

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658264

研究課題名(和文)消化管内視鏡生検の病理診断標準化に関する基礎研究

研究課題名(英文)Fundamental study for the standardization of gastrointestinal endoscopy biopsies

研究代表者

中山 裕之(NAKAYAMA, Hiroyuki)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40155891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、イヌ・ネコの炎症性腸疾患(IBD)と低グレード・リンパ腫の診断基準の標準化と病態解明を目的とした。東京大学附属動物医療センター、日本動物高度医療センター、日本小動物医療センターで蛋白漏出性腸症を主訴に内視鏡を実施されたイヌ・ネコの生検症例について、同一方法で内視鏡生検の組織標本を作製し、複数の病理医により評価した。この病理診断と臨床的予後との相関解析、遺伝子クローナリティ検査の一致率調査、T/NK細胞の組織内分布および種々の分子マーカー発現率を比較した。本研究により胃腸内視鏡生検の病理診断標準化の指標が示されると同時にIBDと低グレード・リンパ腫の病理発生の相関が明確にされた。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to standardize the pathologic diagnostic criteria of canine and feline inflammatory bowel disease (IBD) and low grade lymphoma, and to elucidate the pathogenesis of the diseases. In Veterinary medical center, the University of Tokyo, Japan animal referral Medical Center (JARMeC), and Japan small animal Medical Center (JSAMC), the biopsy samples of feline and canine protein losing enteropathy admitted conducted endoscopy, were prepared and diagnosed with identical procedures and pathologists. The relationship between pathological diagnoses and clinical prognosis, gene clonality tests, T/NK cells distribution patterns, and the expression of various molecular markers were investigated, respectively. Present study provided the standardized indicators of endoscopic biopsy pathology diagnosis, and also revealed the close correlation between pathogenesis of IBD and low grade lymphoma.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・臨床病理

キーワード：内視鏡 炎症性胃腸疾患 リンパ腫 イヌ ネコ 病理診断

## 1. 研究開始当初の背景

World Small Animal Veterinary Association (WSAVA)グループは消化管の部位別に、正常粘膜の状態を明示した上で、部位ごとに注目すべき病変を設定し、その重症度を判定することを提言した。例えば、十二指腸では粘膜傷害、リンパ管拡張と炎症細胞反応について重症度評価をして、最終的に、正常、炎症、リンパ管拡張症、非炎症性疾患、その他のいずれかを総合的に判断することを推奨している。申請者らは、WSAVA 分類に従い内視鏡生検を病理的に診断・分類し、病理的スコアと臨床的スコア、すなわち CIBDAI (活動性、食欲、嘔吐、便の性状、排便頻度、体重減少を4段階評価)あるいは CCECAI (CIBDAI+アルブミン値、腹水と皮下浮腫、搔痒を4段階評価)との相関を予備的に検討したところ、有意な相関は確認できなかった。このため WSAVA が提唱する炎症病変の重症度評価は、臨床兆候を十分反映していない可能性があると考えている。一方、細胞異型に乏しい成熟リンパ球の増殖を特徴とする低グレードリンパ腫と慢性炎症の病理学的鑑別は困難な例が多いが、臨床的にこれらの病態を区別することは、治療方法の選択や予後との関連において非常に重要であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、タンパク漏出性腸の主体をなす炎症性腸疾患 (IBD) と低グレード・リンパ腫の病理診断基準の見直しと病態解明を目的とする。本研究では、これらの疾患の病態を内視鏡生検により得られた新鮮材料で検索し、形態学的異常の重症度と臨床症状の相関を明確にして、IBD の多彩な病理組織所見の中で、最も臨床的に意義の高い病態を明確にする。また現時点で鑑別の必要性が高いことが判明している低グレードリンパ腫と IBD の客観的鑑別のために有用なマーカーを明らかにする。本研究の知見はタンパク漏出性腸症の病理診断の標準化、原因解明、および治療・予防に非常に有用と考える。

## 3. 研究の方法

難治性の蛋白漏出性腸症を主訴に内視鏡を実施されたイヌ・ネコの生検症例について、一定方法 (ろ紙固定法) で内視鏡生検の組織標本を作製し、同一症例を複数の病理医により診断し結果を数値化する。この病理学的スコアと臨床的スコアとの相関解析、診断後1年の予後調査を行う。

さらに炎症性腸疾患、低グレード・リンパ腫と診断された症例について、それぞれ病理診断と遺伝子クローナリティ検査の一致率調査、T/NK 細胞と B 細胞の組織内分布評価、および細胞増殖周期関連分子マーカー発現率を比較し、その診断の正当性と鑑別点を明確にする。

