

PSL 投与前および投与中に膵の異なる部位から FNAB により採取した標本から、膵細胞の再生が示唆され、本研究では、Ki-67 陽性所見が腺房、導管、ラ氏島細胞に認められ、AIP では、PSL により膵内・外分泌細胞の再生が促進されたと考えられた。また、PSL 投与中 PDX-1 陽性細胞がみられ、 α -amylase や insulin 陽性細胞との一致を認め、AIP では、膵内・外分泌細胞の再生に膵幹細胞の分化が関与すると推定された。

マウス膵では、胎生期だけでなく成熟導管細胞内に幹細胞が存在する可能性^{7,8)}や、導管細胞の化生上皮が腺房細胞やラ氏島細胞へ分化することが報告され、導管細胞の脱分化や化生上皮内に膵幹細胞が存在する可能性が推定されている⁹⁾。また、成熟ラットのタウロコール酸膵管内注入膵炎でも分化した太い導管上皮内に残存した膵幹細胞から再生が生じると報告されており¹⁰⁾、本研究でみられた AIP の膵再生は、傷害により脱分化した導管細胞や残存した膵幹細胞が内・外分泌細胞に分化し増殖することによりもたらされたと推定された。

PSL の作用は、脱分化を誘導するのかその後の分化を促進するのかが不明であり、今後の課題である。

E. 結語

AIP では、PSL により膵内・外分泌細胞に再生がもたらされると推定され、再生には傷害膵に残存した膵幹細胞の分化および増殖が関与すると推定された。

F. 参考文献

1. 吉田 仁, 田中滋城, 三田村圭二. 自己免疫性膵炎発症動物モデル. 肝胆膵 2001; 43: 179-87.
2. 吉田 仁, 田中滋城, 三田村圭二. 自己免疫性膵炎自然発症動物モデルを用いて. 土岐文武, 岡崎和一編. 自己免疫性膵炎 概念と病態 up-to-date 東京: 診断と治療社, 2001: 67-77.
3. 三田村圭二, 吉田 仁, 田中滋城, 新川淳一. 自己免疫性膵炎における膵細胞傷害とサイトカインの動態. 厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業難治性膵疾患に関する研究 平成 14 年度総括・分担研究報告書 2003: 189-93.

4. Saito T, Tanaka S, Yoshida H, Imamura T, Ukegawa J, Seki T, Ikegami A, Yamamura F, Mikami T, Aoyagi Y, Niikawa J, Mitamura K. A case of autoimmune pancreatitis responding to steroid therapy. Evidence of histologic recovery. *Pancreatology* 2002; 2: 550-6.
5. 吉田 仁, 田中滋城, 高橋 章, 池上覚俊, 新川淳一, 三田村圭二. 自験 2 例に学ぶ自己免疫性膵炎の診断と治療の問題点. 土岐文武, 岡崎和一編. 自己免疫性膵炎 概念と病態 up-to-date 東京: 診断と治療社, 2001: 156-62.
6. 吉田 仁, 田中滋城, 永山芳子, 竹内治男, 新川淳一, 池上覚俊, 高橋 章, 今村綱男, 北村勝哉, 三田村圭二. 自己免疫性膵炎と潰瘍性大腸炎. *消化器画像* 2002; 4: 66-74.
7. O'Reilly LA, Gu D, Sarvetnick N, Edlund H, Phillips JM, Fulford T, Cooke A. α -Cell neogenesis in an animal model of IDDM. *Diabetes* 1997; 46: 599-606.
8. Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 1999; 48: 507-13.
9. Song SY, Gannon M, Washington MK, Scoggins CR, Meszoely IM, Goldenring JR, Marino CR, Sandgren EP, Coffey RJ Jr, Wright CV, Leach SD. Expansion of Pdx1-expressing pancreatic epithelium and islet neogenesis in transgenic mice overexpressing transforming growth factor α . *Gastroenterology* 1999; 117: 1416-26.
10. Taguchi M, Yamaguchi T, Otsuki M. Induction of PDX-1-positive cells in the main duct during regeneration after acute necrotizing pancreatitis in rats. *J Pathol* 2002; 197: 638-46.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表 該当なし

