態調査を行うべく各学会の認可を得た。

### 3)巨大肝血管腫

肝血管腫に対する全国調査の準備をすすめ周産期領域まで拡大して調査予定。ガイドライン作成にむけた文献調査・観察研究を進めている。

### 4)腹部リンパ管腫

グループ会議 4 回を経て、前身の「リンパ管腫研究班（平成 21-23 年度）」の調査結果の見直し、文献調査、来年度に実施するアンケート調査の方向性が決定。

### 5)小児顕微鏡的大腸炎、他

当該希少難病の認知が医療者になく邦文成書にも記載がないのが現状であることが明らかになった。本年度は「本疾患と思われる症例の経験の有無」の第一次調査を実施。

#### a)病理学的検討

H 類縁の免疫組織化学染色に関して、胎児期から成人期にかけての正常回腸を用いて、腸管神経叢の経時的変化と、適切な抗体を選別。

#### b)胎児診断例の検討

各疾患の胎児診断・治療の実態を把握するため、文献的考察と全国調査の調査票を作成している。

#### c)疾患特異的 iPS 細胞作成

H 病の 1 家族例 3 名より血液を採取し、エピソーマルベクターを用いて iPS 細胞を樹立しゲノム DNA を網羅的に解析。さらに神経堤細胞へと分化誘導しその遊走能・分化能を比較。

## 【結論】

5 つの疾患別グループおよび 3 つの横断的グループに学会が関連性を保ちながら、全国調査をすすめ、診断基準、重症度分類、治療指針、ガイドライン作成に向けて邁進している。また長期的展望に立って疾患登録と長期フォローアップ体制の構築、患者会との連携や希少疾患に対する患者家族会の立ち上げへの支援、病因解明と新規治療法の開発に向けた疾患特異的 iPS 細胞の樹立の研究に着手した。

## 分担研究者

中島 淳

横浜市立大学附属病院

消化器内科 教授

窪田 昭男

地方独立法人大阪府立病院機構

大阪府立母子保健医療総合医療センター

小児外科 主任部長

福澤 正洋

地方独立法人大阪府立病院機構

大阪府立母子保健医療総合医療センター

総長

松藤 凡

鹿児島大学大学院

小児外科 教授

渡邊 芳夫

あいち小児保健医療総合センター

小児外科 副センター長

金森 豊

国立成育医療研究センター

臓器・運動器病態外科部外科 医長

八木 實

久留米大学医学部

外科学講座小児外科学部門 主任教授

濱田 吉則

関西医科大学附属枚方病院

小児外科 教授

増本 幸二

筑波大学医学医療系

小児外科 教授

牛島 高介

久留米大学医療センター

小児科 准教授

位田 忍

地方独立法人大阪府立病院機構  
大阪府立母子保健医療総合医療センター  
消化器・内分泌科 主任部長

内田 恵一

三重大学医学部附属病院 小児外科  
医療福祉支援センター部長・准教授

中澤 温子

国立成育医療研究センター  
病理診断部・小児病理学 部長

孝橋 賢一

九州大学医学研究院  
腫瘍病理学 助教

中畑 龍俊

京都大学 iPS 細胞研究所・再生医学  
副所長・特定拠点教授

家入 里志

九州大学大学病院  
小児外科 講師

仁尾 正記

東北大学大学院医学系研究科  
小児外科学分野 教授

松井 陽

国立成育医療研究センター  
(小児科学、小児肝臓学) 病院長

安藤 久實

名古屋大学医学部  
小児肝・胆・膵外科 教授

北川 博昭

聖マリアンナ医科大学  
小児外科 教授

窪田 正幸

新潟大学医歯学系  
小児外科学 教授

菲澤 融司

杏林大学医学部  
小児外科学 教授

鈴木 達也

藤田保健衛生大学医学部  
小児外科講座 教授

黒田 達夫

慶應義塾大学医学部  
外科学(小児外科) 教授

田尻 達郎

京都府立医科大学医学研究科  
小児外科 教授

田村 正徳

埼玉医科大学総合医療センター  
小児科・総合周産期母子医療センター  
教授・センター長

前田 貢作

自治医科大学医学部  
外科学講座・小児外科学部門 教授

土岐 彰

昭和大学医学部  
外科学講座小児外科学部門 教授

月森 清巳

福岡市立こども病院  
産科 科長

藤野 明浩

慶應義塾大学医学部  
小児外科 講師

森川 康英

慶應義塾大学医学部  
小児外科 非常勤講師

岩中 督

東京大学大学院医学系研究科  
小児外科 教授

上野 滋

東海大学医学部  
外科学系小児外科学 教授

左合 治彦

国立成育医療研究センター  
周産期センター センター長

## A. 研究目的

消化器系の希少難治性疾患群は、H類縁(慢性特発性偽性腸閉塞症を含む)、先天性胆道閉鎖を含む新生児胆汁うっ滞症候群、乳幼児巨大肝血管腫、腹部リンパ管腫、顕微鏡的大腸炎および原因不明小腸潰瘍など、胎児期や小児期に発症し成人に至る長期経過をたどるものが多いためトランジションを考慮に入れた、胎児から成人までシームレスな診療が提供できるような、診断・治療のガイドラインの作成が急務である。

いままでこの疾患群は各疾患別に調査研究されてきたが、希少疾患のため調査法や分析法などがまちまちで、全数把握やガイドライン作成まで至っていない。H類縁は腸管神経節細胞が存在するにも拘わらず蠕動不全をきたす希少疾患で難治性である。先天性胆道閉鎖と新生児胆汁うっ滞症は新生児期から閉塞性黄疸をきたす疾患で予後改善のために早期診断が必要である。今年から便のカラーカードが母子手帳に印刷されることになりスクリーニング効果が期待されるが、発見後のガイドラインは未整備である。肝血管腫と腹部リンパ管腫は良性疾患であるが難治性で予後不良である。前班の調査では症例数が限定されるため、実態把握のため調査の拡大および診断治療指針の整備が必要であ

る。顕微鏡的大腸炎および原因不明小腸潰瘍は小児例は全く未着手で本邦での疾患の認知度もきわめて低い状態である。なお、日比班との調整で偽性腸閉塞症は成人も含めて本研究班が担当し、顕微鏡的大腸炎他は小児の調査を本研究班が担当し詳細な分析は日比班が担当することになった。

この研究では、初年度に関連学会を基盤とした全国調査の準備を整え文献的考察を行い、次年度に全国調査の実施と症例の集積と分析を行い、疾患別に重症度による新分類を提唱し、小児から成人へのトランジションを考慮に入れたシームレスな医療を提供できる診断・治療のガイドラインの作成に着手する。さらにすでに登録制度が確立されている胆道閉鎖症をモデルとして、他の疾患の登録システムを発足し、中長期的な追跡調査が可能な登録体制を構築する。

本研究の特色、独創的な点は、関連7学会の代表者をすべて分担研究者とし、それぞれの学会の全会員を対象として悉皆性の高い調査を可能にする点、学会と連携して診断基準、治療指針、ガイドライン作成に着手する点である。

## B . 研究方法

消化器系の希少難治性疾患群である、(1)H類縁(慢性特発性偽性腸閉塞症を含む)、(2)先天性胆道閉鎖を含む新生児胆汁うっ滞症候群、(3)乳幼児巨大肝血管腫、(4)腹部リンパ管腫、(5)顕微鏡的大腸炎および原因不明小腸潰瘍各疾患の5つの疾患群に分類し全数把握と診断法と治療に関する調査研究を実施する。

本疾患群はかなり専門的で特殊な疾患のため、本疾患群をとり扱っている関連7

学会の代表すべてを分担研究者とし、全数調査および情報交換が容易に行える協力体制を構築する。

さらに疾患横断的に(a)病理学的検討、(b)胎児診断、(c)疾患iPS細胞の作成の3つのグループがそれぞれの疾患グループに情報提供や検体の検索を行う。病理は特にH類縁、新生児胆汁うっ滞、胎児診断は胆道閉鎖、新生児胆汁うっ滞症候群、乳幼児巨大肝血管腫、腹部リンパ管腫。iPS細胞の作成はHおよびH類縁に限定してスタートし可能であれば他の疾患にも広げる。

【疾患別および疾患横断的グループ担当】  
疾患別グループ(下線はグループリーダー)

- (1) H病類(慢性特発性偽性腸閉塞症含む): 田口、中島、窪田昭、福澤、松藤、渡邊、金森、八木、濱田、増本、家人、虫明、友政、小林
- (2) 先天性胆道閉鎖症および新生児胆汁うっ滞症候群: 仁尾、松井、窪田正、北川、葦澤、鈴木、安藤、橋本
- (3) 乳幼児巨大肝血管腫: 黒田、田村、田尻、前田、土岐
- (4) 腹部リンパ管腫及び関連疾患: 藤野、森川、上野、岩中
- (5) 顕微鏡的大腸炎および原因不明小腸潰瘍: 中島、牛島、位田、内田

疾患横断的グループ

- (a) 病理学的検討および診断基準作成: 中澤、小田、孝橋、三好、田口
- (b) 胎児診断例の検討: 左合、月森
- (c) 疾患特異的iPS細胞作成: 中畑、桐野

