論文の内容の要旨

論文題目　間質性膀胱炎の病型分類及び病因に関する臨床病理学的検討

氏名　　　秋山　佳之

間質性膀胱炎（Interstitial cystitis：IC）は、「膀胱痛、膀胱不快感、頻尿などの過知覚膀胱症状を呈し、膀胱内にハンナ病変または拡張術後粘膜出血を認める疾患」と定義される、原因不明の指定難病である。ハンナ病変とは、膀胱鏡所見における特有の膀胱粘膜の発赤部位のことである。このハンナ病変の有無によって、IC はハンナ型 IC（HIC）と非ハンナ型（NHIC）の 2 亜型に分類されるが、両者の差異はこれまで明確ではなかった。現在まで病因に関する様々な仮説が提唱されてきているが、未だに病因の特定はなされておらず不明である。

一般的に、IC の病理組織学的所見は、粘膜下の炎症細胞浸潤、浮腫、線維化、肥満細胞浸潤といった非特異的慢性炎症所見を呈するものとされている。一方で膀胱尿路上皮の剥離や、固有筋層への肥満細胞浸潤などを IC に特徴的な所見であると指摘する報告もあるが、広く合意を得るまでには至っていない。したがって、現在も IC の診断基準に組織学的項目はなく、臨床所見と類似疾患の除外によって診断がなされている。このような背景には、これまでの多くの研究が病型（HIC と NHIC）の区別を明確にしていないまま評価をしているものが多く、また、HIC におけるハンナ病変部と、背景（非ハンナ病変部）の違いについても十分な組織学的検討がなされて来なかったことが要因の一部として考えられる。本研究では、IC の病理組織学的所見を革新的画像解析ソフトウェアによる網羅的定量評価方法を取り入れて精査し、病型間における組織形態学的所見の差異を明確にした。これによって明瞭化された病型分類に基づき、ハンナ型 IC における特徴的な組織所見の同定とその固有の炎症特性を明らかにした。具体的には、以下の研究を行った。

1）HIC27 症例、NHIC39 症例、非 IC 慢性膀胱炎群 26 症例の膀胱生検標本を検鏡したところ、HIC では顕著なリンパ球形質細胞浸潤及び尿路上皮の剥離を認める一方で、NHIC では炎症細胞浸潤が殆ど認められず、また尿路上皮も比較的保全されていた。両病型には形態学的に対照的とも言える差異があることを明らかにした。さらに、画像解析ソフトウェアを応用し、CD3、CD20、CD138 及び AE1/3 抗体免疫染色によって同定した浸潤 T リンパ球、B リンパ球、形質細胞数及び残存する尿路上皮面積の網羅的定量計測を行ったところ、HIC では NHIC よりも有意にリンパ球形質細胞数が多く、残存尿路上皮面積は少なかった。HIC のなかで、ハンナ病変部、非ハンナ病変部の間には、炎症細胞浸潤、尿路上皮剥離に有意差はなく、ハンナ病変部のみならず、非ハンナ病変部にも同様の所見が認められることを示した。画像解析ソフトウェアを応用した網羅的定量解析により、検鏡によって得た形態学的知見を客観的に明示

した。さらに、HIC と同程度の炎症所見を呈する非 IC 慢性膀胱炎と比較することにより、膀胱上皮の剥離は HIC に特徴的であることも同定した。

2）その特異性に関して議論が交わされてきた IC における肥満細胞浸潤に関して、上記と同様に画像解析ソフトウェアを用いた網羅的定量解析を行ってその妥当性について検証した。解析に先立ち、HIC：炎症性疾患、NHIC：非炎症性疾患という区別を明確にした。すなわち、HIC には非 IC 慢性膀胱炎を、NHIC には正常膀胱（形態学的所見のない膀胱生検）を、とそれぞれに炎症の程度を一致させたコントロールを設定して浸潤肥満細胞数の比較・検討を行った。HIC31 症例、非 IC 慢性膀胱炎 19 症例、NHIC37 症例、正常膀胱 18 症例の膀胱生検検体を用いて、1）と同様、抗 CD3、CD20、CD138 抗体による免疫染色と、引き続く定量解析を行いリンパ球・形質細胞浸潤数を比較したところ、HIC と非 IC 慢性膀胱炎の間、NHIC と正常膀胱群の間、には浸潤リンパ球形質細胞数に有意な差がないことを確認した。その後、ヒト肥満細胞特異的抗体である抗マストセルトリプターゼ抗体による免疫染色を行って浸潤肥満細胞の同定を行い、画像解析ソフトウェアを用いた網羅的定量計測を行った。肥満細胞数は、それぞれ上皮下全体、固有筋層内、を別箇に評価した。その結果、上皮下全体に浸潤する肥満細胞数は、HIC と非 IC 慢性膀胱炎との間、NHIC と正常膀胱との間、の各間で同程度であり、全体として背景の炎症（リンパ球形質細胞数）と強く相関していることが明らかになった。固有筋層内の肥満細胞数は 4 群間で有意差を認めなかった。以上により、肥満細胞浸潤は IC に特異的な所見ではなく、IC と非 IC の鑑別診断に対する有用性は低いことを明らかにした。

3）HIC はリンパ球形質細胞浸潤を主とする炎症性疾患であるが、特に B 細胞、形質細胞の浸潤が目立つという組織学的特徴所見を見出した。そこで、1）で解析した HIC27 症例、非 IC 慢性膀胱炎 26 症例を対象として形質細胞軽鎖（κ / λ 鎖）に対する *in situ hybridization* を施行し、これまでと同様に網羅的定量解析を応用して軽鎖制限解析を施行した。結果は HIC の 30%（解析成功 26 症例中、8 症例）に軽鎖制限を認めた。一方で非 IC 慢性膀胱炎では解析成功 23 症例中 1 症例も軽鎖制限を認めるものはなかった。形質細胞の軽鎖制限は、同細胞のクローナル増殖を示唆する所見として広く B 細胞系の血液腫瘍の日常診断の場において用いられている解析手法である。つまり、HIC の一部では浸潤する形質細胞がクローナル増殖を来していることを突き止めた。

4）HIC では浸潤形質細胞のクローナル増殖が起きているという事実から、1.（形質細胞への分化傾向の強い）早期の MALT lymphoma や、形質細胞腫様病態、2. 特定の抗原に対する免疫応答、の 2 点を病態として想定した。全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの自己免疫性疾患では、持続的な抗原刺激によって、B 細胞上の CXCR3 受容体の発現が up-regulation されるという既報がある。そこで、次に HIC における CXCR3 受容体の発現解析を行った。1）、3）で用いた HIC27 症例と非 IC 慢性膀胱炎 15 症例（BCG による免疫応答反応が発生している可能性を考慮して、対照群の中で膀胱癌に対する BCG 注入療法の既往のある症例は除外し

た）に対して抗 CXCR3 受容体抗体による免疫染色を行った後、画像解析ソフトウェアによる CXCR3 発現細胞の網羅的定量計測を行った。結果は、HIC と非 IC 慢性膀胱炎では全体としての CXCR3 発現細胞総数には両群間で有意差を認めなった。しかし、形質細胞数と CXCR3 発現細胞数は HIC においてのみ数的相関関係を認め､非 IC 慢性膀胱炎においては認められなかった。CXCR3 と、CD138（形質細胞）の蛍光 2 重染色を行ったところ、HIC では殆どの単核球が CXCR3 と CD138 を共発現していた一方で､非 IC 慢性膀胱炎では CD138 陽性細胞(形質細胞）の殆どは CXCR3 を発現していないことを観察した。

5）1）～4）の研究結果より、HIC の病態として、膀胱における特定の抗原に対する免疫応答の存在を考えた。そこで、HIC14 症例、対照 5 症例（膀胱癌 2、非 IC 慢性膀胱炎 2、正常膀胱 1 症例）の膀胱生検検体を用いて、リンパ球表面細胞抗原（CD3、CD20、CD4、CD8）及び炎症性サイトカイン（IFNγ、TNFα、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10）の定量 RT-PCR 解析を施行した。結果は、対照群と比較して、HIC に特徴的な発現変化を示した遺伝子は認められなかった。また、組織中の細菌の存在を検討するため、16SrRNA 遺伝子の PCR を同検体に対して施行したが、増幅は全く得られなかった。

以上より、HIC と NHIC との間には病理形態学所見に明確な差異があり、病型分類は病理組織所見でより正確になること、HIC の病因には特定の抗原に対する免疫学的反応が関与している可能性のあることを示した。更なる病因の解明には、B 細胞増殖性疾患との関連性の検討や、幅広い抗原の探索が必要である。