以上の研究より慢性炎症性疾患と低グレ

ードリンパ腫との鑑別ポイントを明確にするとともに炎症性腸疾患において重視すべき項目を統計学的に解析して病理診断基準を明確化する。

## 4. 研究成果

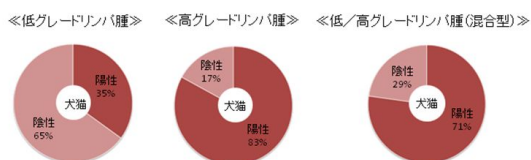
本研究では、主に東京大学付属動物医療センターと日本動物高度医療センター (JARMcC、川崎市)、および公益財団法人日本小動物医療センター (JSAMC) の協力を得て研究を遂行した。

東京大学動物医療センターおよび JSAMC との共同研究では、臨床的に慢性腸症と診断した犬の 117 症例において、消化管内視鏡検査により、胃、十二指腸、回腸、および結腸の生検組織を採取した。HE 染色標本を用いた病理組織学的検討を行い、慢性腸炎 (n=96) および大細胞型胃腸管リンパ腫 (n=21) に分類した。さらに、慢性腸炎については、WSAVA のガイドラインに従い、病理組織学的重症度を、軽度、中等度、重度 (リンパ球上皮向性 [—])、重度 (リンパ球上皮向性 [+]) の 4 群に分類した。PARR 解析については、十二指腸生検組織 DNA を用い、TCR $\gamma$ /IgH 遺伝子を増幅後、キャピラリー電気泳動を実施して陽性/陰性の判定を行った。その結果、病理組織学的に慢性腸炎と診断された症例においても PARR によって比較的高頻度にリンパ球 (ほとんどの症例で T リンパ球) のクローン性が認められ、さらに組織学的重症度が高くなるにしたがってクローン性陽性率が上がることが示された: 軽度 29%, 中等度 40%, 重度 (リンパ球上皮向性 [—]) 48%, 重度 (リンパ球上皮向性 [+]) 66%。一方、大細胞型胃腸管リンパ腫症例におけるクローン性陽性率は 76% であった。また、重度の慢性腸炎群における生存期間は軽度および中等度の慢性腸炎群におけるものよりも有意に短かった。以上の研究の結果、慢性腸炎の症例においても比較的高率にリンパ球のクローン性が証明されることが明らかになった。この様なリンパ球のクローン性の存在が、特定の抗原刺激による反応性増殖によるものか、あるいは小リンパ球様ではあっても腫瘍性増殖 (大細胞型胃腸管リンパ腫) によるものかについてはさらなる精査が必要と考えられた。さらに、慢性腸炎の病理組織学的重症度が予後因子となることが示され、その臨床的意義が示唆された。以上の結果は、2014 年度中に学会発表するとともに、学術雑誌への内容の公表を準備している。

一方、2011~2013 年 2 月の期間に、JRMcC において日本小動物消化器内視鏡生検ガイドラインが推奨する濾紙法により、病理組織検査を実施した 153 例のうち、クローナリティも実施した 111 例 (犬 90 例、猫 21 例) を対象として、組織診断とクローナリティ解析の相関を調査した。本研究の対象とした 111 例の組織診断は炎症 64 例、リンパ腫 44 例、他の腫瘍 3 例であった。診断別のクローナリ

ティ陽性率は炎症 12/64 例 (19%)、リンパ腫 21/44 例 (48%)、他の腫瘍 1/3 例 33%であった。動物別の診断とクローナリティ陽性率は、犬では炎症 4/52 例 (7%)、リンパ腫 16/36 例 (44%)、他の腫瘍 0/2 例 (0%)であった(表 1 中央)。猫では炎症 8/12 例 (67%)、リンパ腫 5/8 例 (63%)、他の腫瘍 1/1 例 (100%)であった。

リンパ腫のグレード別クローナリティ陽性率は、低グレードリンパ腫で 11/31 例 (35%)、高グレードリンパ腫で 5/6 例 (83%)、低グレードリンパ腫と高グレードリンパ腫の混合型では 5/7 例 (71%)であった(表 2)。また動物別では低グレードリンパ腫で犬 8/26 例 (31%)、猫 3/5 例 (60%)、高グレードリンパ腫で犬 4/5 例 (83%)、猫では 1/1 (100%)であった。低グレードと高グレードの混合型では犬 4/5 例 (80%)、猫 1/1 例 (50%)であった(下図)。



組織学的に炎症と診断した症例について、犬では多くの症例で組織診断とクローナリティ結果が一致したが、猫では半数以上がクローナリティ陽性であり低グレードリンパ腫の初期病変を炎症と診断している可能性が考えられる。リンパ腫と診断した症例では、犬の低グレードリンパ腫で組織診断とクローナリティ結果の一致率が低く、現在の内視鏡生検の診断の最も大きな問題点である。高グレードリンパ腫については犬猫ともに組織診断とクローナリティの一致率は高く、クローナリティ解析自体はリンパ腫の診断に有用と思われる。

今後の課題として、犬の低グレードリンパ腫で組織診断とクローナリティが一致しなかった症例の組織病変を再評価および炎症とリンパ腫の中間病変(グレーゾーン)の評価方法の検討が必要と思われる。また、組織学的にリンパ腫であったがクローナリティ陰性の症例については、病変のあるパラフィン切片を用いたクローナリティの有無の再評価も必要と思われた。以上の結果は、平成 25 年度に既に学会発表してその内容を公表した(業績学会発表)。

また、内視鏡による胃炎の評価において、しばしば問題となるヘリコバクター等のらせん菌の感染率と病理組織検査による摘発率の相関やその臨床症状の重篤度について評価する目的で、呼気試験法の有用性を検討した。呼気試験法と病理検査による摘発率には有意な相関がみられたが、その臨床的意義については十分解明することはできなかった。この研究成果は既に学術誌への公表をさせている(論文業績)。

さらに慢性炎症性腸疾患における上皮内リンパ球数の増加と fractalkine およびそのレセプターである CX3CR1 の発現の相関を調査した。CX3CR1 は、膜貫通型 fractalkine との結合により、細胞間接着が促進され、一方可溶性 fractalkine との結合により、NK 細胞、T 細胞、樹状細胞 (DCs)などの CX3CR1 陽性細胞の遊走が誘導されることか知られている。検索の結果、腸炎の重症化に伴いこれらの分子の発現が増加し、同時に上皮内リンパ球数が増加することが明らかになった。この他、慢性炎症性腸疾患における interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist の変化や IgA 分布の減少等について検討し、慢性炎症時におけるこれらの分子動態に関する情報が収集された。これらの研究成果は既に海外の学術雑誌へ結果の公表した(研究業績)。

本研究を通じて、内視鏡標本の病理診断の標準化が協力機関内で統一されたことにより、病態解析に関する基礎研究もより強力に推進することが可能になったと考える。今後は原因が不明なイヌ・ネコの慢性炎症性疾患およびこれに関連して発生する低グレードリンパ腫の病理発生機構の解明にその研究の中心において、検討を重ねる必要があると思われる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Maeda S, Ohno K, Uchida K, Nakashima K, Fukushima K, Tsukamoto A, Nakajima M, Fujino Y, Tsujimoto H. Decreased immunoglobulin A concentrations in feces, duodenum, and peripheral blood mononuclear cells of dogs with inflammatory bowel disease. 2013. J Vet Intern Med. 27(1): 47-55. (査読有)

doi: 10.1016/j.vetimm.2012.04.021.

Kubota S, Ohno K, Tsukamoto A, Maeda S, Murata Y, Nakashima K, Fukushima K, Uchida K, Fujino Y, Tsujimoto H. Value of the <sup>13</sup>C-Urea Breath Test for Detection of Gastric Helicobacter spp. Infection in Dogs Undergoing Endoscopic Examination. 2013. J Vet Med Sci. 75(8): 1049-1054. (査読有)

doi.org/10.1292/jvms.12-0528

Maeda S, Ohno K, Nakamura K, Uchida K, Nakashima K, Fukushima K, Nakajima M, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Tsujimoto H. Increased expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 in canine inflammatory bowel disease and their possible role in recruitment of intraepithelial lymphocytes. 2012. Vet Immunol Immunopathol 148: 26-35. (査読有)

doi: 10.1111/jvim.12023  
Maeda S, Ohno K, Nakamura K, Uchida K,  
Nakashima K, Fukushima K, Tsukamoto A,  
Goto-Koshino Y, Fujino Y, Tsujimoto H.  
Mucosal imbalance of interleukin-1 $\beta$  and  
interleukin-1 receptor antagonist in canine  
inflammatory bowel disease. 2012. Vet J.  
94(1): 66-70. (査読有)  
doi: 10.1016/j.tvjl.2012.02.026.

〔学会発表〕(計1件)

消化管内視鏡生検における炎症および  
リンパ腫の病理組織診断とクローナリ  
ティ検査の相関：二瓶和美、吉田桂子、  
内田和幸、小川博之。第34回動物臨床  
医学会年次大会。2013年11月15日～17  
日。(大阪市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.v.m.a.u-tokyo.ac.jp/byouri/research03/research03.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 裕之 (NAKAYAMA, Hiroyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：40155891

(2)研究分担者

内田 和幸 (UCHIDA, Kazuyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

授

研究者番号：10223554