**【調査票の作成と全国調査の準備と実施】**  
(平成24年度、25年度)

疾患グループ別に調査票を作成し以下の要領で調査を行う。各疾患により今までの実施段階が異なるため疾患別に調査戦略を構築する。

1次調査: 症例数および施設毎の診断基準の調査で、疾患の概要を把握

2次調査: 一次調査の回答のあった症例毎の詳細な調査と分析

**【小児消化管病理のコントロール作成】**

九州大学病理学教室および成育医療研究センターの正常小児の剖検例および手術例の正常部から胎児、新生児、乳児、幼児、学童それぞれ6例ずつ、S状結腸、横行結腸、回腸、空腸から3cm程度切り出し、通常のパラフィン標本とし検鏡し、長軸方向1cmあたりのAuerbach神経叢の神経節細胞の数の標準値を算出し、Hypoganglionosisの診断基準を作成する。神経の未熟性に関しては免疫染色の適切なマーカーを追求。

**【データの分析とガイドライン作成開始】**

疾患グループ別にデータを分析し、分類・診断・治療に関するコンセンサスを構築し、文献検索によりevidenceを構築。それに基づきガイドライン作成へ進める。Mindsとの連携をすすめる。

**【疾患別登録システムの準備と構築】**

先天性胆道閉鎖症は日本胆道閉鎖症研究会の施設会員を対象にした全国登録をすでに実施している。これをモデルとして

各疾患の登録システムを学会と協力して構築する。この疾患登録により長期フォローアップによる予後調査が可能になる。

**【疾患別iPS細胞作成】**

H類縁のiPS細胞作成を平成24年度に開始した。この研究の推進によりH類縁の原因および新規治療法の開発を並行して遂行する。この研究の成果をみて他の疾患への研究の展開を検討する。

**C . グループ毎の研究結果**

本研究は5つの疾患グループと3つの横断的研究グループで構成されている。それぞれの進捗状況を述べる(詳細は添付資料参照)。全体班会議は第1回を7月16日、第2回は2月10日に開催した。以下グループ別の進捗状況をまとめる。

**【H類縁】**

平成23年度の一次調査で集計した353例の二次調査を今年度督促し、ほぼ全例のデータが集まった。症例数からCIPSとCongenital Hypoganglionosisが二大疾患であることが判明した。現在これらのデータを分担研究者に配布し、疾患別の詳細な分析を開始した。SD35例についてはすでに分析が進み28例が確診例となった。H類縁の分類についてグループ会議を1回開催し、偽性腸閉塞症(CIPO, CIPS)の概念及び分類について議論を深めた。

なお国立保健医療科学院の武村先生と意見交換し、日比班の班会議に出席し、成人例のCIPOも田口班でカバーすることになった。

**疾患分類と定義**

岡本班の分類および文献的考察も加味し、また岡本班とのデータの比較や整合性を加味した tentative な分類を提案し、調査の対象とした。その後議論を重ね、現時点では以下の 7 疾患を H 類縁疾患として研究対象とすることでコンセンサスを得た。

**a) 神経節細胞正常群 (HE または AchE 染色にて正常)**

・ CIPS (Chronic intestinal pseudo-obstruction syndrome)

**この中に idiopathic (CIIPS), myopathy も包括される**

- ・ MMIHS (Megacystis microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome)
- ・ Segmental dilatation of intestine
- ・ Internal Anal Sphincter Achalasia (IASA)

**b) 神経節細胞異常群 (HE または AchE 染色にて異常)**

- ・ Immaturity of ganglia (別名 Immature ganglionosis)
- ・ Hypoganglionosis (別名 Oligoganglionosis)
- ・ Congenital Hypoganglionosis (別名 Hypogenesis, Hypoplasia)
- ・ Acquired Hypoganglionosis
- ・ Intestinal Neuronal Dysplasia (IND, NID)

しかし、このうち CIPS に関しては CIPO, CIIPS など文献的にも言葉の使い方や定義が研究者により異なっており、議論を要している。グループ内での会議を 2 回に開催したが結論がでず、二次調査の分析結果を待って再度議論をすすめる予定である。

**一次調査の方法と結果**

症例数(2001-2010 年の 10 年間)の症例

一次調査対象施設に郵送 (198 施設)

日本小児外科学会 (認定施設・教育関連施設) 138 施設

日本小児栄養消化器肝臓学会 (運営委員) 32 施設

小児慢性便秘 WG (メンバー) 28 施設

重複および不相当施設 37 施設

198-37=161 施設

**157 施設から回答 157/161 (回答率 98%)**

95 施設で経験症例あり (回答施設の 61%)

疑義症例まで含めた総症例数 **353 例**

症例数の内訳と 1996 年の岡本班 (文部省科研総合研究 A) との比較

	今回 (2012)	岡本班 (1996)
Normal ganglia		
CIPS(CIPO)	100 (28.3%)	24 (22.2%)
MMHS	33 (9.4%)	9 (8.3%)
SD	42 (11.9%)	ND
IASA	3 (0.9%)	ND
Abnormal ganglia		
Immaturity	28 (7.9%)	26 (24.1%)
Hypoganglionosis	130 (36.8%)	44 (40.8%)
Congenital	121 (34.3%)	
Acquired	9 (2.5%)	
IND	17 (4.8%)	5 (4.6%)
Total	353 (100%)	108 (100%)

