

Hirschsprung病類縁疾患： 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
小田 義直 九州大学大学院医学研究院形態機能病理学 教授
孝橋 賢一 九州大学病院病理部 講師（H24）

【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。神経節細胞の同定にはHuC/D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、各々最適な抗体であると考えられた。さらにHD病類縁疾患で最も多いhypoganglionosis(HG)についてHuC/D抗体を用い、簡便で再現性のある組織学的診断方法を検討した。HGでは24例全例切除腸管1cmあたりの神経節細胞数は20個未満であった。生検部位を含めたHGの病理診断ガイドラインの作成を行った。

研究協力者

孝橋 賢一（九州大学医学研究院 講師）
（H25）

畑中 政博（獨協大学越谷病院 助教）

三好 きな（九州大学医学研究院 大学院生）

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。

3. HD病類縁疾患で最も多いhypoganglionosis(HG)について、免疫組織学的評価を行い、病理診断ガイドラインを作成する。

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。

B. 研究方法

1. 腸管神経叢の免疫組織化学的評価法の確立
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-

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。

2. HGの免疫組織学的評価

対象：対照となる正常腸管として、手術検体26例（日齢1日～10歳）、HG 24例（日齢1日～15歳；空腸13例、回腸8例、結腸3例）の全層生検ホルマリン固定パラフィン切片。

方法：HuC/D抗体を用いた免疫染色標本を作成し、切除腸管1cmあたりの筋層間神経叢におけるHuC/D陽性細胞を計数する。陽性細胞の計数方法は、Maya Swaminathanらの論文 (Human Pathology, 41, 1097-1108, 2010年) に記載されている基準を用いた。各群の平均値比較は統計ソフト IBM SPSS Statistics ver. 21 を用い、t 検定を行った。

3. HG病理診断ガイドラインの作成

当研究班において小児外科医、病理医が討論し、全国調査の結果も踏まえて、HG病理診断ガイドラインの作成を行った。

(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

1. 腸管神経叢の免疫組織化学的評価法の確立

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。

2. HGの免疫組織学的評価

HG群では対照群と比較してHuC/D陽性細胞が有意に少なく、全例20個/cm未満であった。対照群の中に、HuC/D陽性細胞が20個/cm以下の症例が5例（臍腸管遺残1、メッケル憩室1、NEC1、鎖肛1、胎便性腹膜炎1）認められたが、その原因は明らかでなかった。

3. HG病理診断ガイドラインの作成

当研究班での検討の結果、下記のガイドライン（案）を作成した。

Isolated congenital hypoganglionosis (hypoganglionosis) の病理診断ガイドライン(案)

Hypoganglionosisは新生児期にイレウスとして発症することがほとんどであり、鑑別診断として小腸閉鎖、Hypoganglionosis、Hirschsprung病、Immaturity of gangliaが挙げられる。小腸閉鎖は術中所見で診断できるが、Hypoganglionosis、Hirschsprung病、Immaturity of gangliaの鑑別は術中所見、術中迅速診断では不可能な場合が多いため、常時対応可能な病理医がいる場合を除き術中迅速診断は行わない。

新生児イレウスで緊急開腹手術を行う場合には、Hypoganglionosisの病理診断を正確に行うために、腸管全層を観察できる十分な検体（目安としては1cm長）を採取する（下図参照）。全層生検の検体採取は、(1)caliber changeより十分口側小腸に人工肛門を造設し、全周（竹輪状）標本、(2)回腸末端、(3)S状結腸（もしくは横行結腸）で行う。標本は直ちに通常ホルマリン固定を行いパラフィン切片のHE染色による診断を原則とする。

(1)に正常サイズのplexusが存在しganglion cellも正常で、(2)(3)にganglion cellがない場合はHirschsprung病と診断される。この場合(3)には肥大神経線維束が存在する。

