

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08537

研究課題名(和文)先天性腸疾患における腸管神経系システムの解明

研究課題名(英文)Enteric Nervous System in Congenital Intestinal Disease

研究代表者

坂井 幸子(Sakai, Sachiko)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10710478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：新生児から生後3ヶ月までのHirschsprung病(H病)と非H病症例の腸管検体に対し、Calretinin免疫染色(CR染色)とCholine transporter免疫染色(ChT染色)をそれぞれ行った。CR染色は新生児期早期や早産児の症例においても非H病で全例陽性、対してH病では全例陰性であり、感度特異度ともに100%であった。ChT染色は、非H病腸管で全例陰性であったが、陽性所見がわかりにくく感度50%、特異度100%であった。これより、H病診断において、CR染色は新生児早期においても有用であるが、ChT染色の有用性は否定的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

H病診断のための直腸粘膜生検に対するAcetylcholinesterase染色(AChE染色)は、正診率が高いが、新生児早期では、粘膜固有層にAChE陽性である外来神経線維の代償性の増生がまだみられず、偽陰性になりうることであった。

今回の研究結果から、新生児期早期であっても、非H病腸管ではCR染色が陽性となり、H病ではCR染色陰性となることが確認できた。従来のAChE染色単独では不十分であった新生児期早期においても、AChE染色の補助診断としてCR染色を併用することで、より正確にH病診断を行えることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Calretinin(CR) immunostaining and Choline transporter(ChT) immunostaining were performed on intestinal specimens from neonates to 3 months of age in cases of Hirschsprung's disease(HD) and non-HD, respectively. CR immunostaining was positive in all cases of non-HD and negative in all cases of HD, even in the early neonatal period and in preterm infants, with a sensitivity and specificity of 100%; ChT immunostaining was negative in all cases of non-HD intestinal tracts, but the positive findings were difficult to recognize, with a sensitivity of 50% and specificity of 100%. Thus, CR immunostaining is useful in the diagnosis of HD, even in the early neonatal period, but the usefulness of ChT immunostaining is negative.

研究分野：小児外科学

キーワード：Hirschsprung病診断 calretinin免疫染色 choline transporter免疫染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化管機能障害は小児外科領域においては比較的頻度の高いものであるが、その原因は Hirschsprung 病 (H 病) を代表とし、H 病類縁疾患や先天性消化管奇形、後天的な慢性便秘症など多岐にわたり、診断に苦慮することも少なくない。H 病診断のための直腸粘膜生検に対する Acetylcholinesterase 染色 (AChE 染色) は、正診率が高いが、新生児早期では粘膜固有層に AChE 陽性である外来神経線維の代償性の増生がまだみられず偽陰性になりうることや、AChE 染色診断では評価者間に乖離があり、評価が難しいこと、また凍結標本の作製が必要となるなどの問題点が指摘されている。補助診断として Calretinin 免疫染色 (CR 染色) の有用性が報告されているが、CR 染色では内因性の神経節細胞と神経線維が陽性となり、H 病で増生している外来神経は陰性となり、CR 染色の陰性所見が H 病の診断となるため、染色技術によっては偽陽性が生じる可能性がある。また、無神経節腸管から正常腸管への移行帯では CR 染色は陽性となることがあり、病変部位が非常に短い ultra-short segment type では偽陰性が生じやすい。さらに、AChE 染色で問題となる新生児期早期や早産児での CR 染色の有用性についてのまとまった報告はない。

AChE 染色にかわる新たな診断法として Choline transporter 免疫染色 (ChT 染色) の有用性が 2017 年に報告された。ChT はアセチルコリン生合成での律速段階である神経末端へのコリンの取り込みを調整しており、通常の大腸では、他のコリン作動性マーカーと共に免疫染色で確認することができる。ChT 染色では AChE 染色と同様に H 病での外来神経線維の異常増生を染めることができ、かつホルマリン固定標本でも染色可能であるため、AChE 染色と同等の正確性で、より簡便に H 病診断を行える可能性がある。さらに、従来不可能であった過去の検体に対する外来神経線維の増生を ChT 染色で染色可能であれば、様々な新生児消化管疾患における腸管神経系システムの解析を行うことが可能となる。

2. 研究の目的

従来の AChE 染色のみでは困難であった新生児期早期や早産児でも、CR 染色と ChT 染色を組み合わせることで、AChE 染色に代わる H 病の確定診断法となり得ることを証明することを目的とした。さらに、H 病類縁疾患や先天性腸疾患の患者の腸管検体に対し、ChT 染色や他の神経系マーカーを用いて染色することで、先天性腸疾患の腸管神経系システムの解明を行うことを目指した。

3. 研究の方法

過去 10 年間に本研究施設群で、新生児から生後 3 ヶ月までの期間に何らかの原因で腸管組織を採取した患者を対象とし、対象症例の既存腸管ホルマリン検体に対し CR 染色と ChT 染色をそれぞれ行い、染色結果から H 病が診断し得るか評価した。

免疫染色方法は CR 染色では一次抗体は Rabbit Anti-Human Calretinin Monoclonal Antibody (Roche 社) を等倍で、ChT 染色は Rabbit Anti-Cholin transporter Polyclonal Antibody (Millipore 社) を 500 倍希釈して一次抗体反応を行った。評価は小児外科専門医が標本を確認し、抗体反応が陽性か陰性かそれぞれ判定した。対象症例の注腸造影検査やマンモトリーの結果、病理組織学的診断、臨床経過をカルテから抽出し、免疫染色結果と比較検討した。

4. 研究成果

壊死や検体不良により評価困難な症例を除いた対象症例は 21 例 (H 病 4 例、非 H 病 17 例) であった。H 病 4 例とも直腸粘膜生検で、生検時日齢は中央値 39 日 (33 ~ 109 日) であった。非 H 病 17 例は全て手術中に得た腸管検体で、手術時日齢は中央値 4 日 (1 ~ 98 日) であった。小腸が 16 例、結腸は 1 例のみで、非 H 病の対象症例中に直腸粘膜生検は無かった (表 1)。

表1 対象21例についての詳細

	H病 4例	非H病 17例
出生時体重 (g)	3041 (2238~3262)	2062 (692~3230)
在胎週数 (週)	38.5 (37~40)	35 (24~39)
原疾患 (例)	long segment 2 short segment 1 total colon 1	消化管穿孔 10 小腸閉鎖 3 メッケル憩室 2 小腸捻転 1 癒着性イレウス 1
生検・手術時日齢 (日)	39 (33~109)	4 (1~98)

染色結果について以下に示す。CR 染色は、非 H 病症例では、17 例全例において、粘膜下層に CR 陽性の神経節細胞を確認でき、かつ粘膜下層から粘膜固有層にかけて、CR 陽性の神経線維を明瞭に確認できた。逆に H 病症例では、肥満細胞は染色されているものの、CR 陽性の神経線維や神経節細胞は全 4 症例で認めなかった (図 1)。H 病診断としての CR 染色は、新生児期早期や早産児の症例を含め、感度・特異度ともに 100% であった (表 2)。

ChT染色は、非H病症例では、全症例で粘膜下層、粘膜固有層いずれにも明らかなChT陽性神経線維を認めなかった。対してH病症例では、粘膜下層に淡い点状の陽性線維を確認できるものの、太い異常神経束としては確認できず、点状に淡い陽性線維を一部で認めるのみであった(図2矢印)。点状の陽性所見が明らかなものはChT陽性とし、はっきりしないものはChT染色陰性とした。その結果、H病腸管での陽性は4例中2例となり、H病診断におけるChT染色の感度は50%、特異度は100%であった(表2)。

図1 CR染色：左 陽性(非H病)，右 陰性(H病)

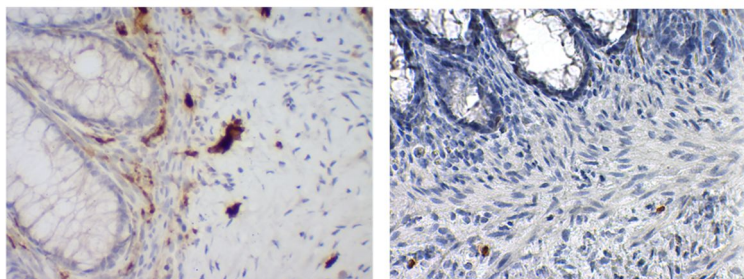
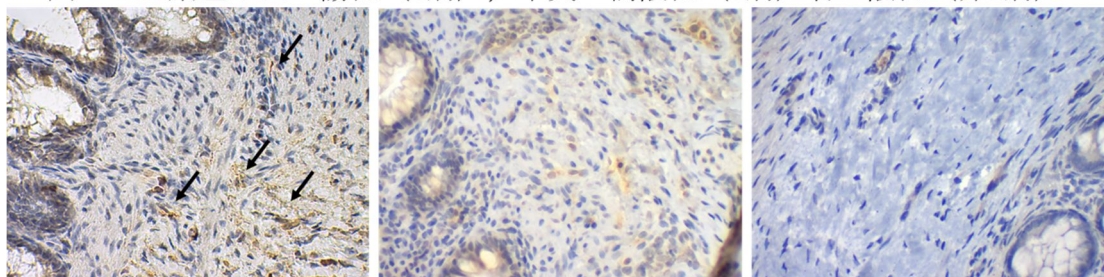


図2 ChT染色：左 陽性(H病)，中央 偽陰性(H病) 右 陰性(非H病)



以上の結果より、H病診断において、CR染色は新生児早期においても有用であるが、ChT染色の有用性は否定的であった。

ChT以外の他の神経線維マーカーとしてコリンアセチル基転移酵素(ChAT)、ニューロン細胞質蛋白9.5(PGP9.5)、s100などの抗体を用いた免疫染色を施行した。いずれも正常神経線維も染まるため、H病の異常神経線維束も染色される一方、非H病腸管でも陽性となるため特異度が低く、H病診断においての有用性は示すことはできなかった。

表2 全21例の染色結果

	CR染色陽性	CR染色陰性
H病	0	4
非H病	17	0

	ChT染色陽性	ChT染色陰性
H病	2	2
非H病	0	17

今回の研究では、症例数が少なくかつ非H病症例で直腸粘膜生検がなく、小腸の検体がほとんどではあったが、CR染色は感度特異度ともに100%であった。早産低出生体重児の新生児期でも、非H病症例の腸管の粘膜下層から粘膜固有層にかけて、CR染色陽性神経線維を確認できたことから、AChE染色単独では偽陰性が生じる新生児早期の直腸粘膜生検においても、補助診断としてCR染色を行うことで、より正確なH病診断を行うことが可能となる。

またH病診断において、AChE染色の代替手段としてのChT染色の有用性は否定的ではあったが、パラフィン固定検体をもちいたCR染色を補完する一手段とはなり得る可能性はある。今後他の神経系マーカーとともにさらなる検討が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂井幸子
2. 発表標題 Hirschsprung病診断でのcalretininとcholine transporter免疫染色併用の有用性の検討
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保田 良浩 (Kubota Yoshihiro) (30305601)	滋賀医科大学・医学部・非常勤講師 (14202)	
研究分担者	加藤 久尚 (Kato Hisataka) (40756756)	滋賀医科大学・医学部・医員 (14202)	
研究分担者	谷 眞至 (Tani Masaji) (60236677)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	
研究分担者	清水 智治 (Shimizu Tomoharu) (70402708)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田尻 達郎 (Tajiri Tatsuro) (80304806)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関