太字の 2 疾患 CIPS と Congenital Hypoganglionosis が今回および岡本班の症例数を総合して、症例数が多く、二大疾患と考えられる。それに次ぐのが Segmental



Dilatation, MMIHS, Immaturity で 10%前後で、これも前回の調査とほぼ同様の結果であった。ただし Segmental Dilatation は今回初めて調査の対象としたがある程度の症例数があることが判明した。IND は 5%弱であるが前回とほぼ同様であり、欧米の施設でも認知されている疾患であり、ある程度の認知度があるものと思われた。一方、Acquired Hypoganglionosis と IASA (Internal Anal Sphincter Achalasia) は極めて少なかった。

### 診断基準

施設ごとにそれぞれの疾患について診断基準を有しているか、回答のあった 69 施設のうち何%の施設が診断基準を有しているか調査した。その結果、症例数と同様に CIPS と Congenital Hypoganglionosis に関して 80%以上の施設が診断基準を有しており、疾患としての認知度が高かった。いっぽう症例数の少ない Acquired Hypoganglionosis と IASA (Internal Anal Sphincter Achalasia) に関しては 30%程度の施設しか診断基準を有しておらず、疾患認知度も低いものと思われた。

#### a) Normal ganglia

CIPS	57/69	83%
MMIHS	47/69	68%
Segmental dilatation of intestine	42/69	61%
IASA	21/69	30%

#### b) Abnormal ganglia

Immaturity of ganglia	46/69	67%
Hypoganglionosis		
Congenital Hypoganglionosis	55/69	80%

#### Acquired Hypoganglionosis

19/69 28%

IND 34/69 49%

### ガイドライン作成に向けて

2012 年 9 月 11 日に日本医療機能評価機構 EBM 医療情報部 (Minds) を訪問しガイドライン作成の指導を受けた。さらに 12 月 8 日に Minds 主催第 12 回診療ガイドライン作成グループ意見交換会に出席し情報収集した。ガイドラインは医療の質の指標つまり Quality Indicator の指標として使用されるので、とくに Evidence level の高い推奨度 A に関してはそのまま Quality Indicator となるので責任重大である。ガイドライン作成に当たり RCT は evidence level が高いが、必ずしも論文がそろわない場合は国内のコホート study を根拠にして進めていく方法もある。また文献については網羅するのもよいがキーワードを決めて検索していったほうが目的に合った evidence が見つかる可能性が高い。また Quality Indicator は医療の質の保証・改善に役立たせるもので、病院を格付け・順位づけするものではない。

### 小児慢性特定疾患のみなおしやトランジションに関して

松井班の調査に対して本研究班から小児慢性特定疾患のみなおしの候補として H 類縁疾患、全結腸型 H 病、肝巨大血管腫、リンパ管腫を候補としてピックアップし、松井班を介して厚生労働省母子保健課に資料を提出した。トランジションに関しては厚生労働省疾病対策課に情報提供した。

### 二次調査の結果分析

二次調査用紙の回収を遅延していた施設に督促し、一次調査で集計した症例のほぼ

全症例を回収することができた。これを PDF ファイルとし、担当の分担研究者に 11 月に郵送した。7 疾患の分析の進捗状況は分担研究報告に譲る。なお 7 疾患に関してそれぞれ診断基準、重症度分類、治療指針を作成し、ガイドライン作成へと向かう。

#### 【新生児胆汁うっ滞】

胆道閉鎖症については 1989 年より全国登録が開始され、2011 年現在で 2622 例の登録が行われているが、近年登録率の低下が危惧されている。登録の悉皆性向上のためにオンライン登録への移行を計画しており、本年はこれに対する準備を行った。また胆道閉鎖症という疾患の理解を深めるとともに、その治療の個別化という点からも臨床経過に即した病型分類は重要である。以前からの分類については学会などでも議論されてきたが、今回は現在の分類と臨床経過との関連や年長例における肝内胆管形態の変化などを調査することで分類の改定を図るための作業工程や具体的なスタディデザインの策定など準備作業を行った。非胆道閉鎖新生児胆汁うっ滞症候群についてはこれまでの個別の疾患の全国調査ではなく、シームレスな診断治療ガイドライン策定を見据えた包括的な実態調査を行うべく準備を進めている。

なお、診断基準作成は、まず、胆道閉鎖症の診断基準と治療指針作成に向けてコアメンバーが動き始めた。

#### 【巨大肝血管腫】

肝血管腫に対する全国調査の準備をすすめ周産期領域まで拡大して調査予定。診断基準、治療指針、ガイドライン作成にむけ

た文献調査・観察研究を進めている。

#### 1) 拡大全国調査

前の黒田班の班研究の調査は対象が小児外科施設に限定していたので、これに加えて拡大全国調査の準備中。周産期領域まで拡大して調査予定である。現在リストおよび調査用紙の作成中。

#### 2) 文献調査・観察研究

ガイドライン作成に向けて、分担研究者個々に進めている。

#### 3) 情報センターの運営

2011 年 4 月の「小児がん相談窓口」開設以来、現在まで述べ 63 通の問合せを受けている。この中には関連疾患としてリンパ管腫 2 通、肝腫瘍 8 通が含まれたが、肝血管腫自体はなかった。情報センターの機能の拡大により登録業務が可能か検討する。

#### 【腹部リンパ管腫】

グループ会議 4 回を経て前身となる「リンパ管腫研究班（平成 21-23 年度：藤野班）」の調査結果の見直し、文献調査を行い、来年度にするアンケート調査の方向性が決まった。前研究班の平成 23 年度の全国調査結果より「腹部」リンパ管腫のみを対象として難治性に関わると考えられる病態・症状各因子の Odds 比を算出し「難治性度スコアリング」を行ったところ、特異度は 90%程度が得られるが、感度が 70%程度となる結果が得られた。この結果より、研究班にて定義する「腹部の難治性リンパ管腫」に合致する症例につき前調査を踏まえて詳細に調査することとなった。目的としては難治性度に応じた治療に関わる臨床・クエスチョンへの回答を得るための

調査を行う。本調査は Web 調査となるため、現在登録システムを構築中である。

なお、診断基準、治療指針作成に関しては腹部に限らず、リンパ管腫全体を見据えたものをつくる方向に全体会議で議論された。

#### 【小児顕微鏡的大腸炎、他】

当該希少難病の我が国における実態は全く不明である。そもそも疾患の認知が医療者になく、邦文成書にも記載がないのが現状であることが明らかになった。

しかしながら海外での論文報告や、英文での医学教科書には記載があり、我が国においては小児領域で疾患の認知がないことからその実態が明らかにされてない理由であると考えられる。

以上の問題から、本年度は以下の活動を遂行している。

(1) 海外における当該疾患の報告例などの論文検索を行い、小児領域における本疾患の疾患概念の整理(特に症状や、診断)を行った。

(2) この海外の文献的考察をもとに成人にはない小児特有の病態などを加味した実態調査を企画した。

(3) 我が国での現状調査のために「本疾患と思われる症例の経験があるか無いか」の第一次調査を日本小児栄養消化器肝臓学会、および小児 IBD 研究会の会員宛に行った。今後は 1 次調査で症例の経験ある医師への詳細な 2 次調査により我が国における小児例の当該疾患の実態解明を目指すものである。

#### 【病理学的検討】

#### [研究の背景]

腸管壁内神経細胞が存在するにもかかわらず腸管蠕動不全を来すヒルシュスプルング病(HD)類縁疾患の診断や分類に関して、いまだ一定のコンセンサスが得られていない。これは HD 類縁疾患の希少性だけでなく、病理学的診断には H.E 染色や AchE 染色による形態学的検討が主であり、近年、新たなアプローチとして免疫組織化学染色による HD 類縁疾患の病理学的診断・分類の試みが報告例されるようにはなったが、HD 類縁疾患の分類の一役を担うまでには至っていないことが大きい。また、HD 類縁疾患の診断の対照となる正常腸管の評価が未確立であることも診断の難しさを助長していると思われる。

そこで今回我々は、HD 類縁疾患の免疫組織化学染色による病理学的検討を行うにあたり、胎児期から成人期にかけての正常回腸を用いて、腸管神経叢の経時的变化と、腸管蠕動に必要な要素である神経叢内の神経節細胞やグリア細胞、固有筋層、Cajal 細胞について、それぞれの細胞を同定するための適切な抗体を選別した。さらに、HD 類縁疾患に対する免疫組織化学染色による診断法の確立を目指して、個々の症例についての検討を試みた。

#### [研究目的]

新たな免疫染色法による HD 類縁疾患の診断方法の確立

#### [研究方法]

アウエルバッハ・マイスナー神経叢の評価

Hirschsprung 病類縁疾患の腸管組織を 3 重免疫染色し、1cm 当たりのアウエルバッハ神経叢内の神経節細胞数とグリア細胞数

をカウント、正常腸管との比較を行う。

神経節細胞のアポトーシスについて

神経節細胞の成熟度について

Cajal 細胞の評価

Hirschsprung 病類縁疾患の腸管組織を CD117 抗体による免疫染色を行い正常腸管との比較検討を行う。

固有筋層の評価

Hirschsprung 病類縁疾患の腸管組織を SMA 抗体による免疫染色を行い正常腸管との比較検討を行う。

[研究方法と結果]

対象は 25 例（胎生 8 週～20 歳）の正常腸管（回腸）組織とし、神経系マーカー 24 種類の抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。

胎生 8 週のアウエルバッハ神経叢内にはすでに神経節細胞とグリア細胞が分化しており、腸管壁の発達は、腸間膜側から対側に向かって神経叢内の神経細胞や固有筋層が分化・成熟していくことが分かった。また、アウエルバッハ神経叢内の神経節細胞数とグリア細胞数の比率は出生直前までは 1:1 だが、その後年齢と共に神経節細胞の比率が低下（グリア細胞の比率が増加）しており、神経節細胞が成熟過程においてアポトーシスを起こしていることが示唆された。それぞれの細胞を同定するために有用な抗体としては神経節細胞には HuC/D 抗体、Phox2b 抗体、グリア細胞には Sox10 抗体、Sox2 抗体が独自の染色性を有していることが分かり、既に知られている Cajal 細胞を同定する CD117 抗体、固有筋層を同定する SMA 抗体を組み合わせることで同一組織内での二重ないし三重免疫組織化学染色

が可能であることが分かった。また、Phox2b 抗体は未熟な神経節細胞に優位な染色性を示す一方、TH 抗体は成熟した神経節細胞に優位な染色性を示した。これらの新たな染色方法を Hirschsprung 病類縁疾患に応用することで、腸管組織内の神経節、Cajal 細胞、固有筋層をより精密に同定し、分布異常を明確にすることが可能と考えられた。

【胎児診断例の検討】

先天性胆道閉鎖を含む新生児胆汁うっ滞症候群、乳幼児巨大肝血管腫、腹部リンパ管腫における胎児診断・治療例の実態を把握するために、これら疾患に対する胎児診断・治療に関する文献的考察を行うとともに全国調査の準備を進めている。

1) 文献的考察：

新生児胆汁うっ滞症候群のなかで胆道閉鎖症と先天性胆道拡張症については、胎児超音波検査で肝門部の嚢胞状腫瘤として胎児診断された報告が欧文で 23 例あった。胎児期に両者の鑑別は難しいが、胆道拡張症では胆道閉鎖症と比較して嚢腫のサイズが大きく(2~3cm 以上)、経時的に増大する特徴があった。

肝血管腫の胎児診断は欧文 25 例あり、腫瘍サイズが 5cm 径以上あるいは AV shunt を認めるものは予後が不良であった。また、胎児水腫を伴う肝血管腫に対する胎児治療として母体あるいは胎児への副腎皮質ステロイド投与が 3 例報告されていた。

腹部リンパ管腫の胎児診断は欧文 13 例あり、後腹膜リンパ管腫は臀部・下肢に腫瘍の浸潤をきたし予後が不良であった。

2) 全国調査：

胆道閉鎖症と先天性胆道拡張症、乳幼児巨大肝血管腫、腹部リンパ管腫における胎児診断・治療に関する調査票を作成している。調査票ができ次第、全国調査を実施する予定である。

#### 【疾患特異的 iPS 細胞作成】

##### ○研究方法

Hirschsprung 病および Hirschsprung 病類縁疾患に関する疾患解析を行うため、患者より皮膚または血液を採取し、エピソーマルベクターを用いて iPS 細胞を樹立する（疾患特異的 iPS 細胞）。同時に患者家族からも皮膚または血液を採取し、同様の方法で iPS 細胞を樹立してコントロールとする。患者細胞より樹立した疾患特異的 iPS 細胞は患者の持つ遺伝情報を全て有する細胞であり、様々な細胞へと分化誘導することが可能であることから、胎生期に起こる病気の病態を再現することが可能である。

Hirschsprung 病および一部の Hirschsprung 病類縁疾患において、胎生期の腸管神経系の発生異常が病気の原因であると考えられており、この発生段階の異常を iPS 細胞を用いて解析する。

このために、iPS 細胞を腸管神経系を構成する細胞の前駆細胞である神経堤細胞へ分化誘導し、神経堤細胞の遊走能や増殖能、分化能などを患者および家族や健常者の間で比較検討する。

##### 倫理面への配慮

「ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」に対し、九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において審査され、九州大学病院長より平成 24 年 8 月 1 日に承認さ

れた。

##### 研究成果

- ・ Hirschsprung 病の 1 家族例 3 名よりそれぞれ血液を採取し、エピソーマルベクターを用いて iPS 細胞を樹立した。
- ・ 上記 3 名のゲノム DNA を網羅的に解析した。
- ・ 樹立した iPS 細胞を神経堤細胞へと分化誘導した。
- ・ 患者と家族および健常コントロールそれぞれにおいて、iPS 細胞由来神経堤細胞の遊走能・分化能を比較した。

#### D. 考察

5つの疾患別グループおよび3つの横断的グループに複数の学会が関連性を保ちながら、全国調査をすすめ、診断基準、治療指針、ガイドライン作成に向けて邁進している。初年度はすでに全国調査を行ったグループ（H類縁、肝血管腫、リンパ管腫）ではその結果の分析をすすめ、データが不足しているグループは再調査のための準備を行った。データがそろっているグループはデータの分析を進め、難治性疾患としての診断基準、治療指針、ガイドライン作成に向けて動き始めている。

横断的グループでは、病理は病理的な診断基準作成にむけて正常胎児の腸管の神経節細胞の免疫組織化学的分析を行い、有力なマーカーの分析に着手し、未熟な神経節細胞とグリア細胞の区別、成熟神経節細胞と未熟神経節細胞の区別ができるように研究を進めている。胎児診断ではとくに胆道拡張症と閉鎖症の区別について着目し全国調査の準備を行っている。出生後でも胆道閉鎖の cyst と d と胆道拡張症の

区別が困難な場合があり、胎児診断例の分析は期待がもたれる。

また長期的展望に立って疾患登録と長期フォローアップ体制の構築、患者会との連携や希少疾患に対する患者家族会の立ち上げへの支援、病因解明と新規治療法の開発に向けた疾患特異的iPS細胞の樹立の研究に着手した。

## E . 結論

5つの疾患別グループ別に複数の学会と連携して全国調査を実施または準備し、悉皆性の高い調査を可能にしている。さらに3つの横断的グループがサポートしていく構築で、小児の消化器系難治性疾患の診断基準、重症度分類、治療指針、ガイドライン作成に向かって前進している。

【謝辞】本研究は科研費(H24-難治等-一般-037)の助成を受けたものである。

## F . 健康危険情報

該当する情報はなし

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Alatas FS, Masumoto K, Esumi G, Nagata K, Taguchi T. Significance of abnormalities in systems proximal and distal to the obstructed site of duodenal atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54(2):242-247, 2012
- 2) Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Taguchi T. Implications of surgical intervention in the treatment of neuroblastomas: 20-year experience of a single institution. *Surg Today* 42(3):220-224, 2012
- 3) Taguchi T, Nagata K, Kinoshita Y, Ieiri S, Tajiri T, Teshiba R, Esumi G, Karashima Y, Hoka S, Masumoto K. The utility of muscle sparing axillar skin crease incision for pediatric thoracic surgery. *Pediatr Surg Int* 28:239-244, 2012
- 4) Morimatsu K, Aishima S, Kayashima T, Hayashi A, nakata K, Oda Y, Taguchi T, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Oda Y. Liver-Intestine Cadherin Expression Is Associated with Intestinal Differentiation and Carcinogenesis in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm. *Pathobiology* 79:107-114, 2012
- 5) Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Yosue R, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T. Surgical intervention strategies for pediatric ovarian tumors: experience with 60 cases at one institution. *Pediatr Surg Int* 28(1):27-31, 2012
- 6) Kohashi K, Takahashi Y, Taguchi T, Oda Y. Pediatric Rhabdomyosarcoma: Role of Cell Cycle Regulators Alteration. *Pediatric Cancer* 2(1) : 23-30, 2012
- 7) Saeki I, Tokunaga S, Matsuura T, Hayashida M, Yanagi Y, Taguchi T. A formula for determining the standard liver volume in children: a special reference for neonates and infants.

- Pediatr Transplant 16(3) : 244-249, 2012
- 8) Uchiyama H, Kayashima H, Matono R, Shirabe K, Yoshizumi T, Ikegami T, Soejima Y, Matsuura T, Taguchi T, Maehara Y. Relevance of HLA compatibility in living donor liver transplantation: the double-edged sword associated with the patient outcome. Clin Transplant 26(5) : E522-529, 2012
- 9) Alatas FS, Hayashida M, Matsuura T, Saeki I, Yanagi Y, Taguchi T. Intracranial hemorrhage associated with vitamin K-deficiency bleeding in patients with biliary atresia: focus on long-term outcomes. J Pediatr Gastroenterol Nutr 54(4):552-557, 2012
- 10) Usui N, Kitano Y, Sago H, Kanamori Y, Yoneda A, Nakamura T, Nosaka S, Saito M, Taguchi T. Outcomes of prenatally diagnosed sacrococcygeal teratomas: the results of a Japanese nationwide survey. J Pediatr Surg 47(3):441-447, 2012
- 11) Kinoshita Y, Suminoe A, Inada H, Yagi M, Yanai F, Zaizen Y, Nishi M, Inomata Y, Kawakami K, Matsufuji H, Suenobu S, Handa N, Kohashi K, Oda Y, Hara T, Taguchi T. The prognostic significance of blastemal predominant histology in initially resected Wilms' tumors: a report from the Study Group for Pediatric Solid Tumors in the Kyushu Area, Japan. J Pediatr Surg 47(12):2205-2209, 2012
- 12) Matsuura T, Kohashi K, Yanagi Y, Saeki I, Hayashida M, Aishima S, Oda Y, Taguchi T. A morphological study of the removed livers from patients receiving living donor liver transplantation for adult biliary atresia. Pediatr Surg Int. 28(12):1171-1175, 2012
- 13) 金森 豊、白井 規朗、北野 良博、左合 治彦、左 勝則、米田 光宏、中村 知夫、野坂 俊介、宗崎 良太、田口 智章. 本邦で胎児診断された仙尾部奇形腫の生命予後に関する検討 - 厚生労働省科学研究・胎児仙尾部奇形腫の実態把握・治療方針作成に関する研究から -. 日小外誌 48(5) : 834-839, 2012
- 14) 永田 公二、手柴 理沙、江角 元史郎、木下義晶、増本 幸二、藤田 恭之、福島恒太郎、和氣 徳夫、田口 智章. 当科にて出生前診断された isolated CDH の長期予後. 周産期シンポジウム抄録集 30 : 93-99, 2012
- 15) 宮本 和俊、田口 智章. 第 48 回日本小児外科学会学術集会 ワークショップ 「Hirschsprung 病術後の術式別排便機能」. 日小外誌 48(1) : 22-24, 2012
- 16) 田口 智章、福重 淳一郎. 小児外科の進歩. 臨床と研究 89(6) : 141-152, 2012
- 17) 松浦 俊治、田口 智章. 小腸移植の現状 - 九州初の脳死小腸移植を実施して -. 福岡医学雑誌 103(8) : 151-158, 2012

- 18) 永田 公二、手柴 理沙、江角 元史郎、宗崎 良太、林田 真、家入 里志、和田 美香、原田 起代枝、宮崎 敬子、立花 由紀子、木下 義晶、田口 智章。難治性手術創に対する局所陰圧閉鎖療法の適応。小児外科 44(10) : 943-950, 2012
- 19) 永田 公二、手柴 沙、江角 元史郎、宗崎 良太、林田 真、家入 里志、金城 唯宗、落合 正行、木下 義晶、原 寿郎、田口 智章。外科疾患を伴う極低出生体重児と外科疾患を伴わない極低出生体重児の長期予後。小児外科 44(11) : 1077-1081, 2012
- 20) 田口 智章、宗崎 良太、手柴 理沙。知っておくべき消化器疾患の最新治療 虫垂炎。小児科診療 76(2) : 255-261, 2013
- 21) 田口 智章。胎児治療の最前線と今後の展望 胎児治療の現状。小児外科 45(1) : 5-7, 2013
- 3) Taguchi T, Ieiri S, Kubota A, Iwanaka T, Watanabe Y, Kobayashi H, Ueno S, Nio M, Matsufuji H, Masumoto K, Yagi M, Hamada Y, Kuroda T, Ushijima K, Matsui A. The incidence and criteria of variant Hirschsprung 's disease -Results from the nationwide survey in Japan-. PAPS2012 Jun3-7, 2012, Shanghai, China
- 4) 田口 智章、家入 里志、岩中 督、窪田 昭男、渡邊 芳夫、小林 弘幸、上野 滋、仁尾 正記、松藤 凡、増本 幸二、孝橋 賢一、牛島 高介、松井 陽。「Hirschsprung 病類縁疾患の分類と診断基準」～研究班報告から～。第 37 回日本外科系連合学会学術集会 2012 年 6 月 28-29 日, 福岡
- 5) 田口 智章、家入 里志、位田 忍、池田 佳世、窪田 昭男、川原 央好、友政 剛、松藤 凡、増本 幸二、牛島 高介、松井 陽。わが国の小児 CIPS の現状 - Hirschsprung 病類縁疾患研究の全国調査結果から -。第 39 回日本小児栄養消化器肝臓学会 2012 年 7 月 13-14 日, 大阪
- 6) 田口 智章。国内における腸管運動機能障害の現状調査と小腸移植の適応。第 48 回日本移植学会総会 2012 年 9 月 20-22 日, 愛知

## 2. 学会発表

- 1) 田口 智章。ヒルシュスプルング病根治術式の変遷と最新の術式。第 112 回日本外科学科定期学術集会 平成 24 年 4 月 12-14 日, 千葉
- 2) 家入 里志、岩中 督、窪田 昭男、渡邊 芳夫、小林 弘幸、上野 滋、仁尾 正記、松藤 凡、増本 幸二、孝橋 賢一、田口 智章。「Hirschsprung 病類縁疾患の現状調査と診断基準に関するガイドライン作成」に関する研究班報告。第 49 回日本小児外科学会学術集会 2012 年 5 月 14-16 日, 横浜

## H. 知的財産の出願・登録状況

なし