

## Hirschsprung病類縁疾患に対する病理学的検討

研究分担者 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

### 【研究要旨】

Hirschsprung 病類縁疾患である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の筋層間神経叢ではHuC/D およびSox10陽性細胞の数が有意に減少しており、切除腸管1cmあたりの神経節細胞数は10個以下であった。CD56染色による評価では、HGでは神経叢の数、面積が有意に減少していることが判明した。

### 研究協力者

義岡 孝子（鹿児島大学）  
三好 きな（九州大学）

### A．研究目的

HGはHirschsprung 病類縁疾患で最も多い疾患であるが、病理組織学的診断基準は未だ定められていない。HGの診断を正確かつ迅速に行うために、免疫組織学的手法を用いた診断方法の検討を行った。

### B．研究方法

#### 1. 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：抗HuC/D抗体(16A11, Life technologies), 抗SOX10 goat poly clonal 抗体 (Santa cruz Biotech -nology), 抗CD56抗体 (1B6, Leica Biosystems) 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、SOX10陽性細胞、CD56陽

性の神経叢の数と面積を計数する。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 Statisticts ver. 21 を用い、t 検定を行った。

### （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. HuC/D (神経細胞に陽性) およびSox10 (腸管グリア細胞に陽性) の免疫染色を行った。標本上1cm あたりの陽性細胞を計数した。

1) HG群ではHuC/D陽性細胞数 $9.59 \pm 4.82$  (コントロール群 $43.6 \pm 21.8$ ,  $p < 0.01$ )、Sox10陽性細胞の数  $37.08 \pm 24.74$  (コントロール群 $285.6 \pm 131.3$ ,  $p < 0.01$ ) が有意に減少していた。

- 2) HuC/D陽性細胞はHG群では10個/1cm以下であった。
  - 3) グリア細胞と考えられるSox10陽性細胞はHG群では100個/1cm以下であった
2. CD56 (神経叢に陽性) の免疫染色を行い、標本上1cm当りの神経叢の数と面積を計測した。
- 1) HG群で神経叢の数は $24.7 \pm 12.5$  (コントロール群 $50.6 \pm 24.7$ ,  $p < 0.01$ )、面積は $913.6 \pm 1041.8 \mu\text{m}^2$  (コントロール群 $3157.2 \pm 2678.1 \mu\text{m}^2$   $p < 0.01$ ) と有意に減少していた。
  - 2) 神経叢1個あたりのHuC/D陽性細胞、Sox10陽性細胞はHG群で有意に減少していた。
  - 3) 神経叢単位面積当たりのSox10陽性細胞の数に両群で有意差はなかった
  - 4) 神経叢単位面積当たりのHuC/D陽性細胞の数は、HG群で有意に増加していた。これはHG群の1cmあたりの神経叢面積が非常に小さいためと考えている。

#### 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。

今回の結果からは、HuC/D染色にて、HuC/D陽性細胞が概ね、20個/1cm以上あれ

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。

多施設の様々な条件の異なる検体で検討したにも関わらず、2群間で有意差を持ったデータを得ることができた。

今後は統一した検索方法でデータを集積すれば、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

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10/cm以下、グリア細胞は100個/1cm以下であった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

義岡孝子, 中澤温子: Hirschsprung病とHirschsprung病類縁疾患の病理組織診断. 診断病理2014;31(4):283-290

##### 2. 学会発表

義岡孝子, 下島直樹, 三好きな, 孝橋賢一, 小田義直, 田口智章, 中澤温子: Hypoganglionosisの組織学的診断方法の検討. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山, 2014.11.28

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし