

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09091

研究課題名(和文) ヒルシュスプルング病における腸管壁内神経節細胞局在の二光子レーザー顕微鏡観察研究

研究課題名(英文) Analysis for the intestinal enteric nervous system of Hirschsprung disease patients by the novel intravital fluorescent observation method

研究代表者

内田 恵一 (Uchida, Keiichi)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：30293781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒルシュスプルング病患者において、二光子レーザー顕微鏡をもちいた腸管神経システムの観察可能性を研究した。外科的摘出した患者の大腸検体をクルクミン色素で散布染色し、腸管の外側から顕微鏡で観察した。人の大腸壁内の腸管神経叢や神経ネットワークがクリアに描出され、口側から肛門側への、腸管神経細胞の減少だけでなく、一つの腸管神経叢から分岐する神経束数の減少もとらえることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒルシュスプルング病の手術においては、これまで手術中に大腸の一部を切除して、迅速病理検査を行い切除部位を決定しているため、繰り返すこともあり手術時間が長くなり、また、腸管神経叢の分布も個々の症例で不均一なことがあり、手術成績、すなわち、術後の排便機能低下にも影響していた。

本法は、大腸の外側から、腸管壁内の腸管神経叢に関しての存在有無だけでなく、神経ネットワークの低形成の程度まで観察できるため、今後のデバイスの発展などにより、切除前に至適な切除ラインの判断ができる可能性があると思われる。

これは、術後の患児において、排便機能の改善だけでなくQOLの改善にも大きく寄与するものと思われる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility of observing the enteric nervous system (ENS) using two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) in allied disorder of Hirschsprung disease patient. The colonic tissue (between transverse and rectum) just after operational resection was quickly dyed by curcumin. After 5 minutes' curcumin vital staining, intestinal wall scan from serosal side was performed by TPLSM without opening the intestinal wall. Visualization of the myenteric plexus without opening the intestinal wall was performed successfully in human colonic tissue. At oral edge of the resected specimen, the size of myenteric plexus and its neural network were normal. On the other hand, from oral edge to anal edge, the myenteric plexus size was shrunk gradually and the neural network were decreased by degrees. Furthermore, at anal edge of the observational area, there was only hypoplastic shrunk myenteric plexus without neural network to other plexus.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスプルング病 二光子レーザー顕微鏡 腸管神経叢 外科手術

1. 研究開始当初の背景

Hirschsprung 病の病因である先天的な腸管神経節細胞の欠損は、直腸から連続する無神経節腸管から、腸管神経節の存在する腸管(本来の正常腸管)へ移行する領域において、移行領域(Caliber change: 徐々に腸管短径が大きくなる)を認め、本来の腸管神経節細胞を認める大腸が、著明に拡張(これに伴う重度の腹部膨満と便秘)するというのが本態である。放置すると著明な便秘状態が継続するだけでなく、その病態ゆえに致死的な腸炎を発症することが多いため、未だ新生児・乳児の診療において、見逃してはならない病気の一つである。診断が確定すれば、手術により無神経節腸管の切除(直腸から連続する無神経節腸管)を行い、さらに神経節細胞を有する腸管と肛門との吻合術(一般的には経肛門的大腸 Pull-through 術)を施行することが根治術となる。この際、無神経節腸管が一部残存している可能性や、切除ライン(肛門との吻合ライン)において、神経節腸管と無神経節腸管が混在してしまう可能性が潜在的にある。すなわち、根治術を施行した後も、無神経節腸管領域が一部含まれていることで、重度の便秘や腸炎により生命の危機に脅かされることもあり、場合により再手術で、さらに腸管切除を追加する必要がある症例も存在する。このような曖昧な切除ラインの決定の原因となっているのは、拡張腸管(本来腸管神経節細胞が存在するはずの領域)において、2箇所(1箇所のみ)の施設も多く存在する)の全層生検を行い、それらの術中検体による腸管神経節の有無を、術中迅速病理診断にすべて委ねていることが問題であり、ここに曖昧な切除ラインとなってしまう原因があると考えられる。

Figure1

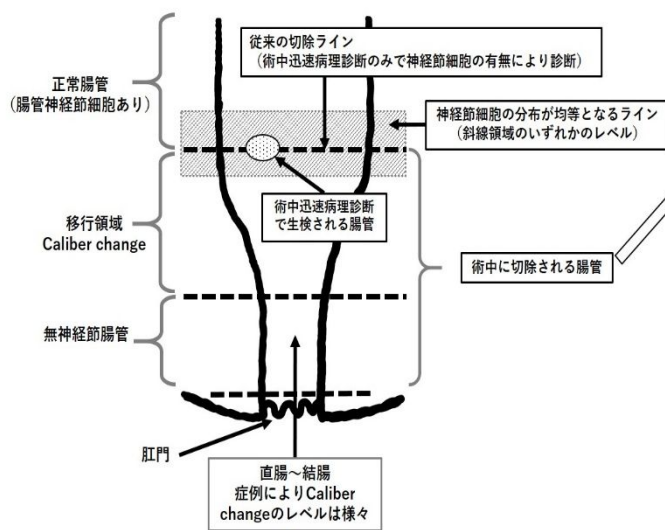
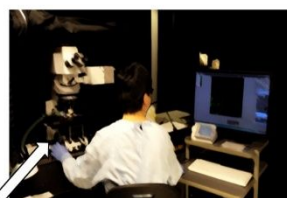


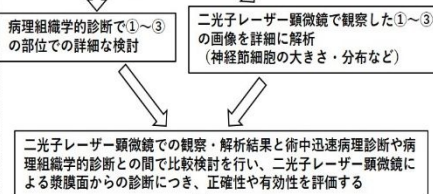
Figure2



二光子レーザー顕微鏡室

- ① 切除腸管で、斜線領域における神経節細胞の分布を全周性に観察
- ② Caliber change領域で、同様に神経節細胞の分布を全周性に観察
- ③ 無神経節腸管領域での神経節細胞の分布(本来は存在しないはず)を全周性に観察

↓ 切除標本



術中二光子レーザー顕微鏡による腸管神経節細胞の観察・解析を全周性に行い、切除ラインを決定する

Hirschsprung 病の手術時における切除ラインを決定しているのは、術中迅速病理診断における神経節細胞の存在を確認するのみであり、術中に迅速病理に提出する検体の場所によっては、同部位に腸管神経節の存在が確認できない場合もある(Figure1)。腸管神経節細胞が迅速病理診断で確認できなければ、さらに口側腸管を剥離した上で、再度生検を行い、腸管神経節細胞が確認されるまで、繰り返さなければならなくなる。この術中病理診断が確定するまでの間は、いわゆる術中待機時間であり、手術を進めることができないまま、患児の全身麻酔時間を 30 ~ 80 分近く延長させてしまう原因となっている。この研究では、術中に二光子レーザー顕微鏡による観察で、

この術中病理診断における腸管神経節細胞の確認を、より簡易かつ迅速に、さらに正確にする可能性がある。さらに、二光子レーザー顕微鏡による腸管神経節細胞の腸管を全周性に渡っての確認により、一部分のみの術中迅速病理診断では不可能であった切除予定ラインの、確実な同定（神経節細胞の有無だけでなく、大きさや分布など）ができるようになる可能性がある(Figure2)。また二光子レーザー顕微鏡の最もすぐれた利点である「深部組織が観察可能」という特徴を利用することで、術中に腸管の一部切除を行う必要もなく、漿膜面からの同顕微鏡による観察で、迅速病理診断以上の情報が得られることが予想される。

2. 研究の目的

当研究では、クルクミンと二光子レーザー顕微鏡を用いた新規生体蛍光観察手法により、迅速病理診断よりも多くの情報取得（腸管神経節細胞の局在範囲や分布密度などを全周性に得られるかどうか）が可能であるかどうか、すなわち術中迅速病理診断では成しえなかった至適切除ラインの同定が可能となるかどうかの判定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

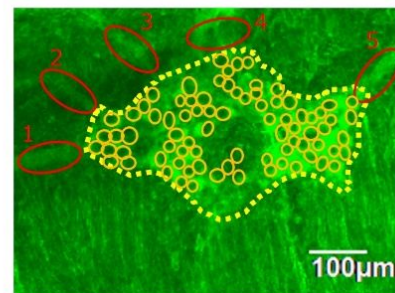
まず通常の手術時に切除される腸管（一部神経節細胞を含む腸管あり）を用いて、二光子レーザー顕微鏡により漿膜面から腸管筋層内に存在する Auerbach's plexus が同定可能かどうかを検討した。また同顕微鏡により、切除腸管における腸管神経節細胞の局在や分布範囲（特に Caliber

Figure 1

腸管壁のスキャンは漿膜面から上下左右の4箇所で行



解析方法



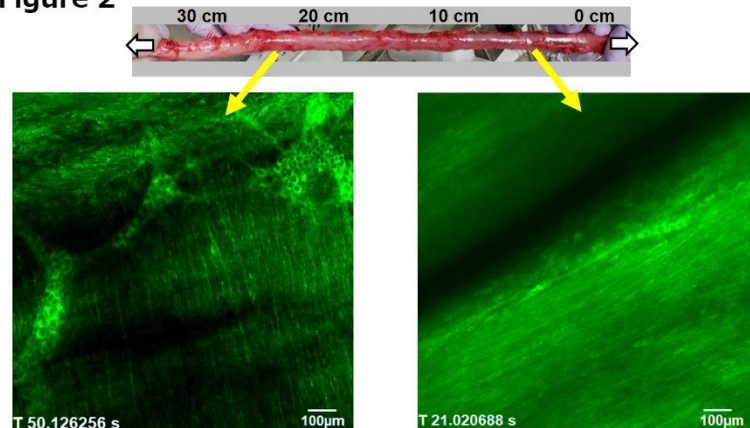
- Auerbach plexus size
- Bundle number / plexus
- Neural cell number / plexus
- One way ANOVAで群間比較

change 付近の移行帯など）を全周に渡って、詳細に検討を行った（Figure1）。これにより、二光子レーザー顕微鏡が、術中迅速病理診断の代行として、十分な正診率が確保できるかどうかを確認した。

4. 研究成果

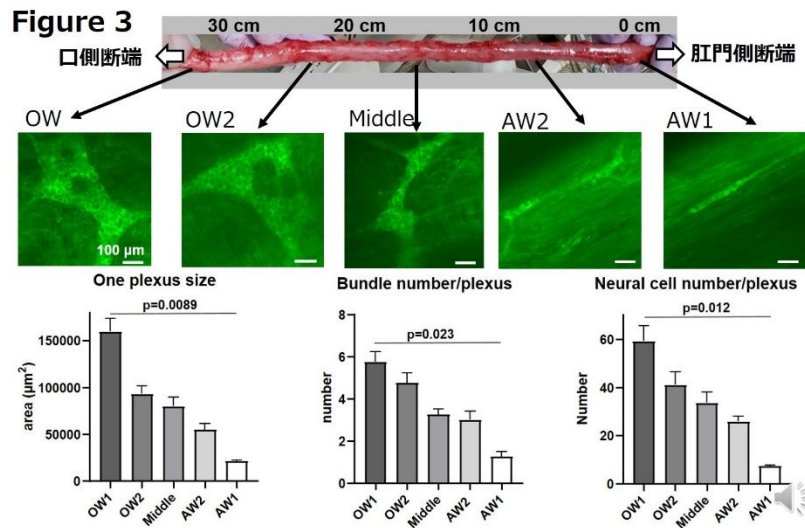
Hirschsprung 病患儿の手術症例における観察が研究期間中には十分な症例数が得られなかったため、Hirschsprung 病類縁疾患の患儿の手術時切除標本を用いて、新規生体蛍光観察手法を用いて詳細な観察と検討を行っ

Figure 2



新規生体観察手法により腸管壁内部の組織学的評価が漿膜面から可能

た。これにより、横行結腸から直腸までの約35cmの切除腸管において、口側から肛門側に渡って、徐々にアウエルバッハ神経叢が低形成に陥っていくことが判明した(Figure 2)。さらに口側断端から肛門側断端までのアウエルバッハ神経叢において、そのサイズや神経束の数、神



経細胞の数などにおいて検討をおこなったところ、アウエルバッハ神経叢のサイズは、口側から肛門側に向かって、徐々に小さくなっていることが判明した(口側断端 vs. 肛門側断端: $p=0.0089$)。また、神経束の数・神経細胞の数も、共に口側から肛門側に向かって、徐々に少なくなっていることが判明した(口側断端 vs. 肛門側断端: $p=0.012$)【Figure 3】。

このように、当初の目的であった Hirschsprung 病患儿における切除直後の大腸標本を用いた新規生体蛍光観察手法は、アウエルバッハ神経叢の存在の有無が確認できるだけでなく、非常に高精細な画像として同定できるため、神経叢のサイズや神経束の数、神経細胞の数といった従来の術中迅速病理診断では、得られなかったより詳細な腸管神経叢のネットワーク分布を確認・解析できることが判明した。今後は、この二光子レーザー顕微鏡の機器自体をよりコンパクトにした内視鏡トローリーサイズの機器の開発を待って、術中迅速病理診断の代替となりうるかどうかにつき、検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 小池勇樹、松下航平、井上幹大、内田恵一、問山裕二、溝口 明、楠 正人 |
| 2. 発表標題 Hypoganglionosis患児における消化管神経叢の新規生体観察手法による観察と検討 |
| 3. 学会等名 第57回日本小児外科学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuhki Koike, Keiichi Uchida, Kohei Matsushita, Mikihiro Inoue, Yuji Toiyama, Akira Mizoguchi, Masato Kusunoki |
| 2. 発表標題 Visualization for the enteric nervous system in allied disorder of Hirschsprung disease patient using two-photon laser scanning microscopy |
| 3. 学会等名 PAPS Tainan (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小池勇樹、松下航平、大竹耕平、井上幹大、内田恵一、溝口 明、楠 正人 |
| 2. 発表標題 マウス消化管神経叢に対する生体観察手法の確立とその有用性の検討 |
| 3. 学会等名 第46回日本小児栄養消化器肝臓学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yuhki Koike, Keiichi Uchida, Kohei Matsushita, Mikihiro Inoue, Yuji Toiyama, Akira Mizoguchi, Masato Kusunoki |
| 2. 発表標題 DYNAMIC PATHOLOGY FOR THE ENTERIC GANGLION CELLS IN MOUSE USING TWO-PHOTON LASER SCANNING MICROSCOPY |
| 3. 学会等名 EUPSA 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小池勇樹、松下航平、井上幹大、問山裕二、内田恵一、溝口 明、楠 正人 |
| 2. 発表標題 Hirschsprung病類縁疾患の消化管神経叢に対する新規生体観察手法による観察可能性の検討 |
| 3. 学会等名 第50回日本小児消化管機能研究会 |
| 4. 発表年 2020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 | 小池 勇樹 (Koike Yuhki) (10555551) | 三重大学・医学部附属病院・講師 (14101) | |
| 研究分担者 | 井上 幹大 (Inoue Mikihiro) (30422835) | 三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101) | |
| 研究分担者 | 松下 航平 (Matsushita Kohei) (70750777) | 三重大学・医学部附属病院・助教 (14101) | |
| 研究分担者 | 溝口 明 (Mizoguchi Akira) (90181916) | 三重大学・医学系研究科・産学官連携講座教授 (14101) | |
| 研究分担者 | 楠 正人 (Kusunoki Masato) (50192026) | 三重大学・医学系研究科・寄附講座大学教員 (14101) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|