免疫学的, 病理学的アプローチを行ったフォンタン術後蛋白漏出性胃腸症の1例

上野健太郎, 中村 英明, 湯山 亮平, 柳 貞光,
上田 秀明, 康井 制洋

神奈川県立こども医療センター循環器科

Key words:

Fontan, total cavo-pulmonary connection, protein-losing-enteropathy, flow cytometry, pathology examination

Pathological and Immunological Approaches for a Patient Complicated with Protein-losing Enteropathy Following the Fontan Operation

Kentaro Ueno, Hideaki Nakamura, Ryohei Gatayama, Sadamitsu Yanagi, Hideaki Ueda, Seiyo Yasui

Department of Pediatric Cardiology, Kanagawa Children's Medical Center, Kanagawa, Japan

We performed serum cytokines measurement, immunological tests by flow cytometry (FCM) and histopathological examination for a postoperative Fontan patient complicated with PLE following antecedent infection. A 6-years-old boy with asplenia had a atrioventricular septal defect with hypoplastic left ventricle and underwent a Fontan operation. The patient developed refractory PLE 2 years after surgery. The mean albumin level remained 2.0-2.5 g/dl. FCM analysis of the patient demonstrated lymphopenia and a marked decrease in the number of CD4 T lymphocytes, resulting in a low CD4/CD8 ratio (0.14). Histopathological studies showed chronic inflammatory enteritis. The patient was treated with prednisolone and cyclosporine, and his edema was relieved as serum albumin rose to approximately 3.0 g/dl. His immune status also gradually improved. Immunological tests using FCM and a histopathological examination were essential in the decision on the treatment strategy and for monitoring of the treatment response among PLE patients after the Fontan operation, which was supposed to be associated with immune dysfunction.

要 旨

感染を契機に蛋白漏出性胃腸症 (protein-losing enteropathy : PLE) を発症し, その主因が心原性と判断できない症例で, 病態と治療について, 血清サイトカイン測定, flow cytometry (FCM) を用いた免疫学的検査, および病変部周囲の組織生検を行い検討した. 症例は6歳男児で無脾症, 房室中隔欠損(左室低形成)の診断でフォンタン術が施行された. フォンタン術後2年でPLEを発症し, 血清アルブミン (Alb) 値は2.0 ~ 2.5 g/dl で推移し, 各種の治療に抵抗性であった. FCM でリンパ球減少, CD4 陽性 T 細胞の著明な減少 (CD4/CD8 比 0.14) を認めた. 治療経過中の病理組織像では慢性腸炎の組織像を呈しており, 炎症細胞の浸潤を認め, 軽度のリンパ管の増加, および拡張を確認できた. ステロイド, シクロスポリン併用療法が施行され, 浮腫は軽快し, 現在まで Alb 値は 3.0 g/dl 前後で安定し, 免疫機能も改善しつつある. 血行動態の破綻が主因であると判断できないフォンタン術後 PLE では, 免疫機能検査, 組織学検査は治療方針を決めるうえで重要であり, かつ免疫系の異常が考慮される症例では, 治療反応性を確認するうえでも有用であると考えられた.

はじめに

フォンタン術後症例では, 蛋白漏出性胃腸症 (protein-losing enteropathy : PLE) は致死的合併症の1つであり, その病態生理に関してはいまだ不明な点が多い. 免疫系の異常も一因として報告されており, その原因は多

岐にわたると考えられる¹⁾. われわれは, 感染を契機に PLE を発症したフォンタン術後患児で, その病態と治療について血清サイトカイン測定, flow cytometry (FCM) を用いた免疫学的検査, および病変部周囲の組織生検を行い検討した.

2011 年 11 月 2 日受付 別刷請求先: 〒232-8555 神奈川県横浜市南区六ツ川 2-138-4

2012 年 6 月 7 日受理 神奈川県立こども医療センター 上野健太郎

症 例

1. 症例

6歳, 男児.

2. 現病歴

在胎37週, 体重2,910gで出生. 無脾症, 単心房, 房室中隔欠損(左室低形成), 肺動脈狭窄と診断された. 8カ月時に, 両方向性グレン術 bidirectional cavo-pulmonary shunt(BCPS)が施行された. 1歳1カ月の心臓カテーテル検査では, 動脈血酸素飽和度(SaO₂)は86%, 平均肺動脈圧(mPAP)は8 mmHg, 肺血管抵抗値(RpI)は1.5 units・m²で共通房室弁閉鎖不全は軽度であった. 1歳3カ月時に18 mmのGore-texをextracardiac conduitとして用いたフォンタン術が施行された. 1歳10カ月時に共通房室弁閉鎖不全が増悪してきたため, 共通房室弁形成術を施行された. 2歳9カ月時の心臓カテーテル検査では, mPAPは9 mmHg, RpIは1.0 units・m²で共通房室弁閉鎖不全は極軽度であった. 3歳3カ月時に, 手足口病に罹患した後, 血清総蛋白(T.P)値は4.8 g/dl, Alb値は2.4 g/dlと低蛋白血症を伴う全身浮腫を発症し入院した. 利尿薬, 血管拡張薬を増量され, 浮腫は軽快し, T.P値は6.0 g/dl, Alb値は3.2 g/dlと低蛋白血症は改善した. 3歳5カ月時の心臓カテーテル検査では, mPAPは8 mmHg, RpIは1.0 units・m²で共通房室弁閉鎖不全は極軽度であった. 上大静脈, 肺動脈, extracardiac conduitに形態的に問題はなかった. またT.P値は6.2 g/dl, Alb値は3.4 g/dlであり, 低蛋白血症の再燃は認めなかった. 4歳3カ月時に上気道炎を繰り返し, 再度低蛋白血症を合併して, 全身浮腫も遷延した. T.P値は5.0 g/dl, Alb値は2.5 g/dl前後であった. 便中α1アンチトリプシンが陽性で, Tc標識化アルブミン

による腸管シンチグラムで腸管への漏出が確認された. PLEと診断されて低分子ヘパリン療法を開始されたが反応しなかった. 5歳7カ月時に浮腫が増強し, T.P値は4.5 g/dl, Alb値は2.3 g/dlと低下してきたためステロイド治療(Prednisolone; PSL 2 mg/kg/日)短期療法が施行されたが効果はなかった. その後もT.P値は4.0~4.5 g/dl前後, Alb値は2.0~2.5 g/dl前後と低アルブミン血症が持続していた. 5歳11カ月時に浮腫, 倦怠感が増強してきたため, 加療を目的に入院した(Table 1, カテーテル検査結果時系列参照).

3. 入院時現症

眼瞼と前脛骨部に浮腫を認め, 聴診上収縮期逆流性雑音 Levine 1/6, 腹部は平坦軟で肝を2 cm触知した. 血小板数(Plt)は104.9 万/μl, T.P値は2.9 g/dl, Alb値は1.4 g/dl, IgG 60 mg/dlであった.

4. 入院後経過(Fig. 1)

主要な炎症性サイトカインの測定を行ったが, 正常範囲内であった. 血管内皮細胞成長因子(vascular endothelial growth factor: VEGF), 血小板由来成長因子(platelet derived growth factor: PDGF)は異常高値を示した(Table 2). FCMでの細胞性免疫解析では, CD4陽性細胞が減少(3.3%)しており, CD4/CD8比0.14と低値であった(Table 3). 入院時の心臓カテーテル検査ではSaO₂ 95%, mPAPは10 mmHg, RpIは1.4 units・m², 肺動脈インデックス(PA index)177で肺動脈は全体的に細いものの局所的な狭窄は認めなかった. 共通房室弁閉鎖不全は軽度であった. 拡張障害, 収縮性心内膜炎などの所見は確認できなかった. methyl-prednisolone pulse(m-PSL pulse)療法(30 mg/kg/日)を開始し, 3クール施行した. 低分子ヘパリン療法(5,000 IU/m²/日)も併用開始したが, T.P値は2.8~

Table 1 Hemodynamic data at cardiac catheterization

Age (Y/M)	1Y3M	2Y9M	3Y5M	5Y11M
SaO ₂ (%)	86	95	94	95
SVCP (mmHg)	-	11	11	11
mPAP (mmHg)	12	9	8	10
RVP (s/e) (mmHg)	76/7	80/6	78/7	83/7
Rp Index (units・m ²)	1.5	1.0	1.0	1.4
RVEDV (% normal)	123	88	71	65
RVEF (%)	64	62	61	64

SaO₂: arterial oxygen saturation, SVCP: superior vena caval pressure, PAP: pulmonary artery pressure, RVP: right ventricular pressure, Rp: pulmonary vascular resistance, RVEDV: right ventricular end-diastolic volume, RVEF: right ventricular ejection fraction

Fig. 1 Clinical courses of the patient with PLE after the Fontan operation during 12 months of hospitalization from the age of 5 years 11 months.

VEGF: vascular endothelial growth factor, T.P: total protein, Alb: Albumin, CD: Cluster of Differentiation, m-PSL: methyl-prednisolone

3.2 g/dl, Alb 値は 1.3 ~ 1.6 g/dl で推移した。血小板上昇, VEGF 高値 2,370 (pg/ml), 遷延する浮腫などから慢性の血管炎も考えた。m-PSL 療法の後療法として PSL (2 mg/kg/ 日) 静脈注射を 1 カ月間継続した。治療開始から 2 カ月後には T.P 値は 3.6 g/dl, Alb 値は 1.9 g/dl まで上昇, 腹水は減少傾向となった。PSL を 1.5 mg/kg/ 日に減量し 1 カ月投与した後に PSL を 1 mg/kg/ 日に減量した。T.P 値は 3.5 ~ 4.0 g/dl, Alb 値は 2.1 ~ 2.5 g/dl で推移した。治療開始後 5 カ月でシクロスポリン A (Cyclosporin A; CyA) 併用内服を開始し,

PSL を静脈注射薬から経口内服薬に変更し漸減した。内服薬に変更後も T.P 値は 5.0 ~ 5.5 g/dl 前後, Alb 値は 2.8 ~ 3.5 g/dl で推移した。CyA はトラフ値を 100 ng/ml 前後で管理した。また, 治療開始 5 カ月経過した時点で, 腸管の病理組織検査を施行した。病理組織像は粘膜病変が主体で, 好中球, リンパ球, 形質細胞の浸潤が確認された。明らかな血管炎の所見は得られず, リンパ管の拡張所見も軽度で, 慢性腸炎の病理組織像であった。異型細胞は認めず, *Helicobacter pylori* 菌は陰性であった (Fig. 2)。PSL を 0.5 mg/kg/ 日に漸

Table 2 Laboratory findings and cytokine profiles on admission

	Patient	基準値
WBC (/μl)	8,700	
Neutrophil (%)	65.0	
Lymphocyte (%)	15.0	
Hemoglobin (g/dl)	10.1	
Plt (×10 ⁴ /μl)	104.9	
Total Protein (g/dl)	2.9	
Albumin (g/dl)	1.4	
IgG (mg/dl)	60	
TNF-α (pg/ml)	1.7	(0.6 - 2.8)
IL-6 (pg/ml)	3.6	(< 4.0)
IL-8 (pg/ml)	< 2.0	(< 2.0)
IL-10 (pg/ml)	< 2.0	(< 5.0)
VEGF (pg/ml)	2,750	(< 38.3)
PDGF (pg/ml)	35,600	(< 800)

WBC: white blood cell counts, Plt: platelet counts, IgG: immunoglobulin G, TNF-α: tumor necrosis factor-α, IL-6: interleukin-6, IL-8: interleukin-8, IL-10: interleukin-10, VEGF: vascular endothelial growth factor, PDGF: platelet derived growth factor

Table 3 CD antigen on admission (%)

lis (%)	Patient
Lymphocyte subsets	7.9
HLA-DR	74.5
CD3	27.3
CD4	3.3
CD8	23.5
CD25/4	10.0

HLA-DR: Human Leukocyte Antigen-D region, CD: Cluster of Differentiation

減した状態で T.P 値, Alb 値ともに安定していることを確認して退院した。

考 案

フォンタン術後患児の PLE の原因としては, 中心静脈圧の上昇, 収縮性心膜炎, 不整脈, non-fenestrated フォンタン術など多くは心臓に起因するものがあげられている。しかし大規模多施設共同研究における PLE 患児の約 23% は中心静脈圧の上昇はなく, 外科的介入により症状が改善したものはなかったと報告されている²⁾。本症例では心臓カテーテル検査の結果からは, 他のフォンタン術後症例と比較して, 中心静脈圧の上

昇, 心拍出量の低下や不整脈など認めず, 血行動態の破綻が主因と確認できなかった。血液凝固能の異常, 免疫学的異常や炎症性腸疾患など他の因子が PLE 発症の原因として関与している可能性があると考えた。

血液検査では, 血小板数の上昇, T.P 値, Alb 値および IgG 値の低下を認め, さらに血清 VEGF 値, PDGF 値の著明な上昇を認めた。単心室症例はフォンタン術前から遺伝的素因としての血液凝固能の異常, 免疫系の異常が示唆されている^{3,4)}。サイトカインの一種である VEGF, PDGF は血小板に多く含まれ, 血管炎症部位で血小板の活性化, 凝集に伴い放出され, 血管透過性の亢進, 血管新生を誘導する^{5,6)}。また血清 VEGF 値はフォンタン術後患児で高値を示し, 中心静脈圧の上昇との関連性や, フォンタン術前後の側副路血行路の発達との関連性も報告されている^{7,8)}。しかし本症例の心臓カテーテル検査では明らかな中心静脈圧の上昇は認めず, 側副血行路の発達も確認できなかった。このことから腸管の炎症, 腸間膜血管抵抗の上昇, 免疫系の異常などが VEGF, PDGF の産生亢進に関与していると考えられた。

炎症性腸疾患は, 炎症細胞の浸潤に伴い腸上皮細胞の膜の機能が破綻し, リンパ管の炎症および拡張を来すとされ, PLE の原因の一因として考えられている⁹⁾。病理組織検査は, 治療開始後 5 カ月経過してから行われたが, 慢性腸炎を示唆する所見であった。膠原病や自己免疫疾患に合併した PLE の病理組織像は, 粘膜, 粘膜下層にリンパ球や好中球などの炎症細胞が浸潤し, リンパ管の拡張を伴った慢性の炎症性腸炎像を示すとされており, 治療は免疫抑制療法が有効とされている。本症例は, 免疫抑制療法を行い寛解期に入ってから組織生検であり, 治療前の評価が不十分であるが, 組織像は共通する点が多いと判断した¹⁰⁾。

本症例では血清での炎症性サイトカインは上昇を認めなかったものの, FCM を用いた細胞性免疫の解析では CD4 陽性細胞の減少, CD4/CD8 比の著明な低下を認めた。先天性心疾患を合併した無脾症症例 13 例における細胞性免疫の解析では, 末梢血リンパ球中の CD4 陽性細胞は 29% 前後で, CD4/CD8 比は 1.1 前後とされており, 他の心疾患を合併しない正常コントロール群, 無脾症ではない他の先天性心疾患群と比較しても, 有意に CD4 陽性細胞数が減少し, CD4/CD8 比が低下していると報告されている¹¹⁾。しかし本症例の細胞性免疫の解析では, CD4 陽性細胞は 3.3% と著明に減少しており, CD4/CD8 比も 0.14 であったことから, PLE の原因として単に無脾症特有の免疫機能の低下だけとは考えにくいと判断した。選択的な CD4

Fig.2 Histopathological findings

A: Hematoxylin-Eosin stain, B: D2-40 staining for lymphatic endothelial marker.

Slide A show intestinal mucosa with infiltration of inflammatory cells, mainly composed of lymphocytes, plasma cells, and some neutrophils (A). Slide B show a small number of dilated lymph vessels (B).

陽性細胞の減少は、小児ではロタウイルス感染に合併した PLE 患児でも報告されている¹²⁾。またフォンタン術後に PLE を発症した無脾症患児で、腸管の炎症が関与していると考えられた症例では、本症例のように CD4 陽性細胞の著明な減少、CD4/CD8 比の低下、腸間膜から腹腔内への漏出などが報告されている^{1, 13)}。血行動態の破綻が主因であると確認できない PLE 患児で、先行感染に伴う腸管炎症局所領域での INF- γ 産生の亢進、自己免疫機序に伴う持続的な炎症が原因とする可能性も報告されている^{4, 14)}。本症例のようにステロイド、免疫抑制剤が著効した経過を考えると、先行感染を契機に T 細胞を中心とした免疫学的異常を来すことで、腸管壁に炎症性の細胞が動員され、ヘパラン硫酸をふくむ腸上皮細胞の膜の機能が破綻し、病変部位の血管透過性が亢進したことが、PLE の病態発症の一因となった可能性が考えられた¹⁵⁻¹⁷⁾。さらに本症例では PLE 発症後から IgG の低下を認めた。IgG の低下は、分子量が小さいため漏出蛋白の中心となっていることも考えられるが、同時に CD4 陽性細胞は B 細胞から抗体産生能を有する形質細胞への分化、増殖を促進する働きがある。免疫グロブリンの減少は単に腸管からの喪失だけでなく、免疫グロブリン産生そのものの低下も大きく関与していると考えられた¹⁾。

フォンタン術後 PLE は致死的になり得る合併症である。血行動態の破綻が主因であると判断できない PLE 症例では、FCM を用いた免疫検査、生検下での

組織学検査は治療方針を決めるうえで重要であり、かつ免疫系の異常が考慮される症例では、治療反応性を確認するうえで有用であると考えられた。

【参考文献】

- 1) Cheung YF, Tsang HY, Kwok JS: Immunologic profile of patients with protein-losing enteropathy complicating congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 2002; **23**: 587-593
- 2) Mertens L, Hagler DJ, Sauer U, Gewillig M, et al: Protein-losing enteropathy after the Fontan operation: an international multicenter study. PLE study group. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; **115**: 1063-1073
- 3) Odegard KC, McGowan FX, Zurakowski D, Laussen PC, et al: Coagulation factor abnormalities in patients with single-ventricle physiology immediately prior to the Fontan procedure. *Ann Thorac Surg* 2002; **73**: 1770-1777
- 4) Lenz D, Hambsch J, Schneider P, Tárnok A: Protein-losing enteropathy after Fontan surgery: is assessment of risk patients with immunological data possible? *Cytometry B Clin Cytom* 2003; **53**: 34-39
- 5) Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Voelkel NF, et al: In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am J Physiol* 1998; **275**: 1054-1061
- 6) Möhle R, Green D, Moore MA, Rafii S, et al: Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 663-668
- 7) Suda K, Matsumura M, Miyanishi S, Matsumoto M, et al:

- Increased vascular endothelial growth factor in patients with cyanotic congenital heart diseases may not be normalized after a Fontan type operation. *Ann Thorac Surg* 2004; **78**: 942-946
- 8) Mori Y, Shoji M, Nakanishi T, Nakazawa M, et al. Elevated vascular endothelial growth factor levels are associated with aortopulmonary collateral vessels in patients before and after the Fontan procedure. *Am Heart J* 2007; **153**: 987-994
 - 9) Ostrow AM, Freeze H, Rychik J. Protein-losing enteropathy after fontan operation: investigations into possible pathophysiologic mechanisms. *Ann Thorac Surg* 2006; **82**: 695-700
 - 10) Umar SB, DiBaise JK. Protein-losing enteropathy: case illustrations and clinical review. *Am J Gastroenterol* 2010; **105**: 43-49
 - 11) Wang JK, Hsieh KH. Immunologic study of the asplenia syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 1991; **10**: 819-822
 - 12) Iwasa T, Matsubayashi N. Protein-losing enteropathy associated with rotavirus infection in an infant. *World J Gastroenterol* 2008; **14**: 1630-1632
 - 13) Müller C, Wolf H, Göttlicher J, Eibl MM, et al. Cellular immunodeficiency in protein-losing enteropathy. Predominant reduction of CD3+ and CD4+ lymphocytes. *Dig Dis Sci* 1991; **36**: 116-122
 - 14) Shimizu T, Nagata S, Fujii T, Yamashiro Y, et al. Enhanced production of interferon-gamma as a possible cause of protein-losing enteropathy after modified Fontan operation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; **37**: 504-507
 - 15) Koch A, Hofbeck M, Feistel H, Singer H, et al. Circumscribed intestinal protein loss with deficiency in CD4+ lymphocytes after Fontan procedure. *Eur J Pediatr* 1999; **158**: 847-850
 - 16) Zellers TM, Brown K. Protein-losing enteropathy after the modified fontan operation: oral prednisone treatment with biopsy and laboratory proved improvement. *Pediatr Cardiol* 1996; **17**: 115-117
 - 17) Thacker D, Patel A, Dodds K, Rychik J et al. Use of oral budesonide in the management of protein-losing enteropathy after the Fontan operation. *Ann Thorac Surg* 2010; **89**: 837-842