2. 学会発表

- 1) 吉田 仁, 田中滋城, 北村勝哉, 今村綱男, 池上覚俊, 高橋 章, 新川淳一, 三田村圭二. 膵障害に応じた自己免疫性膵炎の治療の選択と予後—組織所見と膵外分泌機能からの評価—. 第 89 回日本消化器病学会総会 さいたま 2003 年 4 月 24-26 日
- 2) 吉田 仁, 田中滋城, 北村勝哉, 齋藤 剛, 栗井俊成, 今村綱男, 池上覚俊, 高橋 章, 新川淳一, 三田村圭二, 井廻道夫. 自己免疫性膵炎における prednisolone 治療と膵再生. 第 34 回日本膵臓学会大会(コンセンサスマーケティング) 千葉 2003 年 7 月 10-11 日
- 3) 栗井俊成, 吉田 仁, 湯川明浩, 松村卓哉, 田中滋城, 北村勝哉, 今村綱男, 池上覚俊, 新川淳一, 三田村圭二, 井廻道夫. 自己免疫性膵炎に大動脈および上腸間膜動脈壁肥厚を合併し prednisolone により緩解した一例. 第 34 回日本膵臓学会大会 千葉 2003 年 7 月 10-11 日
- 4) 吉田 仁, 栗井俊成, 湯川明浩, 松村卓哉, 北村勝哉, 今村綱男, 池上覚俊, 新川淳一, 田中滋城, 井廻道夫. 上腸間膜動脈周囲の線維性肥厚を合併した自己免疫性膵炎一例. 第 145 回東京内科医会臨床研究会 東京 2003 年 11 月 8 日

1. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

IV. 膵嚢胞線維症

1) 共同研究プロジェクト

膵嚢胞線維症の診断基準と疫学調査

分担研究者 成瀬 達 名古屋大学大学院病態修復内科学 助教授
共同研究者 玉腰暁子¹⁾, 林 櫻松²⁾, 吉村邦彦³⁾, 広田昌彦⁴⁾, 大槻 眞⁵⁾
¹⁾ 名古屋大学大学院予防医学/医学推計・判断学, ²⁾ 愛知医科大学
公衆衛生, ³⁾ 国家共済虎の門病院呼吸器センター内科,
⁴⁾ 熊本大学医学部消化器外科, ⁵⁾ 産業医科大学第三内科

【研究要旨】

膵嚢胞線維症 (cystic fibrosis, CF) の的確な早期診断をめざして, 現診断基準に含まれる各種診断法の再検討とその問題点を解決するために新たな検査法の開発を試みた。更に, 第3回全国調査(平成16年度)に向け, 準備を行った。診断基準の必須項目である汗のCl⁻濃度を簡便に測定できる指先汗クロール試験を開発した。従来のキャピラリー電気泳動の代わりに, 高感度クロライド電極でCl⁻濃度を測定することが可能(10⁻⁶M)であった。膵外分泌機能検査として便中エラスターゼ-1の測定を試み, 本法によりCFの重症度判定に必要なPI (pancreatic insufficient) とPS (pancreatic sufficient) を判定することが可能であると考えられた。平成16年度に予定されている第3回全国疫学調査の計画の立案と個人調査票(案)の作成を行った。平成11年度の全国疫学調査における1年間の受療患者数と同年の人口動態統計による0-19歳の人口から計算されたCFの発症頻度の推計値は1人/174万人であった。CFは非常に稀な疾患であるため, 調査漏れが多いと推計値の誤差が大きくなる。今回の調査では, これまでの調査で集められた症例の追跡調査と症例報告について調査を依頼する予定である。

A. 研究目的

膵嚢胞線維症 (CF) は, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) の遺伝子異常を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患である。CFTRは全身の上皮膜細胞に発現しており, その機能不全の程度により, 膵, 消化管, 気道粘膜, 輸精管など全身の上皮膜組織に様々な障害が生じるため, 多彩な病態を示す¹⁾。本症は日本人には非常に稀な疾患であり, Yamashiroら²⁾は発症頻度を出生350,000人に1人と推定している。わが国では, 平成11年度の研究班(小川班)によりCF診断基準が定められた³⁾。しかし, その後, 全国的な調査は行われておらず, 正確な疫学データはない。

CFの重症例では, 出生直後よりメコニウムイレウスや重篤な気道感染症を併発し, 多くの患児は乳幼児期に死亡する。当研究班では過去2回の全国調査(平成6年松野班, 平成11年小川班)⁴⁾⁵⁾が行われた。昨年度は, これらの全国調査の結果を解析することにより, 約80%の患者は10歳以上であり, 20歳を越える長期生存例が増えてきていることが明らかとなってきた⁵⁾。今後, CFの予後を更に改善するためには, 早期より本症を診断し, 幼少時の栄養管理と反復する呼吸器感染

症に適切に対応する必要がある。

そのためには, 全国の主な診療施設における診断と治療体制を確立することが極めて重要である。CFの診断には汗のCl⁻濃度の上昇(>60 mmol/L)に加え, 膵外分泌不全または典型的な呼吸器症状の存在が必要である³⁾。しかしながら, CFTRの機能の最も重要な指標である汗のCl⁻濃度一つをとっても, 全国調査で確認されたCFの1/3の症例で生理学的にはありえない検査値が報告されていることが明らかとなった⁶⁾。更に, 診断基準に含まれる膵外分泌機能不全の検査法も, 実際の症例に用いるには様々な問題点を有することが明らかとなってきた⁶⁾。

そこで, 本年度はCFの的確な早期診断をめざして, 臨床的に使い勝手の良く, かつ正確な診断法を確立するために現診断基準に含まれる各種診断法の再検討と新たな検査法の開発を試みた。更に, “特定疾患の疫学に関する研究班”と協議の上, 第3回全国調査(平成16年度)に向け, 準備を行った。

B. 研究方法

(1) CF診断基準の検査項目の検討

1. 汗のCl⁻濃度の測定法の改善

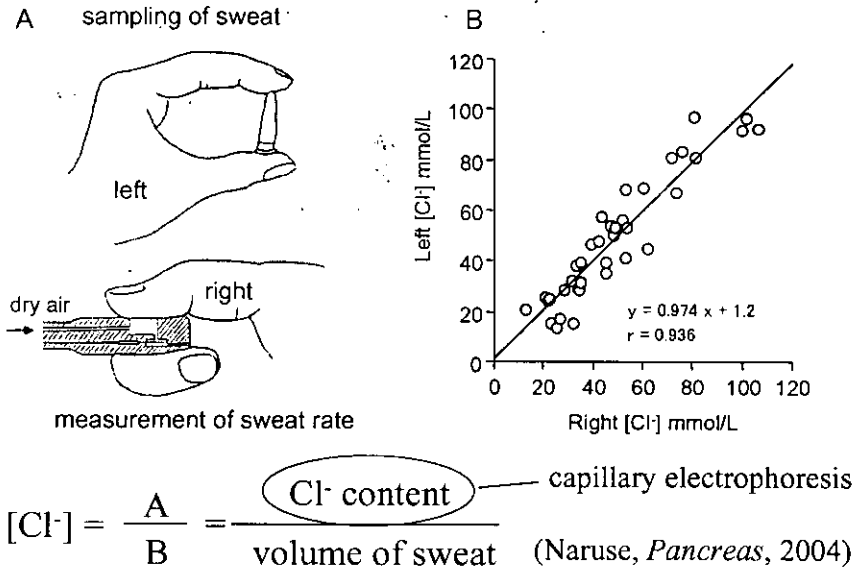


図1 指先汗クロール試験

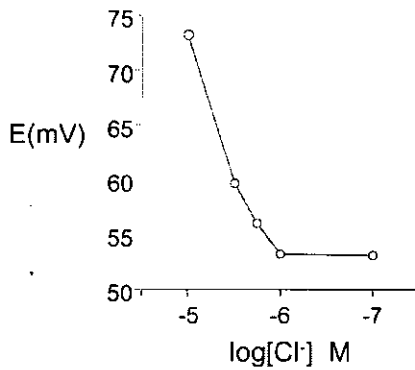


図2 高感度クロライド電極によるCl⁻濃度の測定

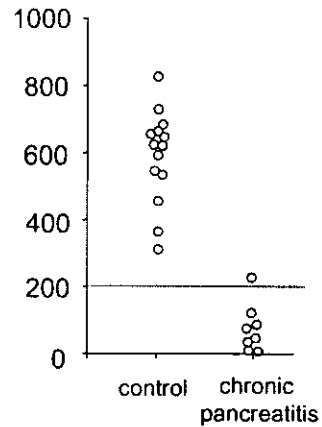


図3 便中エラスターゼ-1

平成 14 年度に報告した指先汗クロール試験法⁷⁾では (図 1), 採取検体中の微量の Cl⁻量を測定するためキャピラリー電気泳動法を用いた。本法は高感度で再現性の良い方法であるが, 装置が高価で測定時間がかかる欠点があった。そこで, 本年度は高感度のクロライド選択電極 (ラジオメーター社) を用いて迅速に測定する方法を検討した。

2. 膵外分泌不全の診断法の検討

診断基準に盛り込まれている診断法を再検討した。CF は膵外分泌機能不全 (pancreatic insufficiency: PI) を示す重症型と, 膵外分泌機能が保たれる (pancreatic sufficient: PS) 中等症・軽症型に分けられる。乳幼児時期におけ

る PI と PS の鑑別が便エラスターゼ 1 の測定により可能か否かを, 健常人と進行期の慢性膵炎患者 (セクレチン試験にて 3 因子低下に相当) の便にて比較検討した。

3. 第 3 回 CF 全国疫学調査の準備

“特定疾患の疫学に関する研究班” と協議し, 全国疫学調査の計画の立案と個人調査票 (案) の作成を行った。更に, 平成 11 年度の第 2 回全国調査における受療患者数の推計値から, わが国における CF の発症頻度の推定を行った。

(倫理面への配慮) 全国疫学調査については, 追跡調査を含めて, 名古屋大学倫理委員会の審査を受ける予定である。

C. 研究結果

1. 汗の Cl⁻濃度の測定法

高感度のクロライド電極を用いて汗の Cl⁻濃度の測定を試みた。図 2 に示すように、10⁻⁶M まで測定が可能であった。

2. 膵外分泌不全の診断法の検討

これまでの全国調査によると、膵外分泌機能検査として BT-PABA 試験が最も多く施行されていた。下痢を伴う CF 患者では偽陽性を示しやすいと推定されること、乳幼児では正確な尿量の測定が難しいことなどが問題と考えられた。また便中キモトリプシンおよび最も感度が高く定量性のあるセクレチン試験は、今後、施行が困難となる状況である。

図 3 は最近開発されたエラスターゼ 1 に対するポリクローナル抗体を用いた ELISA 測定キットによるコントロールと慢性膵炎患者における便中エラスターゼ 1 濃度を示す。大多数の膵外分泌不全患者は異常低値を示めた。

3. 第 3 回 CF 全国疫学調査の準備

(1) 個人調査票 (案) の作成 (添付)

第 2 回 (平成 11 年) の全国疫学調査の調査方法に準じて、調査対象を全国基幹病院 (400 床以上) の小児科、調査期間を 2004 年 1 年間および過去 10 年間とした。一次調査票の発送は、平成 17 年 1 月、二次調査票の発送は、平成 17 年 2 月の予定である。第 1 回、第 2 回の調査で集められた症例の追跡調査を併せて実施する。

(2) CF 発症頻度の推定

平成 6 年度の第 1 回調査では 29 例 (そのうち 11 例は死亡例) の CF 確診症例が集積された。平成 11 年の疫学調査では、1999 年 1 年間の受療患者数は 15 人 (95%信頼区間: 12-18) と集計された。この年の人口動態統計による 0-19 歳の人口から発症頻度の推計値は 1 人/1,740,000 人 (95%信頼区間: 1/218 万~1/145 万) であった。

D. 考察

我が国の膵嚢胞線維症の診断基準のポイントは、まず汗の Cl⁻濃度の上昇 (>60 mmol/L) の確認である⁸⁾。国際的な汗の Cl⁻濃度測定の標準的方法はピロカルピンイオン導入法である。本法は、熟練が必要とされることから、検査を正確に施行できる技術者の養成ならびに施設の拡充を図るか、よ

り簡便で、正確かつ非侵襲的で、幼児にも施行できる検査法の確立が必要である。我々は、簡便法として指先汗クロール試験⁷⁾を開発した。再現性が良く、被験者の負担が少なく反復施行しやすいので、信頼できる結果が容易に得られる。しかし、Cl⁻の測定に用いるキャピラリー電気泳動が非常に高価であるため、一般臨床に普及させるためには、工夫が必要であった。そこで高感度クロライド選択性電極による Cl⁻の測定を試みた所、測定限界は 10⁻⁶ M であった (図 2)。指先汗クロール試験の際の Cl⁻測定に十分な感度であり、キャピラリー電気泳動の代用として使用可能である。今後、ピロカルピンイオン導入法と指先汗クロール試験との相関を検討する必要がある。

診断基準の中で、膵外分泌機能の診断は CF の重症度判定に最も重要であり、消化酵素補充療法の適応を決めるためにも必要である。エラスターゼ-1 はキモトリプシンに比べて腸管内でほとんど分解されない。本法はヒトエラスターゼ-1 に特異的な抗体を用いているため、消化酵素の服用を中断せずに膵外分泌機能を間接的に推定できる長所がある。一般臨床の場で簡便に乳幼児にも繰り返し施行できる検査法である。今回の検討 (図 3) からは、便中エラスターゼ-1 により PI と PS をほぼ確実に判定することができると考えられる。今後、乳幼児を対象とした基礎的な検討が必要であるが、CF による膵外分泌不全の診断における有用性が期待される。

今回の個人調査票 (案) では、前回調査時の調査票を踏襲しつつ、長期経過の全貌を明らかにするために、病状 (重症度) の経過、各症状の発現時期、栄養状態とその経過、治療内容 (特に栄養療法) がわかるように工夫を加えた。さらに、第 1 回、第 2 回の調査で集められた症例の追跡調査を実施することにより、わが国における CF の予後を明らかにしたい。

平成 11 年の第 2 回疫学調査のデータを基に CF の発症頻度を推計したところ、1 人/174 万人と非常に低い値が出た。非常に稀な疾患であるため、数例の調査もれによっても推計値に大きな誤差を生む可能性がある。第 3 回全国疫学調査では、調査漏れを少なくするために、症例報告 (原著論文、会議録) を調べて、調査報告と重複しない例について調査を依頼する予定である。今後は、登録制を導入するなど、より正確な疫学データを得ることにより、CF 患者の QOL の改善と予後の改善に

役立つ対策を講じる必要があると思われる。

E. 結語

CF の診断法の改善により、本症の早期診断と治療が可能になる。CF は非常に稀な疾患であるため、疫学調査では、調査漏れを少なくする工夫が必要である。平成 16 年度の第 3 回全国調査では、これまでの調査で集められた症例の追跡調査および症例報告（原著論文、会議録）について調査を依頼する予定である。

F. 参考文献

1. Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Fujiki K, Hayakawa T. Cystic fibrosis and related diseases of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 511-26.
2. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 544-7.
3. 小川道雄, 玉腰暁子, 衛藤義勝, 山城雄一郎. 嚢胞線維症の全国調査. 厚生省特定疾患対策研究事業難治性膵疾患に関する調査研究班 平成 11 年度研究報告書 2000: 66-8.
4. 田代征記, 佐々木賢二. 本邦における膵嚢胞線維症 (cystic fibrosis) の遺伝子診断—N1303K の変異解析— 厚生省特定疾患難治性膵疾患調査研究班 平成 6 年度研究報告書 1994: 20-3.
5. 玉腰暁子, 林 櫻松, 大野良之, 小川道雄, 広田昌彦, 衛藤義勝, 山城雄一郎. 膵嚢胞線維症全国疫学調査成績. 厚生労働省特定疾患対策研究事業難治性膵疾患に関する調査研究班 平成 12 年度研究報告書 2001: 92-5.
6. 成瀬 達. 膵嚢胞線維症の診断法と診断体制の問題点. 厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班 平成 14 年度総括・分担研究報告書 2003: 205-9.
7. 成瀬 達, 北川元二, 石黒 洋, 水野伸匡, 洪繁, 鈴木康史, 竹村俊洋, 山本明子, 鈴木 厚, 濱田広幸, 横畑幸司, 嶋野洋子, 藤木理代, 近藤孝晴, 早川哲夫. 指先汗クロライド試験による CFTR 機能の評価. 厚生労働科学研究費補助金特定疾患対策研究事業 難治性膵疾患

に関する調査研究班 平成 14 年度総括・分担研究報告書 2003: 217-9.

8. 吉村邦彦, 西森 功, 衛藤義勝, 田代征記, 山城雄一郎, 小川道雄. 嚢胞線維症における CFTR 遺伝子の解析. 厚生労働省特定疾患対策研究事業難治性膵疾患に関する調査研究班 平成 12 年度研究報告書 2001: 96-100.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naruse S, Ishiguro H, Suzuki Y, Fujiki K, Ko SBH, Mizuno N, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Jin C, Suzuki R, Kitagawa M, Tsuda T, Kondo T, and Hayakawa T. A finger sweat chloride test for the detection of the high-risk group of chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004; in press.

