

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)
分担研究報告書

Hirschsprung 病類縁疾患に対する病理学的検討

研究分担者(順不同) 中澤 温子 国立成育医療研究センター病理診断部 部長
孝橋 賢一 九州大学大学院医学研究院 助教研究分担者

研究要旨

Hirschsprung disease(HD)類縁疾患の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変化と、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に適切な免疫組織化学染色用抗体を選別した。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。神経節細胞の同定には HuC/D 抗体、Phox2b 抗体、グリア細胞には Sox10 抗体、Sox2 抗体 Cajal 細胞には CD117 抗体、固有筋層には SMA 抗体が、それぞれ適した抗体であると考えられた。これらの新たな染色方法を HD 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。また、病理診断ガイドラインの策定にあたっては、腸管神経叢の発達を考慮した生検部位の検討が必要と考えられた。

研究協力者

小田 義直(九州大学医学研究院 教授)

三好 きな

(九州大学医学研究院 大学院生)

A . 研究目的

Hirschsprung disease(HD)類縁疾患の病理学的診断基準を作成するための、基礎的検討を行う。

1. 腸管神経叢の病理学的評価に有用な免疫組織化学染色の方法を確立する。HD 類縁疾患における Auerbach 神経叢及び Cajal 細胞、固有筋層の評価に有益なマーカーを探索する。
2. 対照となる正常腸管について、胎児期から成人期にかけての腸管神経叢、固有筋

層、Cajal 細胞などの評価を行う。

B . 研究方法

対象：対照となる正常腸管として、剖検検体 13 例(胎齢 16~38 週) 手術検体 13 例(胎齢 8 週・日齢 3 日~20 歳) HD 及び HD 類縁疾患 8 例の主に回腸組織のホルマリン固定パラフィン切片。

方法：24 種類の神経および平滑筋関連マーカーによる網羅的な免疫組織化学染色を用い、経時的な胎児期腸管の発達を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究における病理診断は、関連法規を遵守し、倫理委員会の承認を経た上で、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細

心の注意を払って実施した。

C . 研究結果

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 たが、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 抗体が最も良好な染色性を有していた。これらに加えて、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、tyrpsine hydroxylase (TH) 抗体は成熟した神経節細胞に優位な染色性を示した。

D . 考察

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たす 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、HD 類縁疾患の病理学的診断は H.E 染色や AchE 染色による形態学的検討が主であり、診断の精度や再現性

に問題があることが理由としてあげられる。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・分類の試みが報告されるようになったが、HD 類縁疾患の定義に利用されるまでには至っていない。また、HD 類縁疾患の診断の対照となる年齢に応じた正常腸管神経叢の評価基準・方法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。

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変化と、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に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。神経節細胞の同定には HuC/D 抗体、Phox2b 抗体、グリア細胞には Sox10 抗体、Sox2 抗体 Cajal 細胞には CD117 抗体、固有筋層には SMA 抗体が、それぞれ適した抗体であると考えられた。これらの新たな染色方法を HD 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。

神経節細胞の未熟性の評価については、BCL-2 抗体による免疫組織化学染色が有用との検討結果があるが、染色強度の判定が困難で、更なる検討が必要と考えられた。Phox2b、TH についても未熟性のマーカーとしての有用性を検討していく予定である。

また、病理診断ガイドラインの策定にあたっては、腸管神経叢の発達を考慮した生

検部位の検討が必要と考えられた。

E . 結論

HD 類縁疾患の病理診断ガイドラインの策定にあたり、腸管神経叢の神経節細胞およびグリア細胞、固有筋層、Cajal 細胞の評価に適切な抗体を選定した。胎児期から成人までの正常腸管神経叢の発達について、免疫組織化学染色により、評価を試みた。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Matsuoka K, Hayashi S, Urano F, Lihua J. Zhu, Okita H, Sato H, Nakazawa A. Squamous metaplasia in the cyst epithelium of type 1 congenital pulmonary airway malformation after thoracoamniotic shunt placement. Human Pathology 2012;43:1413-1417

2 . 学会発表

1. 畑中 政博, 中野 夏子, 羽賀 千都子, 大喜 多肇, 松岡 健太郎, 中澤 温子. 胎児期から成人期にかけての腸管神経叢神経節細胞の病理学的検討 . 第 32 回日本小児病理研究会 2012 月 9 月 8 日, 大阪

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし