

和文題名

Hirschsprung 病腸管の神経節細胞の局在についての免疫組織化学
的検討

所属

- 1) 昭和大学医学部臨床病理診断学講座
- 2) 昭和大学横浜市北部病院こどもセンター小児外科
- 3) 昭和大学横浜市北部病院臨床病理診断科
- 4) 昭和大学医学部外科学講座小児外科学部門

著者名

福永 奈津^{1,2)}, 亀山 香織³⁾, 本間 まゆみ¹⁾, 佐々木 陽介¹⁾,
根本 哲生³⁾, 渡井 有⁴⁾, 矢持 淑子¹⁾

ランニングタイトル

H D 腸管の神経節細胞の局在

連絡先（責任者著者名）および所属

福永 奈津

natsummer.f@gmail.com

昭和大学医学部臨床病理診断学講座

抄録

ヒルシュスプルング病(以下 HD)は消化管の粘膜下神経叢(Meissner 神経叢)と筋層間神経叢(Auerbach 神経叢)の神経節細胞の先天性欠如が原因で機能的腸閉塞をきたす疾患である。今日行われている HD 根治術は肛門から連続する病変部を切除し、正常腸管と肛門を吻合する方法である。術中には正常と思われる腸管組織を迅速診断に提出し、神経節細胞の数や有無を確認して切除範囲を決定する。しかし正常部の神経節細胞の数や術中迅速診断の方法は規定されておらず、切除範囲を決定する基準がないのが現状である。今回、効率的な術中迅速診断をするために必要となる HD 腸管の神経節細胞の局在や吻合部の細胞数を明らかにすべく、病理組織学的に検討した。

対象は昭和大学病院および昭和大学横浜市北部病院小児外科で手術を行った HD 症例 9 例である。切除腸管の全割標本を作製し、Hu C/D の免疫染色を用いて神経節細胞数や分布を検討した。

自験例では生後 2-4 ヶ月の HD 患者の吻合部腸管の Meissner と Auerbach 神経節細胞数はそれぞれ 93.77 ± 20.9 個/cm, 110.3 ± 23.0 個/cm であった。

無神経節腸管が 10mm 以下の 2 例では神経節細胞は全周性に同じ高さから分布していたが、無神経節腸管が 33mm 以上であった 5 例は腸間膜側よりも対側でより肛門側まで神経節細胞が認められる傾向にあった。また腸間膜対側で神経節細胞が 100 個/cm 以上認められて

も腸管膜側では神経節細胞が見られない症例が3例見られ、そのうち1例は口側断端の腸間膜側約30%が無神経節腸管であった。

術中迅速診断では腸間膜側と対側の複数ヶ所の組織をし、神経節細胞の分布に不均一性がなく、Auerbach神経節細胞数が100個/cm以上ある腸管を正常腸管とみなすことで過不足なく病変部を切除することができると考える。

ヒルシュスプルング病; Hu C/D; 神経節細胞

諸言

ヒルシュスプルング病(Hirschsprung's Disease:以下 HD)は消化管の神経節細胞の先天性欠如が原因で、消化管の蠕動不良を起こし、機能的腸閉塞をきたす疾患である。神経叢には腺分泌を調整する粘膜下層神経叢(Meissner神経叢)と消化管運動を制御する固有筋層間神経叢(Auerbach神経叢)があり、HDはこれらが欠如する¹⁾。無神経節腸管は肛門から連続的に口側へ広がる。5000人に1人の発症頻度とされ、約40%が新生児期に診断される²⁻⁴⁾。

無神経節腸管は蠕動がなく、糞便の通過がないため狭小化し、その口側の正常腸管では糞便が滞留するため拡張腸管となる。この口径差を caliber change と呼び、注腸造影や術中所見で肉眼的に確認できる所見である^{2,3)}。対して、組織学的には無神経節腸管と正常部腸管の間に神経節細胞が正常部よりも減少している移行帯と呼ばれる部分が存在する。今日行われている HD 根治術は、病変部を切除し、正常

と思われる腸管と肛門を吻合するものである。移行帯での腸管吻合後に便秘症状が残存した症例が報告されているため、十分な排便機能を得るためには無神経節腸管だけでなく移行帯も切除しなければならない^{4,5)}。しかし、神経節細胞数についての正常値は複数報告が見られるが、病理組織標本上1 cm 当たり 30 個から 100 個以上と一貫性がなく、移行帯についても組織学的に標準化された規定がない^{3,5-9)}。手術時に適切な吻合部かを確認するために caliber change を目安に腸管壁全層の組織を術中迅速診断に提出する施設が多いが、神経節細胞の有無だけを確認する方法や、神経節細胞数をカウントする方法など施設ごとに異なっている^{2,3)}。移行帯の長さは 2-5cm と報告されているが、10cm 以上の症例も報告されており、切除範囲を決定する基準についての組織学的な裏付けがないのが現状である^{4,5)}。今回われわれは、より確実な手術を行うための術中迅速診断が行えるよう、神経節細胞の局在と細胞数を明らかにすべく、術後に Hematoxylin Eosin (以下 HE)染色で評価された HD 患者の腸管組織を免疫組織化学的に再評価し、検討した。

研究方法

対象は、2016年11月から2021年3月に昭和大学病院および昭和大学横浜市北部病院で手術を行った HD 症例 9 例 (Table.1) である。その内訳は男児 5 例、女児 4 例で、生後 2-20 ヶ月 (平均 4.9 ヶ月、中央値 3 ヶ月) である。併存疾患は 21trisomy が 2 例、腸回転異常症が

1例, 先天性心疾患が1例であった. 術式は全て Pull-through 法で行った. これは肛門から腹膜翻転部は腸管粘膜下層まで, 腹膜翻転部から口側は腸管壁全層で全周性に, 移行帯を含めた病変部を切除し, 正常と思われる腸管と肛門を吻合する方法である. 病変部の長い症例や腸間膜の処理を要する症例は腹腔鏡を併用した. 症例 1-7 は, 術中迅速診断で消化管蠕動を担う Auerbach 神経節細胞数を確認し, Taguchi ら⁸⁾の Auerbach 神経節細胞数の基準 (3ヶ月未満で 117.9 ± 26.0 個/cm, 3ヶ月以上1歳未満で 63.3 ± 23.4 個/cm, 1歳以上10歳未満 64.8 ± 23.2 個/cm, 10歳以上で 38.6 ± 13.4 個/cm) を目安に腸管の切除ラインを決定した. 症例 8, 9 は神経節細胞の有無のみを術中迅速診断で確認されていた. 全症例, 術後は排便困難や腸炎を起こすことなく外来で経過観察されていた.

根治術で切除され, 10%ホルマリンに固定された腸管を肛門側から 3-4mm 幅で短軸方向に全割し, パラフィン包埋をした. $4\mu\text{m}$ の薄切標本を作製し, HE 染色をした. 神経節細胞の同定のための免疫染色は Hu C/D (clone 16A11, 1:500; invitrogen, Massachusetts, USA), Calretinin (clone DAK Calret 1, 1:200; Dako, Glostrup, Denmark), PHOX2B (clone EPR14423, 1:200; abcam, Cambridge, UK), Bcl-2 (clone 124, 1:50; Dako, Glostrup, Denmark) モノクローナル抗体を用いた. 免疫染色は自動染色装置 ("BOND-III", Leica Biosystems, Newcastle, UK) で行い, 本装置のプロトコールに準じた. 抗原賦活化は Bcl-2 で BOND epitope retrieval solution 1 (Leica Biosystems, Newcastle, UK),

そのほかの抗体は BOND epitope retrieval solution 2 を用いて熱処理 (Heat-induced Epitope Retrieval) を 20 分間行なった。

これらの病理組織標本を用いて以下の手順で研究を進めた。

1. 上記の免疫染色の中から神経節細胞の識別に最適な抗体を選定した。
2. 1 の染色を用いて病理組織標本上、腸管 5mm 当たりの Meissner および Auerbach 神経節細胞数をそれぞれカウントしてマッピングをし、分布を比較した。
3. 術中迅速診断での神経節細胞数と切除腸管の口側断端の神経節細胞数の平均を比較した。
4. 月齢での神経節細胞数に有意差を認めるか統計学的精査を行って比較検討した。
5. 2-4 の結果をふまえ、無神経節腸管と移行帯の長さを比較検討した。

本研究は、昭和大学医学部「人を対象とする研究等に関する倫理委員会」(承認番号 3468) の承認を受けた。

結果

1. 染色方法の選定(Fig.1)

HE 染色では、Meissner 神経節細胞は線維芽細胞や血管内皮細胞、Auerbach 神経節細胞はシュワン細胞など他の組織と区別がつきにくかった。

Calretinin では Meissner 神経節細胞は染色されるが, Auerbach 神経節細胞はほとんど染色されなかった. また, 神経節細胞が確認される部分では粘膜層や粘膜下層に Calretinin 陽性の神経線維を認めたが, 無神経節腸管では認めなかった.

PHOX2B は希釈倍率を 1000 倍および 200 倍で検討したが, どちらも染色不良で神経節細胞の認識は困難であった. また, 3 年間以上ホルマリンに浸漬した標本もあり, それらは特に染色性が不良であった.

BCL-2 では神経節細胞の細胞質が染色された. ホルマリンに 3 年間浸漬した標本では染色不良であった. 術後 1 ヶ月以内に染色したものは染色良好であったが, 炎症細胞などの神経節細胞以外の組織も染色された.

Hu C/D は, ホルマリンに 3 年間以上浸漬された標本も, 術後 1 ヶ月以内に作製された標本も染色性に変わりはない. 神経節細胞は特異的に染色されるため, 容易に認識できた. また, 全周性で標本作製することにより, 腸間膜側と対側における神経節細胞の分布の差も簡便に視認できた (Fig.2) .

2. 神経節細胞のマッピング, 分布の検討

1 の結果より, Hu C/D が神経節細胞を認識するのに最適な抗体であった. Hu C/D で核周囲または核が陽性, もしくは核の周囲の少なくとも 50% が陽性であった細胞を神経節細胞としてカウントした^{6,7)}. 病理組織標本上腸管を 5 mm ごとに区切って Meissner および

Auerbach 神経節細胞の数をそれぞれカウントし、5mm 当たりの神経節細胞が 0 個の部分青色、50 個以上の部分を赤色とし、グラデーションになるように色分けしてマッピングをした(Fig.3-a~i). また、Pull-through 法では腹膜翻転部より肛門側では粘膜下層までしか採取できないため、Auerbach 神経叢を観察できなかった部分は灰色にマッピングをした.

症例 1 は、術中迅速診断で腸間膜対側に 1cm 当たり Auerbach 神経節細胞が 115 個あることを確認されていた. マッピング(Fig3-a)では、神経節細胞の出現は全周で同じ高さであった. 無神経節腸管は 4mm であった.

症例 2 は、術中迅速診断で腸間膜対側に 1cm 当たり Auerbach 神経節細胞数が 105 個あることを確認されていた. マッピング(Fig3-b)では、神経節細胞は腸管膜対側の方が腸間膜側よりも肛門側まで認められた. 無神経節腸管は 62mm であった.

症例 3 は術中迅速診断で腸間膜対側に 1cm 当たり Auerbach 神経節細胞数が 125 個あることを確認されていた. マッピング(Fig3-c)では、神経節細胞の出現は全周で同じ高さであった. 無神経節腸管は 8mm であった.

症例 4 は、術中迅速診断で腸間膜対側に 1cm 当たり Auerbach 神経節細胞数が 110 個あることを確認されていた. 病理組織学的に無神経節の部分は認めなかったが、肛門側断端の神経節細胞数は腸管 1cm あたり 10 個未満であった(Fig3-d).

症例 5 は術中迅速診断を 3 回行った症例であった。1, 2 回目は Auerbach 神経節細胞数が 0 個であり, 3 回目に腸間膜対側に 1cm 当たり Meissner 神経節細胞が 94 個, Auerbach 神経節細胞が 35 個あることを確認されていた。マッピング(Fig3-e)では, 神経節細胞は腸管膜対側の方が腸間膜側よりも肛門側まで認められた。また, Auerbach と Meissner 神経節細胞の分布はほぼ同じであった。無神経節腸管は 131mm であった。

症例 6 では, 術中迅速診断で腸間膜対側に 1cm 当たり Auerbach 神経節細胞数が 96 個あることを確認されていた。マッピング(Fig3-f)では, 神経節細胞は腸管膜対側の方が腸間膜側よりも僅かに肛門側まで認められたが, 分布は不均一であった。無神経節腸管は 33mm であった。

症例 7 では術中に caliber change を横行結腸に認めた。術中迅速診断で腸間膜対側に 1cm 当たり Auerbach 神経節細胞数が 120 個以上あることを確認されていた。マッピング(Fig3-g)では, 無神経節腸管は 103mm であった。腸間膜対側で 100 個/cm 以上の神経節細胞が認められるにもかかわらず, 腸間膜側では神経節細胞が見られない部分が 21mm あった。

症例 8 は術中迅速診断で神経節細胞があることを確認されていた。病変部が短かったため腸管壁全層が採取できた部分が短く, Auerbach 神経節細胞はほぼ観察できなかつた(Fig3-h)。

症例 9 は術中に caliber change を横行結腸に認めた。術中迅速診断で神経節細胞があることを確認されていた。マッピング (Fig3-i) では、口側断端は、全周性に観察すると腸管膜側の約 30% が無神経節腸管であった。無神経節腸管の長さは自験例の中で最長の 226mm であった。

病変部が腹膜翻転部より口側まで見られ、Auerbach 神経叢が観察できた症例 5, 7, 9 では、Meissner と Auerbach 神経節細胞の分布はほぼ同じであった。全周性に比較すると、症例 2, 5, 6, 7, 9 では神経節細胞が腸管膜側よりも腸管膜対側でより肛門側まで認められた。

3. 術中迅速診断と口側断端の神経節細胞数の比較

各症例の吻合部の全周（切除腸管の口側断端）の神経節細胞数を 1 cm 当たりの細胞数に換算し、術中迅速診断の Auerbach 神経節細胞数と比較した (Table.2, Fig.4)。症例 8, 9 は術中迅速診断で神経節細胞の有無のみを確認したため Fig.4 のグラフからは除外した。症例 1, 3, 4, 6, 7 は術中迅速診断での神経節細胞数と、全周性の神経節細胞数はほぼ同じであった。症例 2 は術中迅速診断の結果よりも口側断端の細胞数の方が少なく、症例 5 は術中迅速診断よりも切除腸管の口側断端の神経節細胞数の平均の方が 70 個以上多い結果であった。

4. 月齢ごとの神経節細胞数の検討 (Table.2)

前述の通り、Taguchi ら⁸⁾が Auerbach 神経節細胞数の基準値を生後 3 ヶ月未満と 3 ヶ月から 1 歳未満で分類していたのになら、生後 20 ヶ月の症例 8 と、口側断端の約 30% が無神経節腸管であった症例 9

を除き, Mann-Whitney 検定で生後 2 ヶ月の 2 例(症例 4, 7)と生後 3, 4 ヶ月の 5 例(症例 1-3, 5, 6)で口側断端の Meissner と Auerbach 神経節細胞数を比較した. 口側断端の Meissner と Auerbach 神経節細胞数はそれぞれ生後 2 ヶ月の症例では 93.3 ± 16.9 個/cm, 127.6 ± 20.4 個/cm, 3, 4 ヶ月の症例では 94.0 ± 24.1 個/cm, 103.4 ± 21.9 個/cm であった. 生後 3 ヶ月未満と 3 ヶ月以上 1 歳未満での Meissner および Auerbach 神経節細胞の数に有意差はなかった. 生後 2-4 ヶ月のヒルシュスプルング病患者の正常腸管の Meissner 神経節細胞数は 93.77 ± 20.9 個/cm, Auerbach 神経節細胞数は 110.3 ± 23.0 個/cm であった.

5. 無神経節腸管と移行帯の長さの比較

2-4 の結果より Meissner または Auerbach 神経節細胞の分布はほぼ同じであり, 切除腸管の口側断端の細胞数も 100 個/cm 前後であった. これらを考慮し, 本研究では以下の条件を移行帯と定義した.

- ① Auerbach 神経節細胞数 (または Meissner 神経節細胞数) が正常と考えられる 100 個/cm の半数以下の部分が半周以上を占める範囲. すなわち, Fig.3-a~j で 5mm 当たり 20-29 個以下が半周以上を占める範囲.
- ② 無神経節腸管と連続性を持ち, かつ全周のうち部分的に無神経節腸管を認める範囲.

それぞれの症例で移行帯の長さを計測した. Fig.3-a~i に矢印で表記し, 無神経節腸管の長さとともに Table.3 に記載した. 自験例の移行帯の長さは, 最短が 9mm(症例 6), 最長が 49mm (症例 9) であった.

考察

1. 染色方法の選定

本研究で主に用いた免疫染色 Hu C/D タンパクは腸管神経系を含め、中枢および末梢神経で神経マーカーとして使われる染色である⁷⁾。HE 染色では、Meissner 神経節細胞は線維芽細胞や血管内皮細胞、Auerbach 神経節細胞はシュワン細胞など他の組織と区別がつきにくい⁸⁾が、Hu C/D では神経節細胞は特異的に染色されるため識別が容易であった。

2. 神経節細胞のマッピング、分布の検討

ヒルシュスプルング病は迷走神経領域と腰仙髄領域の神経堤細胞 (neural crest cells: NCCs) から発生する腸管神経系 (enteric nervous system: ENS) の発育不良が原因と考えられている。胎生 4-5 週に迷走神経領域の NCCs が前腸 (体節レベル 1-7) に発生し、胎生 6 週にかけて消化管の頭側から尾側方向に前腸から中腸を NCCs が遊走する。一方で、迷走神経領域由来の NCCs が結腸に到達するよりも先に、胎生 7 週に腰仙髄領域の NCCs が後腸 (体節レベル 28) から発生し、尾側から頭側方向に遊走する。胎生 8 週に NCCs は全ての腸管に分布する。HD は肛門側から連続性に病変部が存在することから、NCCs の遊走に障害が生じることで無神経節腸管が生じると考えられている^{3, 10, 11)}。また近年、NCCs の一部は腸管膜を横切る「近道移動」によって大腸に侵入することが明らかになっている¹²⁾。この「近道移動」

が障害されることで、症例 2, 5, 6, 7, 9 のように腸間膜側よりも腸間膜対側で神経節細胞が肛門側まで認められる傾向になる可能性も考えられるが、メカニズムは判明していない。

次に腸管神経叢の分化に関して、内輪筋層が分化した時期に Auerbach 神経叢の原基が形成される。その後、Auerbach 神経叢内の神経節細胞が内輪筋層を横断し、粘膜下層に到達することで Meissner 神経叢が形成されると考えられている¹⁰⁻¹³⁾。病変部が腹膜翻転部より口側まで見られ、Auerbach 神経叢が観察できた症例 5, 7, 9 では、Meissner と Auerbach 神経節細胞の分布はほぼ同じであった。

3. 術中迅速診断と口側断端の神経節細胞数の比較

症例 2 は術中迅速診断の結果よりも口側断端の細胞数の方が少なかった。マッピング (Fig.3-b) を参照すると、神経節細胞の数は全周性に不均一であり、術中迅速診断では神経節細胞が多い部分が採取された可能性がある。症例 5 は術中迅速診断よりも切除腸管の口側断端の神経節細胞数の平均の方が多かった。他の症例は Auerbach 神経節細胞数のみをカウントしていたが、症例 5 では術中迅速診断の回数重なったため Meissner 神経節細胞数も評価し、97 個見られたため吻合可能と判断されていた。腸管壁内でも均一に神経節細胞が見られるわけでないため、採取部位により細胞数が多い部分と少ない部分があると考えられる。術中迅速診断では Auerbach 神経節細胞だけでなく Meissner 神経節細胞数も同時に評価をすることで、患児により長い腸管を残しつつより確実な手術を行える可能性がある。症例 8, 9 は神

神経節細胞の有無のみを確認した症例である。症例 8 は 1 歳を超えた症例であり、口側断端の神経節細胞数と前述の Taguchi ら⁸⁾の基準（1 歳以上 10 歳未満の Auerbach 神経節細胞数 64.8 ± 23.2 個/cm）は近似値であった。本研究では 1 歳以上は 1 症例しかなく、正常値の検討はできなかった。症例 9 では腸管膜対側で術中迅速診断を行なったため、口側断端の無神経節腸管の残存に気付くことができなかったと考えられる。本症例と同様に病理組織学的に部分的な無神経節腸管が残存していたため再手術を行なった症例報告もみられた¹⁴⁾。本症例は、術後に便秘症状をきたすことなく経過しているが、排泄訓練以降まで長期的な経過を追う必要があると考えられる。

4. 月齢ごとの神経節細胞数の検討

Taguchi ら⁸⁾によると前述の通り、正常の Auerbach 神経叢の神経節細胞数は月齢や年齢によって異なっている。本研究で得られた生後 3 ヶ月未満と、生後 3, 4 ヶ月の症例では口側断端の神経節細胞の数に有意差はなかった。Taguchi らは月齢が 3 ヶ月未満と 3 ヶ月以上から 1 歳までで分類していたが、本研究では生後 3, 4 ヶ月の症例のみと偏りがあったため、神経節細胞数や月齢での有意差に関して結果が異なると考えられる。また、HD は染色体異常や先天奇形との合併率はそれぞれ 12%、18% であり¹³⁾、本研究の対象者には 9 例中 3 例が合併症を有していた。HD による腸閉塞だけでなく合併症によりさらに成長が遅れることが予測され、健常児とは腸管の長さや太さ、神経節細胞の数が異なる可能性がある。健常児での正常の神経節細胞の分布

や数を解析するべきであるが，本研究では HD 患児の腸管のみを対象とした．

5. 無神経節腸管と移行帯の長さの比較

HD は注腸造影や術中所見の病変部の長さによって下記の 5 つの病型に分類されている³⁾．

- 1) Ultrashort segment aganglionosis:直腸肛門管下 3 分の 1 にみられるタイプで，生理的な神経節細胞減少部分と区別がつけ難いもの．
- 2) Short segment aganglionosis:無神経節腸管が直腸，S 状結腸に局限するもの．
- 3) Long segment aganglionosis: 直腸から下行結腸，肝彎曲部を含む口側結腸に及ぶもの．
- 4) Total colon aganglionosis:直腸から結腸全体に及ぶもの．
- 5) Extensive aganglionosis:無神経節腸管が直腸から全結腸におよび小腸に及ぶもの．

本研究の対象となった 9 例の病域分類は Ultrashort 型が 1 例，Short 型が 5 例，Long 型が 2 例であった．症例 4 は標本上では無神経節腸管は確認できなかったが，肛門側断端の神経節細胞の減少が見られた．術後には，術前に見られていた腹部膨満や便秘が解消され，以上の臨床経過と病理組織学的所見から Ultrashort 型に分類された．

移行帯は，無神経節腸管と正常腸管の間の腸管を指し，組織学的には神経節細胞の減少や，太い神経線維束の存在，全周のうち部分的な無神経節腸管などさまざまな特徴が挙げられているが，標準化された

基準は決まっていない^{4,5)}。本研究では結果で示した条件を移行帯と定義した。

移行帯では、症例 1, 3, 5, 6 のように神経節細胞が段階的に増加する症例がほとんどであったが、症例 7 のように急激に増加する症例も見られた。また、神経節細胞は腸間膜側よりも腸間膜対側の方がより肛門側まで認められることが報告されており^{2,15)}、自験例では無神経節腸管の長さが 33mm 以上であった症例 2, 5, 6, 7, 9 で同様の所見が見られた。中でも無神経節腸管が 100mm 以上の症例 5, 7, 9 では腸管膜対側で 100 個/cm 以上の神経節細胞を認めたが、腸管膜側では神経節細胞が確認できない部分があった。一方で、無神経節腸管の長さが 10mm 以下であった症例 1, 3, 4 では神経節細胞は腸間膜側も対側も同じ高さから分布していた。本研究では無神経節腸管が長い症例ほど腸間膜側と対側での神経節細胞の分布差がはっきり見られた。

移行帯は、無神経節腸管が長ければ長いほど移行帯も長い、という報告がある⁵⁾。自験例の中で無神経節腸管が最長であった症例 9 は移行帯も最長であった。しかし、病型分類で比較してみると症例 9 とともに Long 型に分類された症例 7 は部分的な無神経節腸管が 21mm 認められたのみで、神経節細胞数が半数以下の範囲はほとんど見られなかった。また、症例 7 よりも無神経節腸管が短い症例 1, 3, 5, 8 と症例 7 を比較すると、移行帯は症例 7 の方が短かった。これは月齢や腸管長の個人差が関係している可能性もあるが、無神経節腸管が長くても移行帯が長いとは一概には言えなかった。

腸間膜対側で神経節細胞が 100 個/cm 以上認められても，腸間膜側では無神経節腸管であることがあるため，術中迅速診断では腸間膜側と腸間膜対側の複数ヶ所の組織を観察し，神経節細胞の分布に不均一性がないかを確認することが望ましい．そして腸管蠕動を司る Auerbach 神経節細胞が 100 個/cm 以上神経節細胞がある部分を正常腸管とみなし，過不足なく病変部を切除することが良好な手術予後を決定すると考える．

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない．

文献

- 1) Benarroch EF. Enteric nervous system: Functional organization and neurologic implications. *Neurology*. 2007;**69**:1953-1957
- 2) 玉城昭彦，吉丸耕一郎，入江敬子，ほか: Hirschsprung 病および Hirschsprung 病類縁疾患の病理と臨床．*病理と臨床*．2020;**38**:677-686
- 3) 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**:283-290
- 4) Kapur RP. Histology of the Transition zone in Hirschsprung Disease. *Am J Surg Pathol*. 2016;**40**:1637-1646

- 5) Coyle D, O'Donnell AM, Tomuschat C, *et al.* The Extent of the Transition Zone in Hirschsprung Disease. *J Pediatr Surg.* 2019;**54**:2318-2324
- 6) Swaminathan M, Kapur RP. Counting myenteric ganglion cells in histologic sections: an empirical approach. *Hum Pathol.* 2010;**41**:1097-1108
- 7) Yoshimaru K, Taguhi T, Obata S, *et al.* Immunostaining for Hu C/D and CD56 is useful for a definitive histopathological diagnosis of congenital and acquired isolated hypoganglionosis. *Virchows Arch.* 2017;**470**:679-685.
- 8) Taguchi T, Masumoto K, Ieiri S, *et al.* New classification of hypoganglionosis: congenital and acquired hypoganglionosis. *J Pediatr Surg.* 2006;**41**:2046-51.
- 9) Smith VV. Intestinal neuronal density in childhood: a baseline for the objective assessment of hypo- and hyperganglionosi. *Pediatr Pathol.* 1993;**13**:225-37
- 10) 広部 誠一. ラットおよびヒト腸管神経節細胞の発生に関する研究 - Neurofilament をマーカーとした免疫組織科学的検討 -. 日小外会誌. 1990;**26**:1126-1144
- 11) Diposarosa R, Bustam NA, Sahiratmadja E, *et al.* Literature review: enteric nervous system development, genetic and epigenetic

regulation in the etiology of Hirschsprung's disease. *Heliyon*. 2021;
7:e07308

- 12) Rao M, Gershon MD. Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? *Nat Rev Neurosci*. 2018;**19**:552-565
- 13) Puri P, Shinkai T. Pathogenesis of Hirschsprung's Disease and its Variants: Recent Progress. *Sem Pediatr Surg*. 2004;**13**:18-24
- 14) Jehangir S, Soundappan SVS, Krivanek M, *et al*. Pullthrough Operation for Hirschsprung's Disease: Importance of a Circumferential (Donut) Biopsy at the Level of the Anastomosis. *Eur J Pediatr Surg*. 2019;**7**:e55-57
- 15) 小川伸郎, 佐々木佳郎, 白石龍二, ほか. ヒルシュスプルング病腸管の, いわゆる組織学的移行帯における神経節細胞の分布. 日小外会誌. 1986;**22** : 962-967

Table.1 Clinical summary of the Hirschsprung's Disease patients.

Table.2 The numbers of ganglion cells in the intraoperative biopsy specimens and the resected intestines at oral margin in the patients of 4 months after birth or below.

Table.3 The length of aganglionosis segment and transition zone.

図の説明

Fig.1 The histopathological findings of HE staining and immunohistochemical staining using Calretinin, PHOX2B, BCL-2 and Hu C/D antibody (×40).

Fig.2 The histopathological finding of immunohistochemical staining using Hu C/D antibody (×4). The right side (antimesenteric side) is normoganglionic zone (▲) and the left side (mesenteric side) is aganglionic zone(△). There is no Meissner plexus. A few ganglion cells on the antimesenteric side in the Auerbach plexus are positive for Hu C/D.

Fig.3 The color mapping figure of the number of ganglion cells.

Fig.3 from a to i show Case from 1 to 9, respectively. The right is the oral, the left side is the anal side.

←→ indicates transition zone.

*1: Area of intraoperative histological examination.

M: Mesenteric side, A: Antimesenteric side

Fig.3-j shows the rule of color mapping. The aganglionic area indicates blue. The area there are 1-9 ganglion cells /5mm indicates light blue, 10-19/5mm indicates green, 20-29/5mm indicates yellow, 30-39/5mm indicates orange, 40-49/5mm indicates reddish orange, over 50/5mm indicates red. The area there is an absence of muscularis propria layer indicates gray.

Fig.4 Comparison of the number of Auerbach ganglion cells between intraoperative biopsy and resected specimen.

英文題名

Distribution and numbers of ganglion cells in the resected intestines in Hirschsprung's disease

英文姓名

Natsu Fukunaga^{1,2)}, Kaori Kameyama³⁾, Mayumi Homma¹⁾,
Yosuke Sasaki¹⁾, Tetsuo Nemoto³⁾, Yu Watarai⁴⁾, Toshiko
Yamochi¹⁾

英文所属

- 1) Department of Pathology, Showa University School of Medicine
- 2) Division of Pediatric Surgery, Children's Medical Center, Showa University Northern Yokohama Hospital
- 3) Department of Diagnostic Pathology, School of Medicine, Showa University Northern Yokohama Hospital
- 4) Division of Pediatric Surgery, Department of Surgery, Showa University School of Medicine

英文の abstract

Hirschsprung's disease (HD) is characterized by the absence of ganglion cells in the myenteric and submucosal plexuses in the distal intestine, resulting in functional intestinal obstruction. The unique treatment for HD is surgery to excise the aganglionic segment. We usually confirm the presence of ganglion cells by histological examinations during surgery. A transition zone between histologically normoganglionic and aganglionic segments exists in almost every patient; this zone should be excised because the residual transition zone may contribute to the obstructive symptoms postoperatively. However, no definite criterion exists for the number of ganglion cells present in normoganglionic bowel segments in HD patients.

The purpose of this study was to reveal the distribution and numbers of ganglion cells in normoganglionic bowel segments in HD patients.

We performed pull-through procedure in nine HD patients and counted the numbers of ganglion cells in their bowels histologically using immunohistochemistry with anti-Hu C/D antibody. In the transition zone, the distribution of ganglion cells on the antimesenteric side tended to extend more distally than that on the mesenteric side. The number of Meissner and Auerbach ganglion cells in the normoganglionic bowel of HD patients were $93.77 \pm 20.9/\text{cm}$ and $110.3 \pm 23.0/\text{cm}$, respectively.

The present study suggests that multiple tissues should be sampled from both the mesenteric and antimesenteric sides for intraoperative histologic examination. Moreover, the presence of at least 100 Auerbach ganglion cells per centimeter circumferentially should be confirmed to avoid a residual transition zone.

Table.1 Clinical summary of the Hirschsprung's Disease patients

Case	Sex	Age(month)	Comorbidity	Caliber Change
1	Female	3	-	S
2	Male	3	-	R
3	Male	3	-	S
4	Female	2	-	R
5	Male	3	21 trisomy	S
6	Male	4	malrotation	R
7	Male	2	-	T-D
8	Female	20	-	R
9	Female	4	21 trisomy, VSD	T
	Sex(%)	Age(month)(SD)		T-D:S-R
	Male 5(55.6)	4.9±5.7		2:3:4
	Female 4(44.4)			

VSD:ventricular septal defect, T: tranverse colon, D: descending colon, S:sigmoid colon, R: rectum

Table.2 The numbers of ganglion cells in the intraoperative biopsy specimens and the resected intestines at oral margin in the patients of 4 months after birth or below.

Case	Age(month)	Intraoperative biopsy (Auerbach)(/cm)	Resected specimen	
			Meissner(/cm)	Auerbach(/cm)
4	2	110	105.2	113.2
7	2	126	81.3	142.0
Average (/cm) (SD)			93.3±16.9 *	127.6±20.4 **
1	3	115	99.7	118.0
2	3	105	91.0	73.3
3	3	125	127.0	128.0
5	3	35	59.4	107.6
6	4	96	92.8	90.0
Average (/cm)(SD)			94.0±24.1*	103.4±21.9 **
Average of all cases(/cm)(SD)		101.7±29.0	93.8±20.9	110.3±23.0

*: not significant(Mann-Whitney), **: not significant(Mann-Whitney)

Table.3 The length of aganglionosis segment and transition zone

Case	Age(month)	Type	The length of AS	The length of TZ
1	3	Short	4mm	32mm
2	3	Short	62mm	10mm
3	3	Short	8mm	21mm
4	2	Ultrashort	0mm	12mm
5	3	Short	131mm	30mm
6	4	Short	33mm	9mm
7	2	Long	103mm	21mm
8	20	Short	77mm	33mm
9	4	Long	226mm	49mm
	Ultrashort:short:long		AS(cm)(SD)	TZ(cm)(SD)
	1:6:2		71.6±73.9	24.1±13.2

AS:aganglionic segment, TZ: transition zone

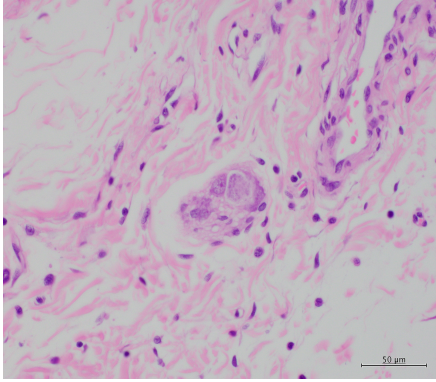
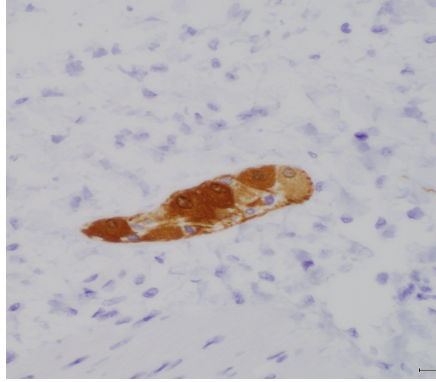
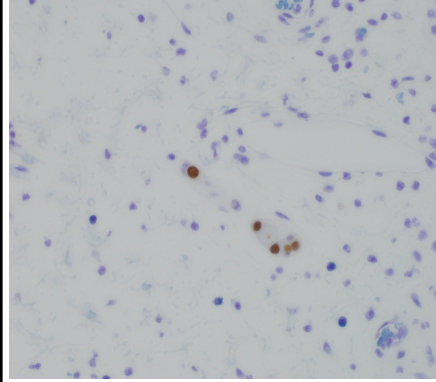
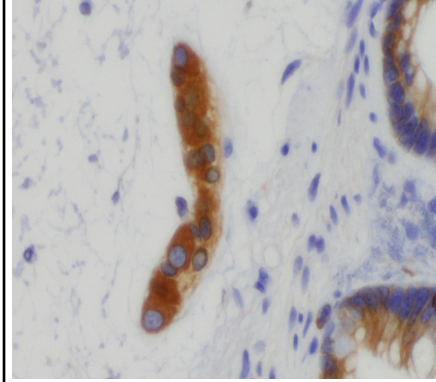
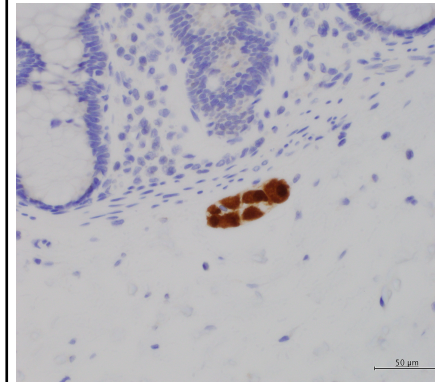
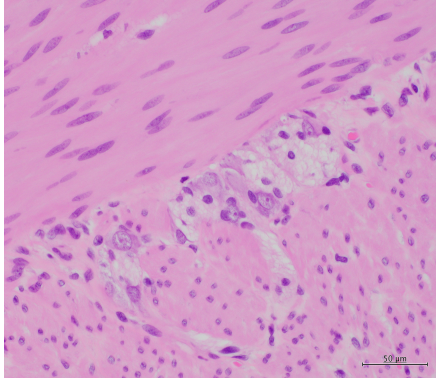
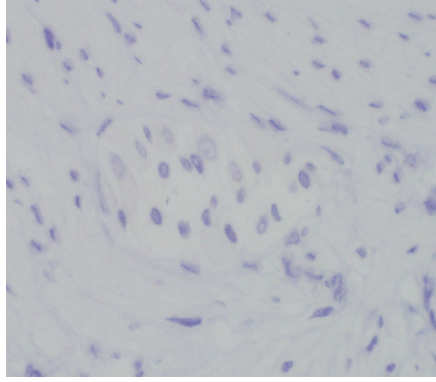
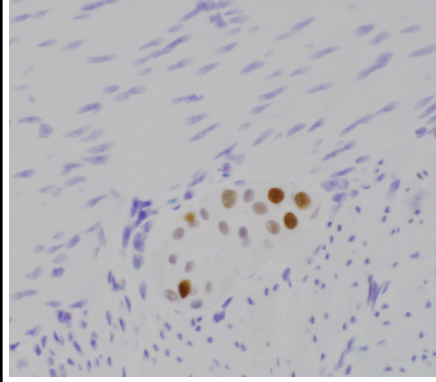
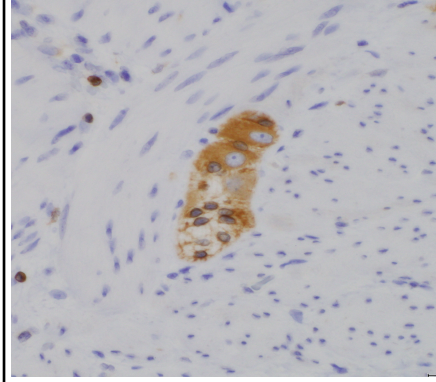
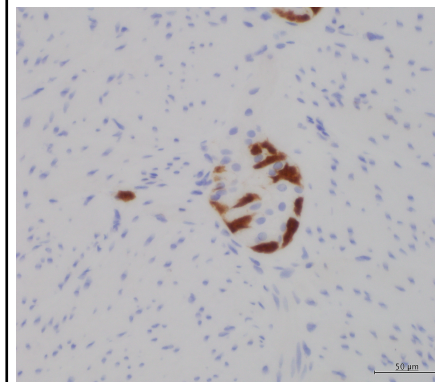
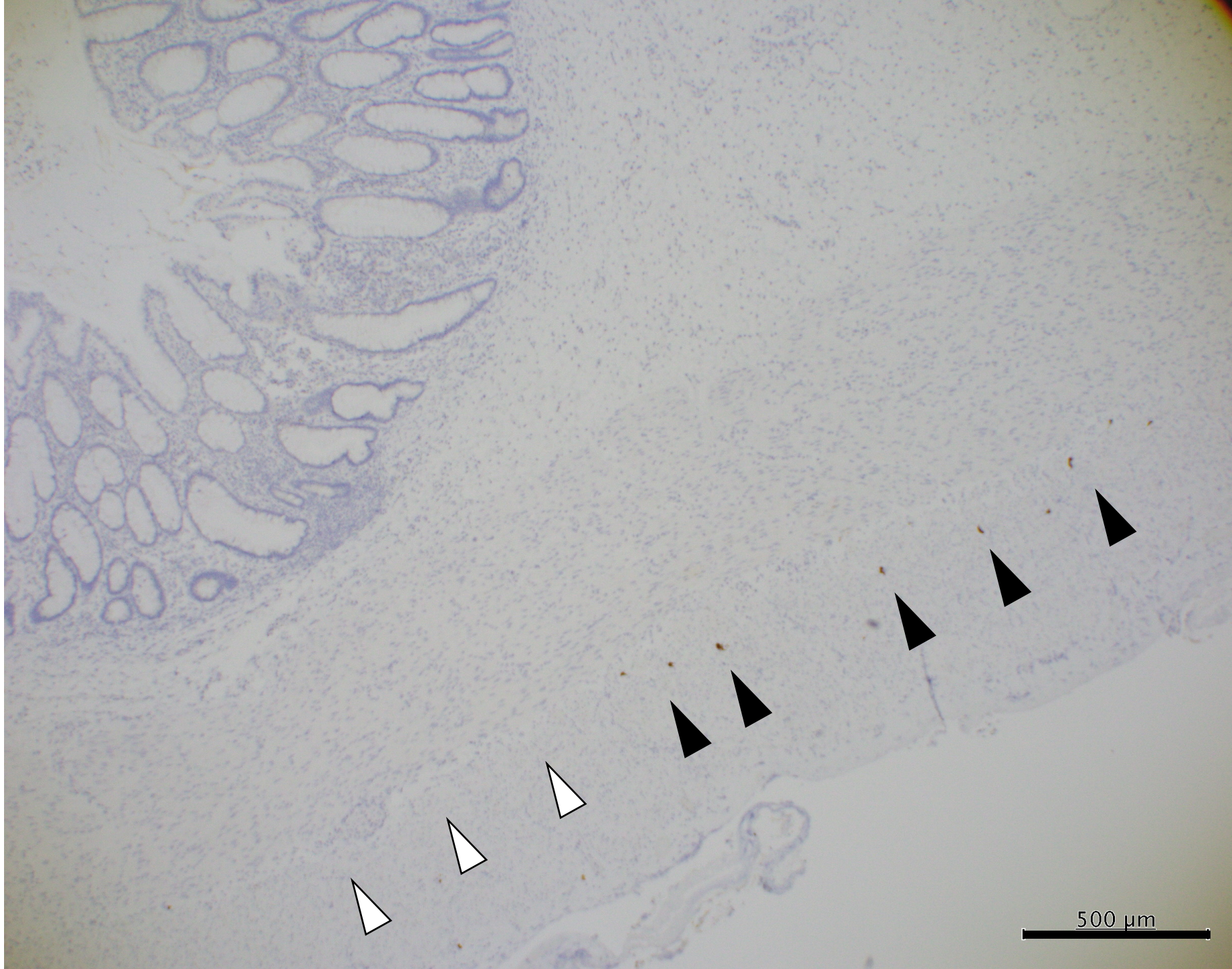
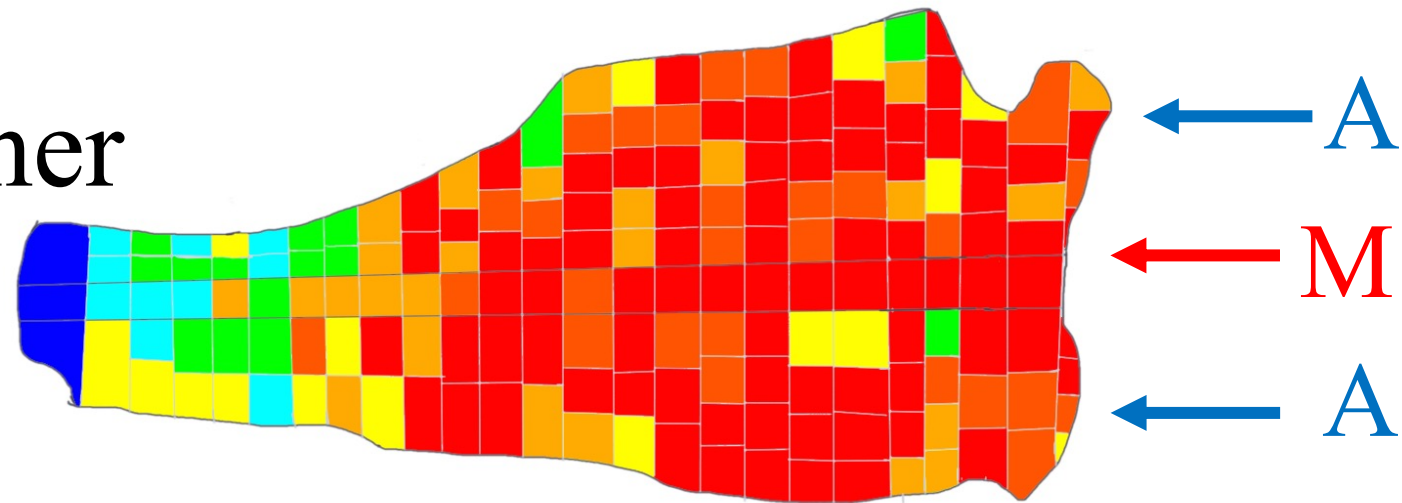
	HE	Calretinin	PHOX2B	BCL-2	Hu C / D
Meissner plexus					
Auerbach plexus					

Fig. 1

Fig. 2



Case.1
Meissner



Auerbach

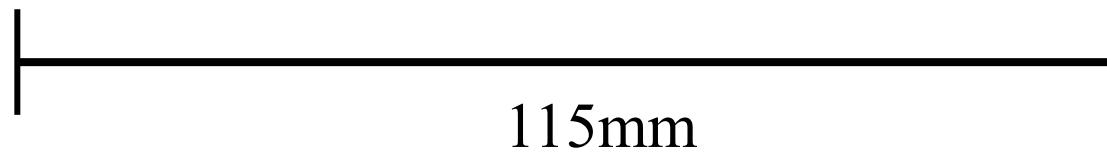
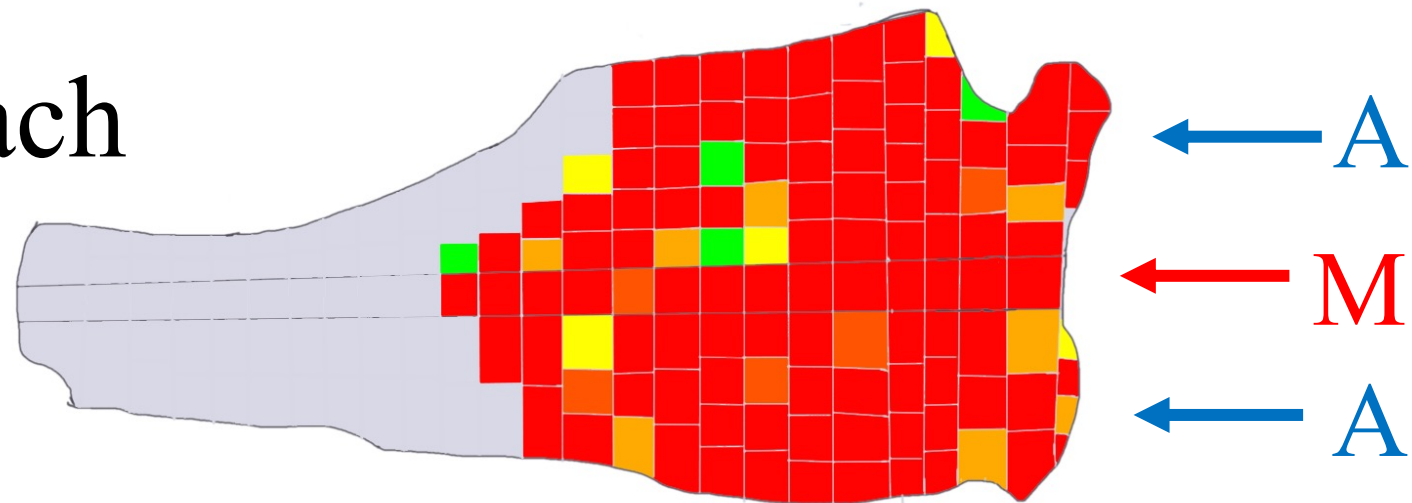
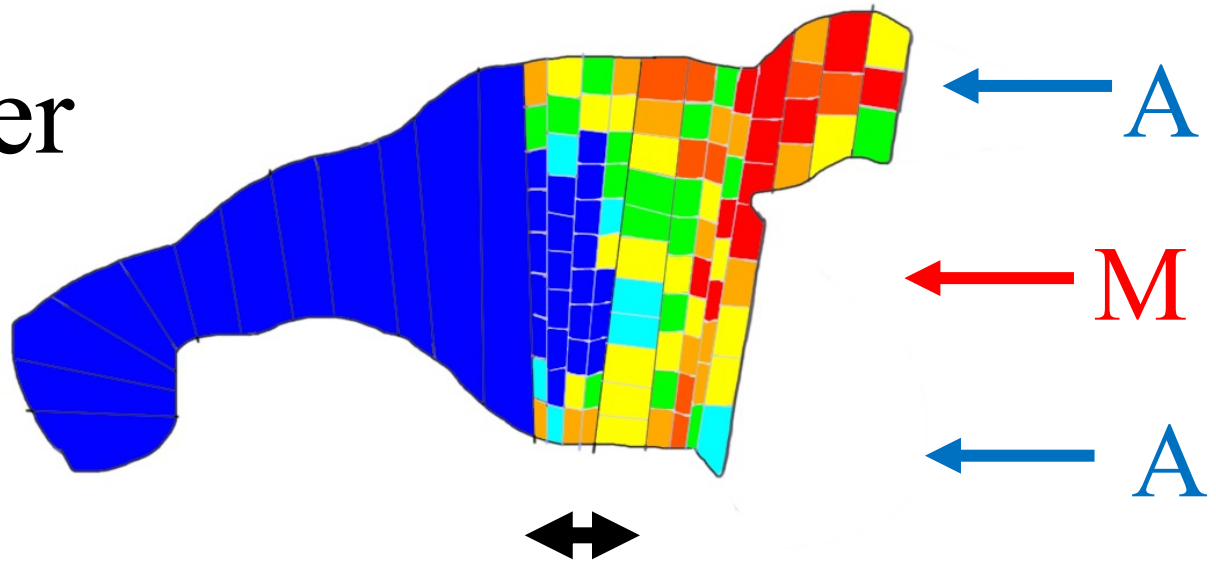


Fig. 3-a

Case.2 Meissner



Auerbach

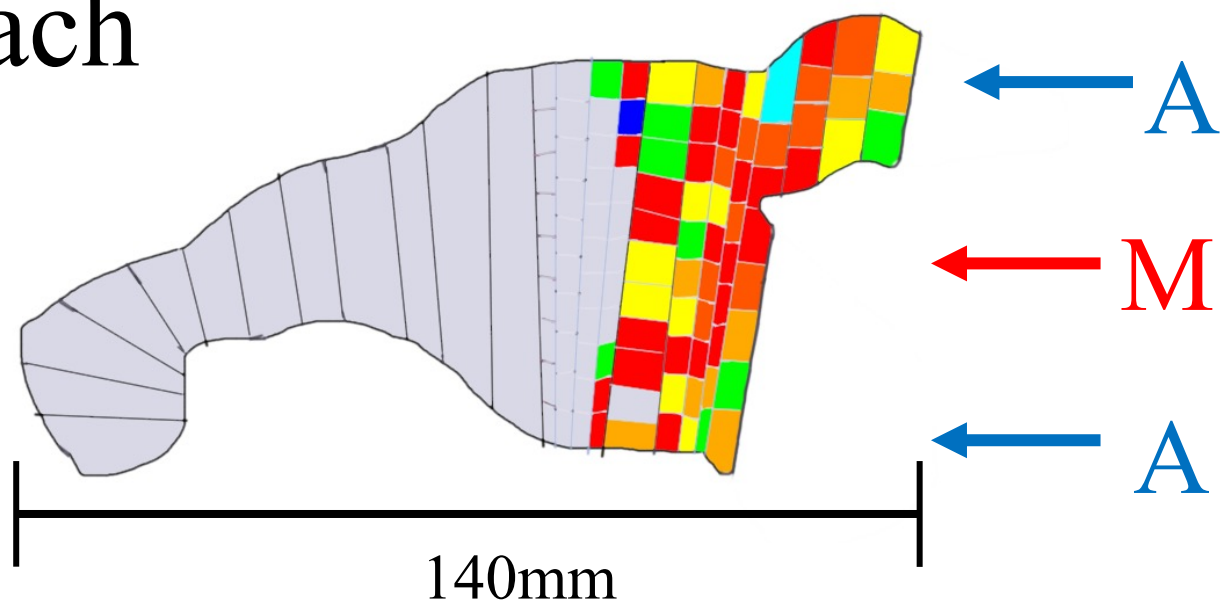
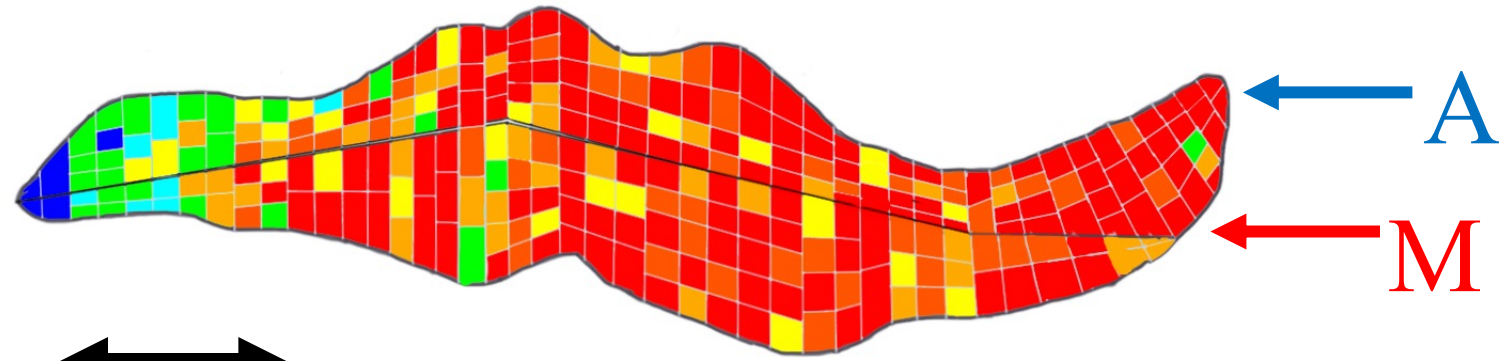