2. 学会発表 該当なし

I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

囊胞線維症 調査個人票 (案) 記載日 2005年 月 日

施設名: _____ 診療科: _____ 記載者氏名: _____
 所在地: _____

調査票は実態把握のためにのみ使用し、個人の秘密は厳守します。該当する番号を選択し、またはご記入ください。

患者イニシャル (姓、名)	性別 1. 男 2. 女	貴施設 カルテ番号	患者現住所 都道府県・不明
生年月日	年 月 日		
前回(1999年)、前々回調査(1994年)の登録	1. なし 2. 1999年調査 3. 1994年調査 4. 不明		
家族内発症	1. なし 2. あり (続柄 a. 父 b. 母 c. 兄 d. 弟 e. 妹 f. 妹 g. その他)		
医療費の公費負担	1. なし 2. あり [a. 特定疾患治療研究費 ()] 3. 不明 b. その他 ()		
受療状況 (最近1年間)	1. 主に入院 (月/年) 2. 主に通院 (回/月) 3. 入院と通院 4. 転院 (転院先) 5. 死亡 6. その他 () 7. 不明		
過去の受療状況	年齢 入院期間 主な入院理由、症状		
	0~5歳 (月/年)		
	5~10歳 (月/年)		
	10~15歳 (月/年)		
	15~20歳 (月/年)		
	20歳~ (月/年)		
初診医療機関	1. 貴施設2. 他施設 () 3. 不明	推定発症年月	年 月・不明
診断した医療機関	1. 貴施設2. 他施設 () 3. 不明	貴施設初診年月	年 月・不明
出生時の身長と体重 () cm () kg		診断年月	年 月・不明
現在の身長と体重 () cm () kg		母子手帳の成長曲線など、発育の経過がわかる資料がありましたら、匿名の上、コピーを添付していただければ有難く存じます。	
診断基準を満たす項目	a. 発汗試験の異常 b. 腓外分泌不全 c. 呼吸器症状 d. その他 (胎便性イレウス、家族歴)		
症状	有無 初発年齢 現在の状況		
消化器症状	胎便性イレウス a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	脂分泌 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	栄養不良 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	腸炎発作 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	便秘 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	呼吸困難 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	繰り返す感染 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	副鼻腔炎 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	気管支拡張症 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	樽状胸郭 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	低張性脱水 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	発汗過多 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	糖尿病 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	発音不全 a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		
	() a. あり b. なし c. 不明 歳 月 胎癒 b. 改善 c. 不変 d. 悪化 e. 不明		

汗中電解質検査	1. 異常あり 2. 異常なし 3. 検査せず 4. 不明 方法: a. ビロカルペンイオン導入法 b. その他 () 結果 ①: Cl ⁻ () mEq/L, Na ⁺ () mEq/L 施行時年齢: 歳 ヶ月 ②: Cl ⁻ () mEq/L, Na ⁺ () mEq/L 施行時年齢: 歳 ヶ月
尿外分泌機能検査	1. 異常あり 2. 異常なし 3. 検査せず 4. 不明 施行時年齢: 歳 ヶ月 方法: 施行項目に○ 結果: a. 便中脂肪測定 b. PFD 試験 (BT-PABA 試験) c. 便中キモトリブリン d. セクレチン試験 e. 血中腫瘍素測定 (トリブリン活性など)
喀痰培養検査	a. Staphylococcus aureus (MSSA) b. MRSA c. Pseudomonas aeruginosa d. Haemophilus influenzae e. Proteus vulgaris f. Candida albicans g. その他 ()
遺伝子診断	1. 施行あり 2. 施行なし 3. 不明 未施行の場合: 遺伝子診断を (施行時年齢: 歳 ヶ月) 1. 希望する 2. 希望しない 結果:
治療	1. 薬物療法 (薬剤名と量をお書きください。) a. 抗菌薬 b. 去痰薬 c. 気管支拡張薬 d. 消化酵素剤 e. その他 2. 在宅酸素療法 3. 栄養療法 (中心静脈 () (種類とカロリー)) b. 経腸栄養 () 4. 理学療法 5. 手術 (方法と年齢) 6. その他
現在の状況 (診断時と比較)	1. 治癒 2. 改善 3. 不変 4. 悪化 5. 死亡 最終受診日 年 月 日 死亡の場合 死亡年月日: 年 月 日 死因: () 剖検: 1. あり 2. なし 3. 不明 剖検所見:
症例報告の有無	学会発表 a. あり b. なし c. 不明 第 () 回 () 年 学協会名: _____ 紙上発表 a. あり b. なし c. 不明 () 年 () 巻 (~) 頁 雑誌名: _____ (もしありましたら、抄録もしくは論文のコピー等を添付いただければ幸いです。)

厚生労働省難治性疾患克服研究事業 難治性肺炎患児に関する調査研究班
 特定疾患の疫学に関する研究班

IV. 臍嚢胞線維症

2) 各個研究プロジェクト

日本人 cystic fibrosis 患者の CFTR 遺伝子変異解析

研究報告者 吉村邦彦 国家共済虎の門病院呼吸器センター内科 部長
共同研究者 安斎千恵子¹⁾, 衛藤義勝²⁾
¹⁾ 国家共済虎の門病院呼吸器センター内科, ²⁾ 東京慈恵会
医科大学 DNA 医学研究所遺伝子治療研究部門

【研究要旨】

高率に肺外分機能障害を伴う嚢胞性線維症 (cystic fibrosis, CF) は従来はわが国では稀な疾患と考えられていたが, CF の実態とその原因遺伝子 CFTR の変異状況は, 今や次第に明らかにされつつある. PCR-SSCP 解析と直接塩基配列解析を用いた遺伝子変異の検出などにより, これまですでにわが国の CF 患者の十数例においてその遺伝子変異が確認された. 今回さらに新たに 2 症例の遺伝子変異を追加解析し, 460insAT, del1.4kb の新たな変異を確認した. 日本人の CF 患者における CFTR 遺伝子変異は, 欧米人の変異スペクトラムと明らかに様相を異にしており, 欧米人を対象としたスクリーニング体系では変異の検出は不可能である. 今後日本人 CF 症例をさらに出来る限り多く集積・解析し, 原因となる CFTR 遺伝子の病的変異の種類や頻度を明らかにしたうえで, わが国における CF の病態の解明と合わせ, 日本独自の遺伝子変異スクリーニング体制を確立してゆく必要がある.

A. 研究目的

CF は肺, 膵臓, 消化管などの全身の管腔臓器を冒す常染色体劣性遺伝性疾患であり, cAMP 依存性 Cl⁻イオンチャネル CFTR をコードする遺伝子の突然変異に起因する¹⁻⁵⁾. CF は欧米白人種に高率に発症するが, 一方日本人を含む東洋人種における CF の発症頻度はきわめて低いとこれまで考えられていた³⁾. わが国の CF 症例に関しては昭和 57 年からの厚生省特定疾患難治性膵疾患研究班による全国調査の結果, 29 例の確診例が報告されているが⁶⁾, Yamashiro ら⁷⁾の報告によるとわが国ではこれまでに文献的に約 120 例の CF 臨床診断例が記載され, 発症頻度も出生 35 万人あたり 1 人程度と推定された. これはハワイ在住の東洋人での CF 発症頻度 (出生 9 万人以上あたり 1 人) と概ね矛盾しないため⁸⁾, これらを勘案するとおおよそ出生 10 万人あたり 1 人程度の発症率と考えられる. これらの患者における CFTR 遺伝子変異解析に関しては, 過去には DNA サンプルの得られた患者での Δ F508 など欧米で頻度の高い数種の変異検索, ないしは限られたエクソンでの PCR-single stranded conformation polymorphism (SSCP) 解析などが検討されたのみであり, 有意な CFTR 遺伝子異常は確認されないまま, その変異状況は長い間不明であった^{3,6)}. その後の解析から明らかになるように, この主な理由はわが国の

CF 患者における CFTR 変異が欧米のそれらと比較した場合に, 変異の頻度もさることながらスペクトラムが全く異なっているためであった. しかしながら, このような経緯の中, 数年前から漸くわが国での CFTR 変異の状況が明らかにされてきている^{3,6)}. 著者らは PCR-SSCP 法, 直接シーケンス法などによる 27 エクソン全ての変異検出体制を確立し, 当研究班によるわが国での全国調査で集積された症例などを中心に複数の CF 確診例ないし疑診例の CFTR 遺伝子変異検索を進めてきた^{3,6)}. この結果, 欧米でもきわめて稀な変異や, これまで全世界の CF Mutation Database (CFMD) に登録記載のない複数の CFTR 変異を新たに検出, 確認した^{9,10)}. また, 他施設からも 2,3 の変異解析報告がなされている^{11,12)}.