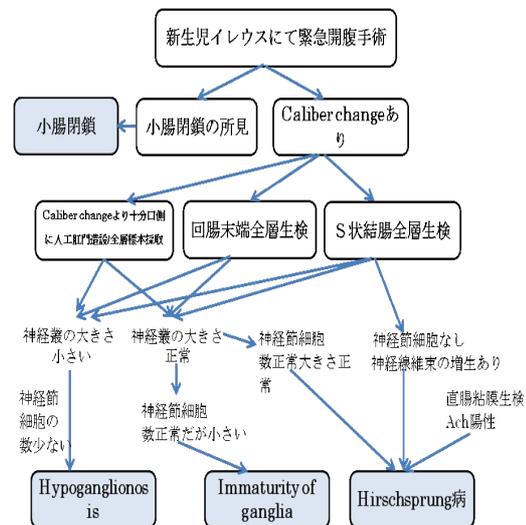
(1)(2)(3)に正常サイズのplexusが存在し、ganglion cellの数は正常だが大きさが小さく胞体が少ない場合はImmaturity of gangliaと診断される。Immaturity of gangliaでは、gangliaが小さく、神経節細胞も小型で細胞質が狭く、未熟である。

(1)(2)(3)ともganglion cellは存在するが少なく、大きさも小さい場合isolated congenital hypoganglionosisと診断される。Ganglion cellの数が極めて少ない場合はHirschsprung病の無神経節腸管との区別が難しい場合もある。Hypoganglionosisでは結腸のganglion cellは小腸よりもやや多いことが多く、また肥大神経線維束は欠如するので、診断の一助となる。

もし(1)(2)(3)に全くganglion cellがない場合は非常にまれであるがTotal intestinal aganglionosisとなる。

なおHypoganglionosisの病理診断には、HuC/D抗体を用いた免疫組織化学染色を行うと、ganglion cellが特異的に染色されるので、小型の未熟なganglion cellとSchwan細胞を区別するのに極めて有効である。Ganglion cellの数

を正確に数えることも可能である。



* Immaturity of gangliaについては、人工肛門切除時に神経叢、神経細胞に異常がないことを確認し、最終的に診断を確定する。

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。

HGについては、HuC/D染色にて、概ね、20個/cm以上のHuC/D陽性細胞があれば、HGの可能性は低いと考えられた。対照群の中に、HuC/D陽性細胞が20個/cm以下の症例が5例（臍腸管遺残1、メッケル憩室1、NEC1、鎖肛1、胎便性腹膜炎1）認められたが、その原因は明らかでなかった。

今回の全国調査の登録症例全例で、新生児期早期に腸閉塞症状を認めた。したがって新生児期の腸閉塞の緊急手術時に、HGの病理診断に必要な全層生検を行うことを想定し、生検部位や方法（腸管全周を人工肛門造設部で採取するなど）について、病理診断ガイドライン（案）を作成した。今後この方法により、統一された全層生検のデータが集積すれば、HGの診断基準として、具体的な数値が策定できると考えられる。

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。

HuC/D抗体を用いた免疫組織学的検討では、HG症例の筋層間神経節細胞は全例で20/cm未満であった。

HDとの鑑別を確実にを行うことを主旨とし、HG病理診断のためのガイドライン（案）を作成した。

F．研究発表

1．論文発表

該当なし

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，大阪，2012.9.8.
2. Masahiro Hatanaka, Astuko Nakazawa, Nastuko Nakano, Chizuko Haga, Hajime Okita, Kentaro Matuoka, Mariko Aoki, Akihiro Igarashi, Junko Fujino, Makoto Suzuki, Yuki Ishimaru, Kazunori Tahara, Hitosi Ikeda. Pathological Evaluation of Hypo ganglionosis using Immunohisto chemistry. 第46回太平洋小児外科学会議，Hunter Valley, Australia 2013.4.10.
3. 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：免疫組織化学染色を用いたヒルシュスブルグ病類縁疾患に対する病理学的評価．第50回日本小児外科学会学術集会，東京，2013.6.1．

4. 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:免疫組織化学染色を用いた腸管神経叢発育の評価．第102回日本病理学会総会，札幌，2013.6.7.

G．知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし