

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

分担研究報告書

ヒルシュスプルング病類縁疾患に対する病理学的検討

研究分担者 中澤 温子 東海大学医学部基盤診療学系 病理診断学 准教授
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】

H類縁で最も多い疾患であるcongenital isolated hypoganglionosis(以下CIH)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てきた。今回、CIHについて、HuC/D、Sox10、CD56などの抗体を使用した免疫組織学的手法を用い、神経節細胞の数、神経叢の数・面積などを測定し、正常群と統計学的に比較検討した。筋間神経叢におけるSox10/HuC/D陽性細胞比はCIH群で有意に低く、神経細胞とグリア細胞の数のアンバランスがCIHの組織学的特徴と推察された。

研究協力者

義岡 孝子（国立成育医療研究センター）
三好 きな（九州大学）

A．研究目的

HD類縁は、新生児期に発症し成人に至るまで長期の経過をたどる疾患であるが、稀少疾患であるがゆえにまとまった報告が少なく、病態も不明な点が多いため、国際的に統一された定義や分類はないのが現状である。

CIH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。免疫組織学的手法を用いて、神経節細胞の数、神経叢の数・面積などを測定し、正常群と統計学的に比較検討することにより、CIHにおける腸管神経系の組織学的異常所見を明らかにし、診断基準の確立を目指す。

B．研究方法

1.CIH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22

例（日齢1日～5.3歳）、CIH 18例（日齢1日～4.0歳；空腸10例、回腸8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および粘膜下神経叢における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 Statistics 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) CIH群ではHuC/D陽性細胞数 14.0 ± 11.4 (コントロール群 69.4 ± 59.4 , $p < 0.01$)、Sox10陽性細胞の数 33.8 ± 24.1 (コントロール群 224.4 ± 110.9 , $p < 0.01$) が有意に減少していた。
 - 2) HuC/D陽性細胞はCIH群では 20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CIH群では100個/1cm 以下であった。
 - 4) Sox10/HuC/D陽性細胞数比はCIH群において有意に減少していた。
- 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 33.8 ± 24.1 (コントロール群 224.4 ± 110.9 , $p < 0.01$)、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CIH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、CIH群で有意に増加していた。これはCIH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。
3. 粘膜下神経叢におけるHuC/D 陽性細胞数とSox10陽性細胞を計測した。

- 1) HuC/D陽性細胞およびSox10陽性細胞はCIH群で有意に減少していた。
- 2) 粘膜下神経叢ではSox10/HuC/D陽性細胞数比は両群で有意差を認めなかった。

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。

これまでの研究から、HuC/D染色にて、HuC/D陽性細胞が概ね、20個/1cm 以上あれば、CIHの可能性は低いと考えられた。今回、CIH群およびコントロール群の対象を乳幼児期に切除された小腸に限定し、組織学的に検索した。

Sox10/HuC/D 陽性細胞数比を検討した結果、筋間神経叢ではCIH群が有意に減少していたが、粘膜下神経叢では有意差は見られなかったことから、筋間神経叢での神経細胞とグリア細胞の数のアンバランスはCIHの組織学的特徴と考えられた。

多施設の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し、CIHの診断基準を策定できると考えられる。

E . 結論

HuC/D およびSox10を用いた免疫組織学的検討では、CIH症例の筋層間神経節細胞は全例で20個/1cm以下、グリア細胞は100個/1cm 以下であった。また、筋間神経叢におけるSox10/HuC/D 陽性細胞数比はCIH群で有意に低く、CIHの組織学的特徴と推察した。

F．研究発表

1．論文発表

なし

2．学会発表

- 1) 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: Hirschsprung病およびその類縁疾患における腸管神経系の異常. 第104回 日本病理学会総会 シンポジウム6 神経提症 - 発生生物学から考える発症機構 - (愛知県名古屋, 2015.5.1)

G．知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1．特許取得

無し

2．実用新案登録

無し

3．その他

無し