

Hirschsprung病類縁疾患に関する病理組織学的検討

義岡 孝子 国立成育医療研究センター病理診断部 部長
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】

Hirschsprung 病類縁疾患 (HD 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。

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

[平成26年度]

CIH の免疫組織学的評価について：

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）、CIH 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 Statistitics ver. 21 を用い、t 検定を行った。

[平成27年度]

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：具体的な評価方法は平成26年度の研究方法と同様である。

C. 研究結果

[平成26年度]

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 ± 4.82 （コントロール群 43.6 ± 21.8 , $p < 0.01$ ）、Sox10陽性細胞の数 37.08 ± 24.74 （コントロール群 285.6 ± 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 ± 12.5 （コントロール群 50.6 ± 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。

[平成27年度]

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。

4. 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。
5. 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。

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

- 1) 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) Taguchi T, Kobayashi H, Kanamori Y, Segawa O, Yamataka A, Sugiyama M, Iwanaka T, Shimojima N, Kuroda T, Nakazawa A, Oda Y, Miyoshi K, Ieiri

- S: Isolated intestinal neuronal dysplasia Type B(IND-B) in Japan:result from a nationwide survey. *Pediatric surgery international*, 2014;30:815-822
- 3) Ieiri S, Miyoshi K, Nagata K, Miyata J, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T. Current clinical features in diagnosis and treatment for immaturity of ganglia in Japan: analysis from 10-year nationwide survey. *Pediatr Surg Int*. 2015 Oct;31(10):949-54. doi:10.1007/s00383-015-3774-0. PubMed PMID: 26296508.
- 4) Taguchi T, Ieiri S, Miyoshi K, Kohashi K, Oda Y, Kubota A, Watanabe Y, Matsufuji H, Fukuzawa M, Tomomasa T. The incidence and outcome of allied disorders of Hirschsprung's disease in Japan: Results from a nationwide survey. *Asian J Surg*. 2017 Jan;40(1):29-34. doi: 10.1016/j.asjsur.2015.04.004. PubMed PMID: 26216257
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: Hypoganglionosis の組織学的診断方法の検討. 第 34 回 日本小児病理研究会学術集会 (岡山県岡山市, 2014.9.6)
- 2) 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— (愛知県名古屋市, 2015.5.1)
- 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