Fig.3-b

Case.3 Meissner



Auerbach

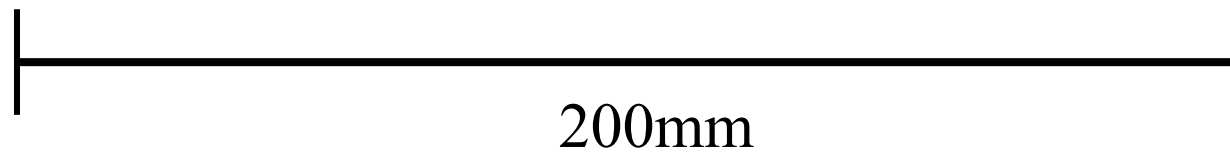
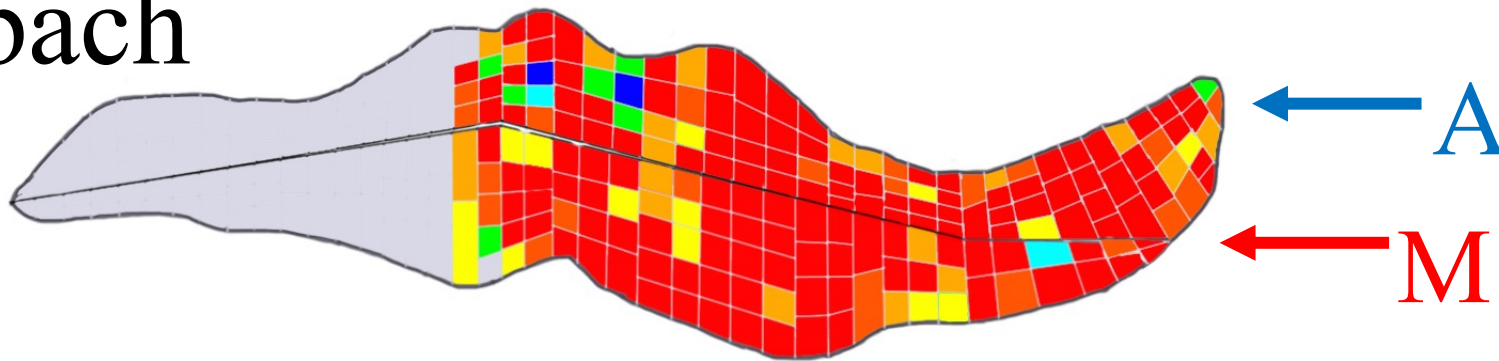
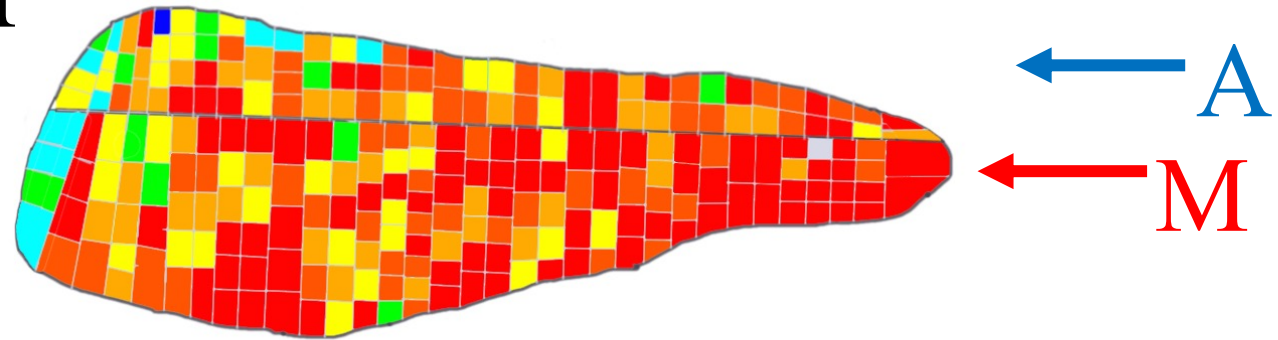


Fig. 3-c

Case.4 Meissner



Auerbach

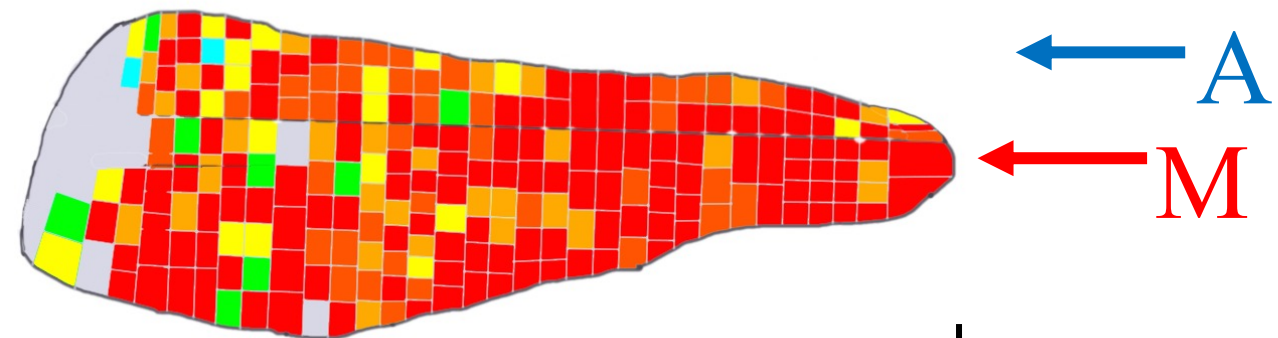
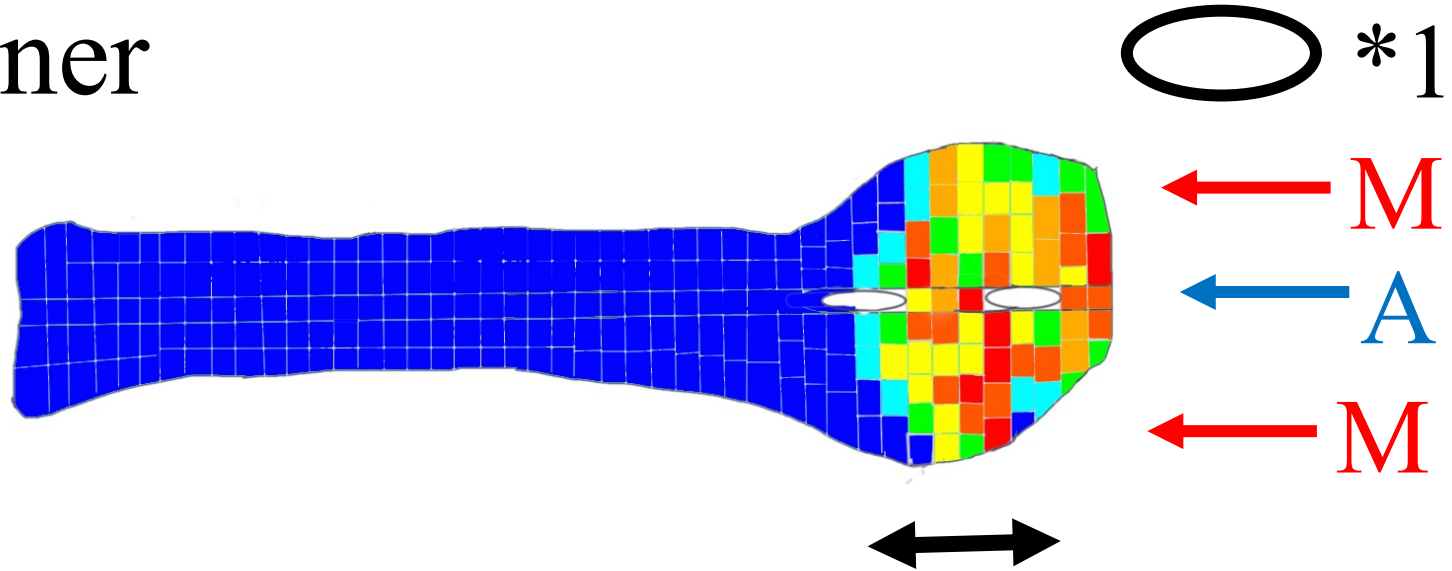


Fig. 3-d

Case.5 Meissner



Auerbach

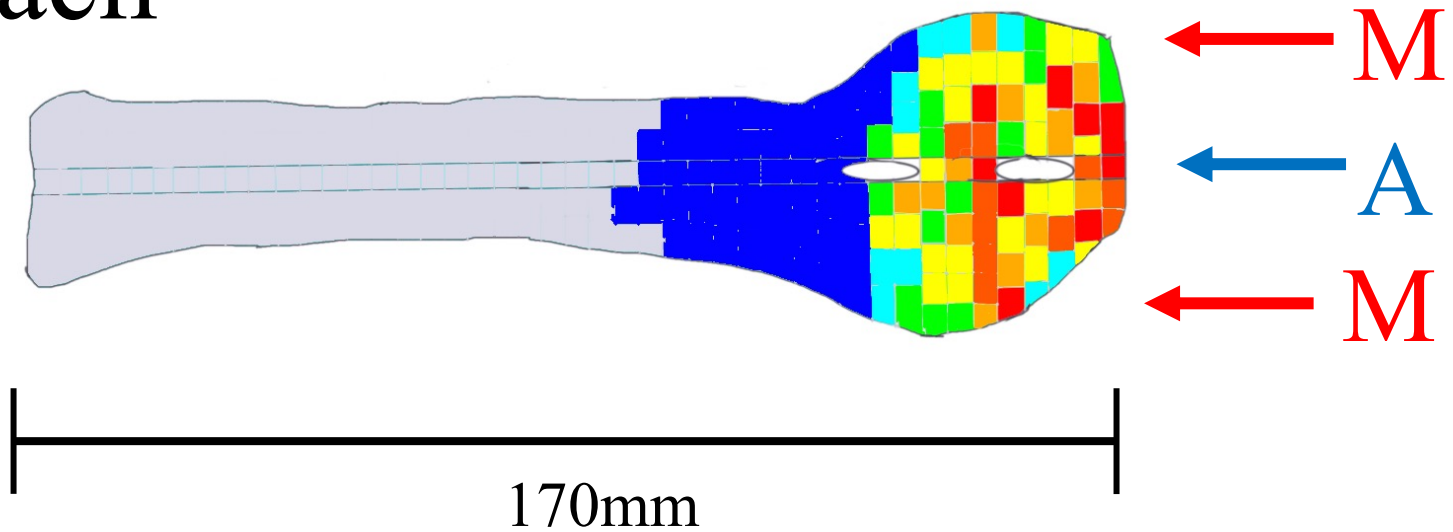
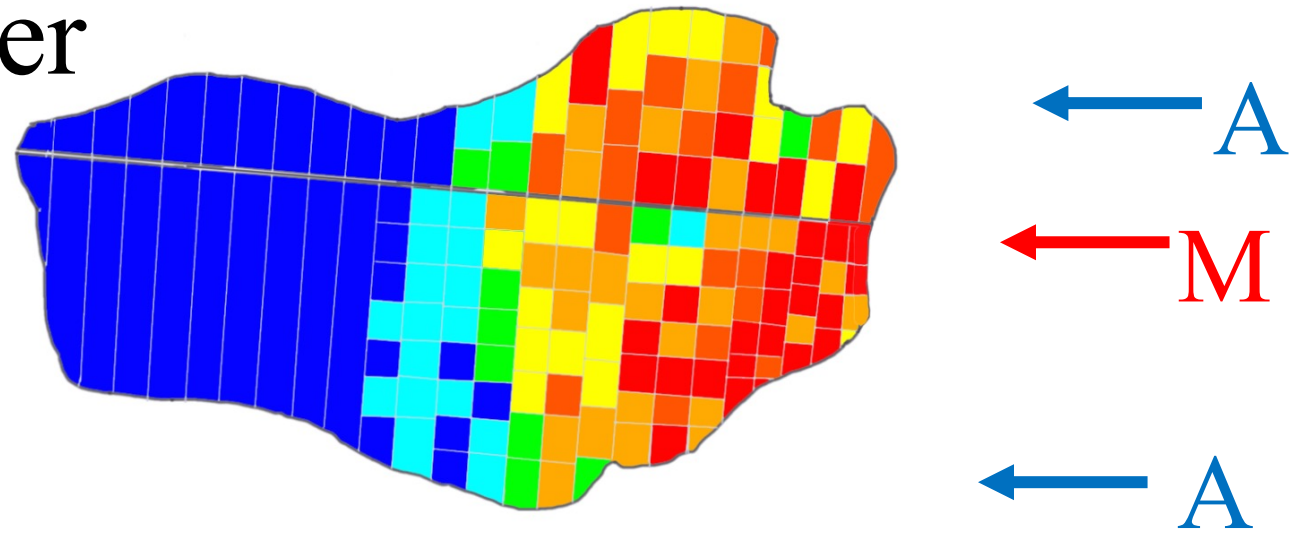


Fig. 3-e

Case.6 Meissner



Auerbach

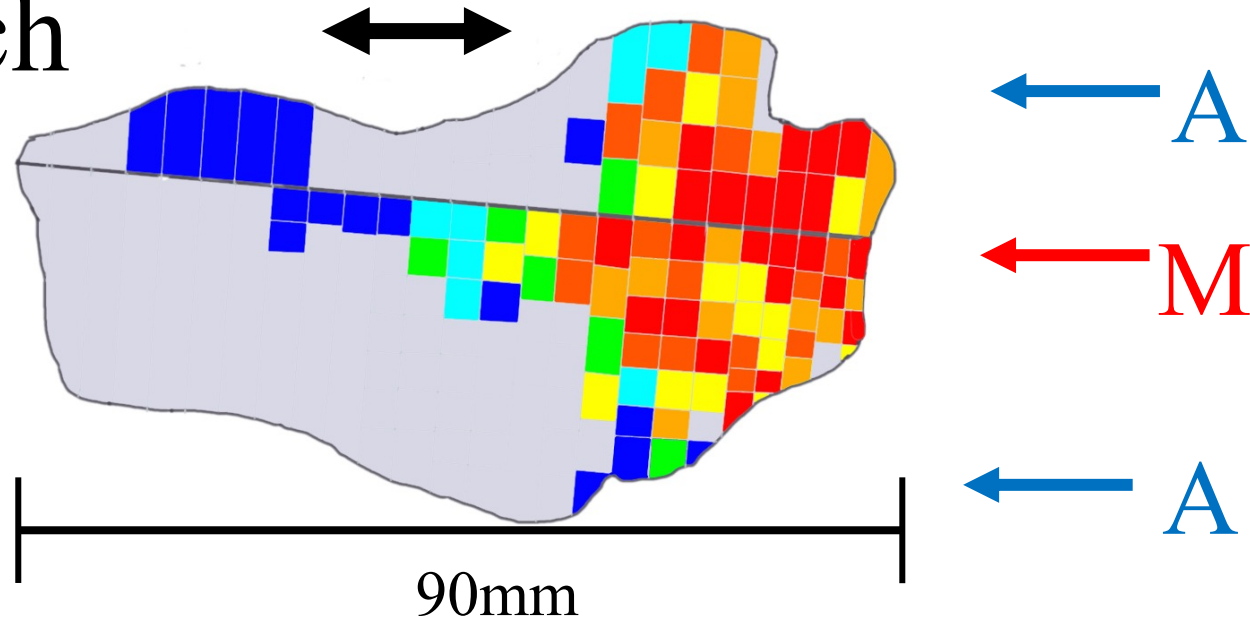
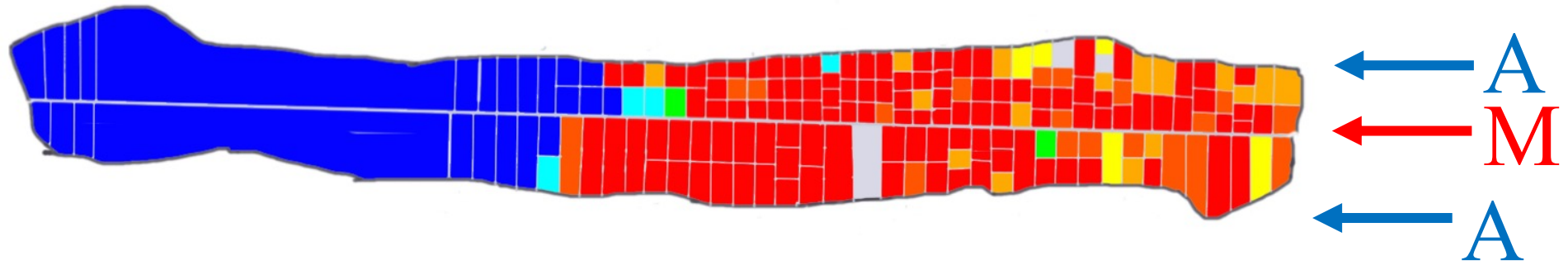


Fig. 3-f

Case.7 Meissner



Auerbach

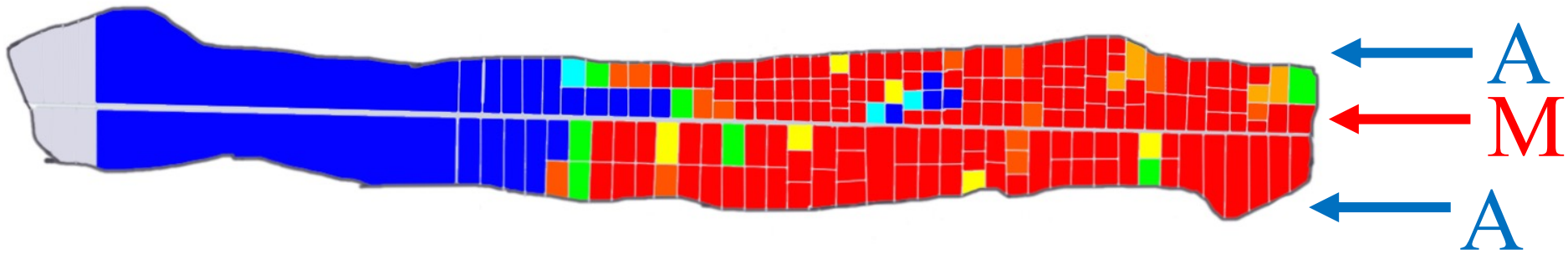
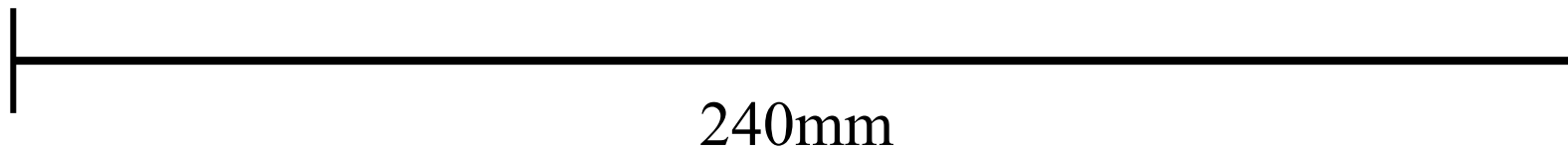
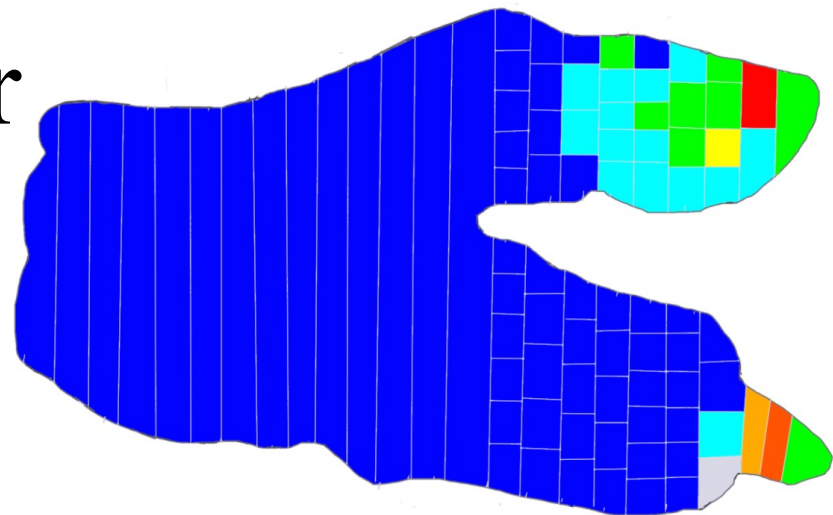


Fig. 3-g



Case.8 Meissner



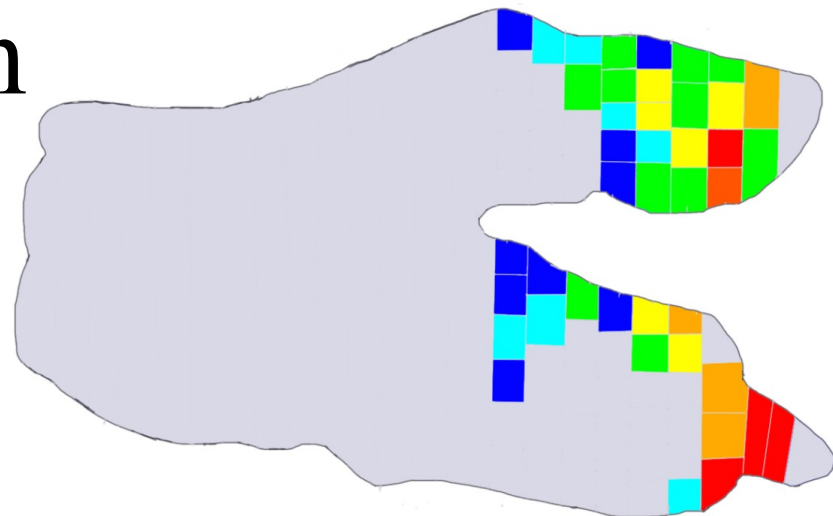
← A

← M

← A



Auerbach



← A

← M

← A

Fig. 3-h

111mm

Case.9 Meissner

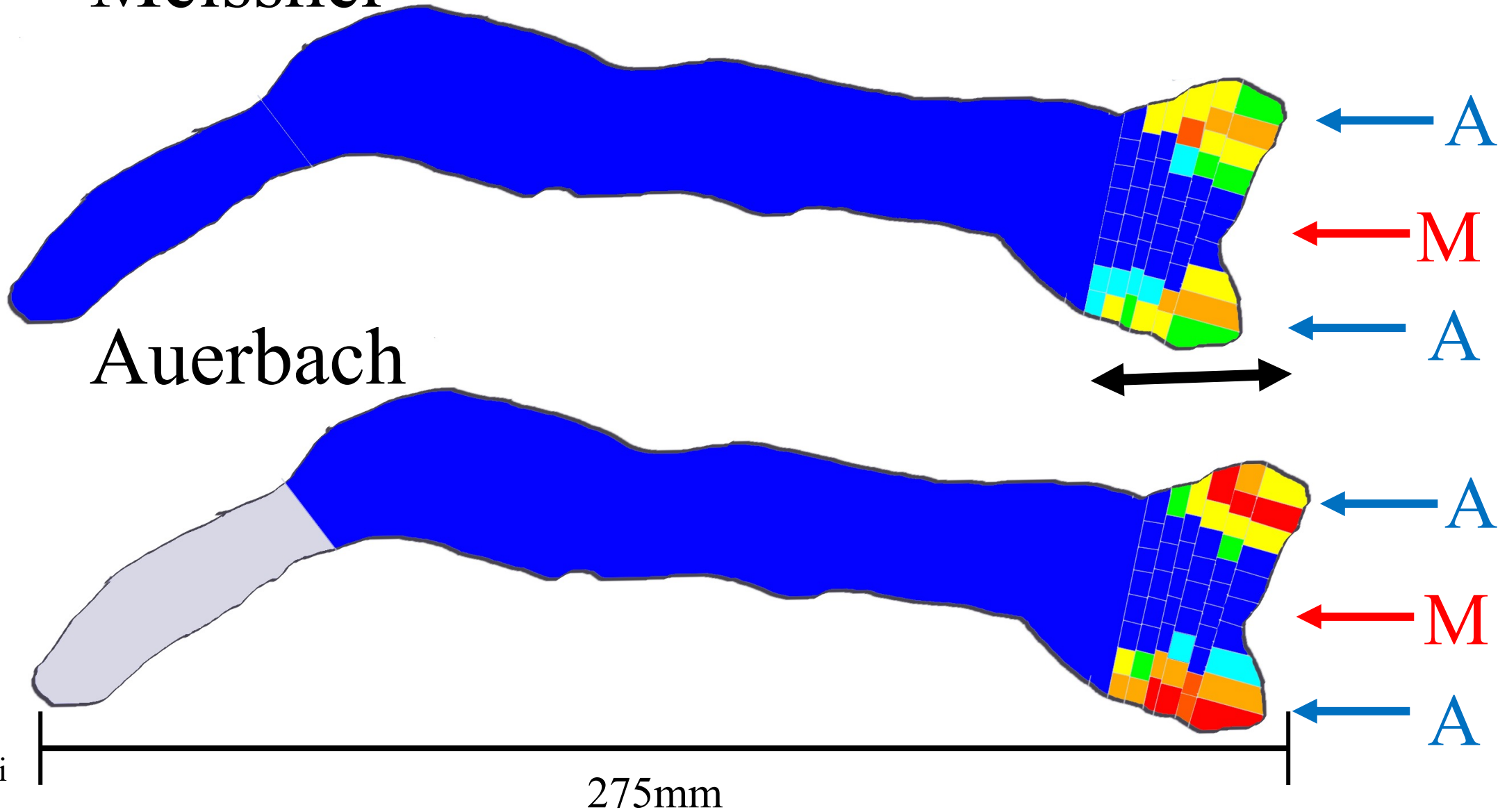
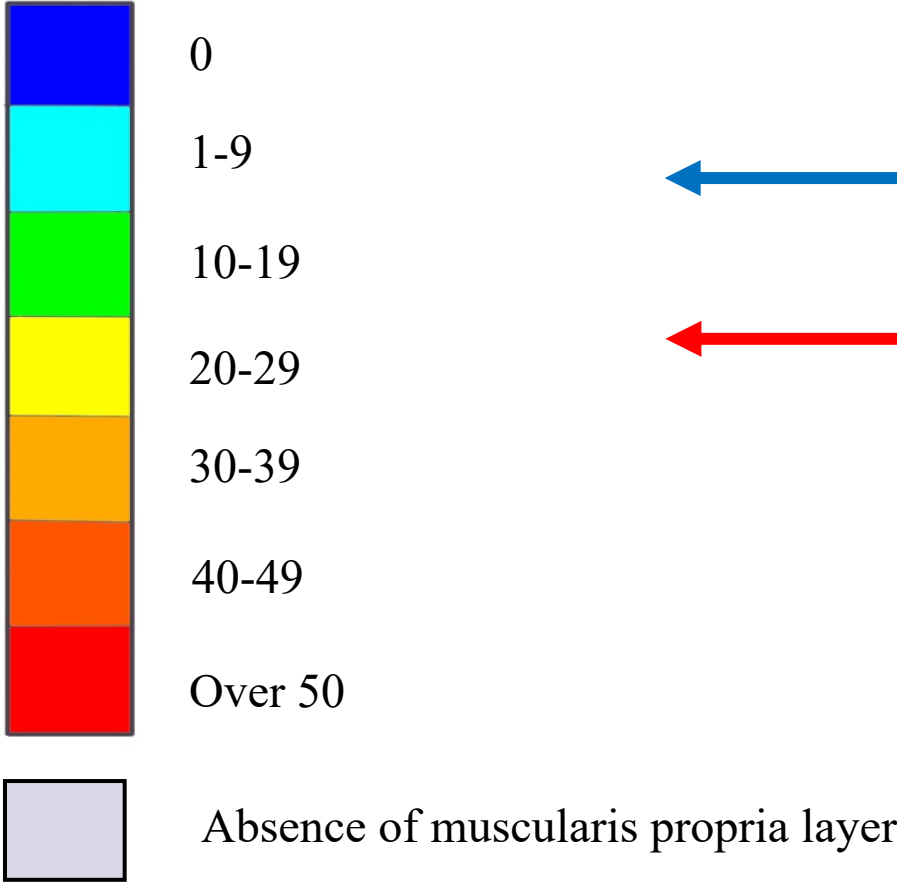


Fig. 3-i

The number of ganglion cells/5mm



← A (Antimesenteric side)

← M (Mesenteric side)

Fig. 3-j

The number of ganglion cells(/cm)

Fig.4 Comparison of the number of Auerbach ganglion cells between intraoperative biopsy and resected specimen.

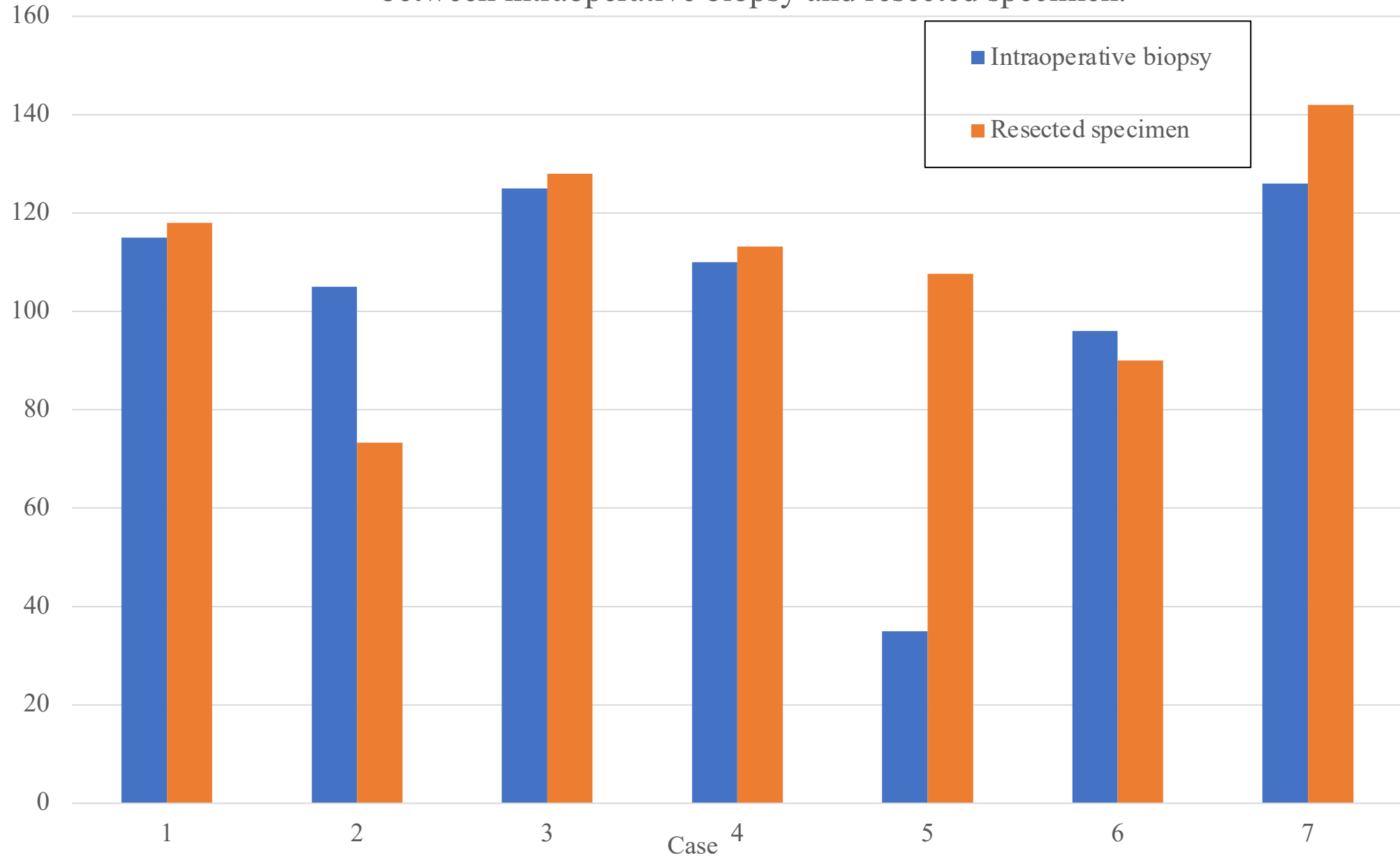


Fig. 4