B. 研究方法

今年度は 2 例の男子 CF 患者における CFTR 遺伝子変異を解析した.

症例 1 は 28 才男性で両親の血族結婚はなく, 満期正常分娩であった. 3 歳時より湿性咳嗽が出現し 6, 12, 13 歳でそれぞれ肺炎に罹患した. 13 歳から喀痰中に緑膿菌を持続的に検出するようになった. 14 歳時に肺炎が再発し, 呼吸不全のため埼玉県立小児医療センター受診. 糖尿病, 肝障害指摘. 入院精査し, 汗試験で Cl⁻117 mEq/L な

どより CF と診断された。胸部 X 線検査では、上葉を中心に気管支拡張と肺炎像を認めた。副鼻腔全般に含気低下。超音波上、肝臓は肝硬変、脾臓縮小著明。脾外分泌および内分泌機能不全（糖尿病）を合併した CF と診断され、加療を継続していた。その後、呼吸機能低下が進行し、28 歳時（2002 年 9 月 19 日）に埼玉県立循環器・呼吸器センターにて呼吸不全のため死亡した。本例の CFTR 遺伝子変異解析は、死亡後に患者家族に対するインフォームド・コンセントの後、剖検肝臓組織からキアゲンのキットを用いて DNA を抽出した。その後、全 27 エクソンの 5'-, 3'-近傍を含む領域をまず PCR-SSCP 法にて解析し、患者検体の泳動度に健常者と比べて差異が認められた場合にさらに直接シーケンス法にて実際の塩基配列を逐一解析した。また、PCR-SSCP 法で不確定な箇所は、同様に直接シーケンス法にて解析をおこなった。

症例 2 は 11 歳の男児で、両親はまた従兄妹同士。満期正常分娩で妹 2 人は健常である。現病歴では 6 歳時より反復する肺炎のため福岡赤十字病院に入院を繰り返していた。この当時から喀痰中に緑膿菌を持続的に検出するようになった。10 歳時に副鼻腔炎の診断を受けた。2001 年（10 歳時）9 月に肺炎にて入院中、右気胸を発症し、その後の気胸のコントロールがつかず、12 月九州大学小児外科に転院するものの、手術後呼吸器感染症を併発して 11 歳で呼吸不全にて死亡した。本例では汗試験で Cl^- 154 mEq/l と高値、かつ喀痰より緑膿菌持続検出。血清アミラーゼ、リパーゼの低値、腹部 CT での脾臓の萎縮所見より、脾

機能不全の合併ありと診断のもと、酵素補充療法、栄養管理を受けていた。以上の経緯から生前に CF と診断されていたものの、1996 年に施行した $\Delta F508$ の有無に関する外注検査では陰性であった。胸部 X 線検査では上葉を中心に気管支拡張と肺炎が認められた。本例の CFTR 遺伝子変異解析は、患児と両親からの同意を得て、患児の末梢血単核球からキアゲンのキットを用いて DNA を抽出した。その後、全 27 エクソンの 5'-, 3'-近傍を含む領域を、まずアリル特異的 dot blot hybridization 法にて解析し、さらに PCR-SSCP 法、直接シーケンス法にて実際の塩基配列を逐一解析した。

（倫理面への配慮）CFTR 遺伝子変異検索に際しては、第 1 例では患者の死亡後に両親に対し、その臨床的、遺伝学的意義を説明の上、同意を取得した。また第 2 例では生前に患児と両親から同意を取得した。いずれも DNA 抽出作業は検体を送付受領後、東京慈恵会医科大学 DNA 医学研究所において施行された。今後も得られた遺伝子変異解析の結果は、そのインフォームド・コンセントに則して提示されることになる。

C. 研究結果

今回提示した症例 1 の遺伝子変異解析では、まずエクソン 1 にこれまで複数の CF 症例で確認された多型 125C が見いだされたほか^{3,13,14)}、もう一方のアリルのエクソン 4 にこれまで報告のない変異 460insAT がヘテロ接合体として認められた。この変異は cDNA の 460 番目の塩基位置に AT の 2 塩基が挿入されたもので、結果としてエクソン 4

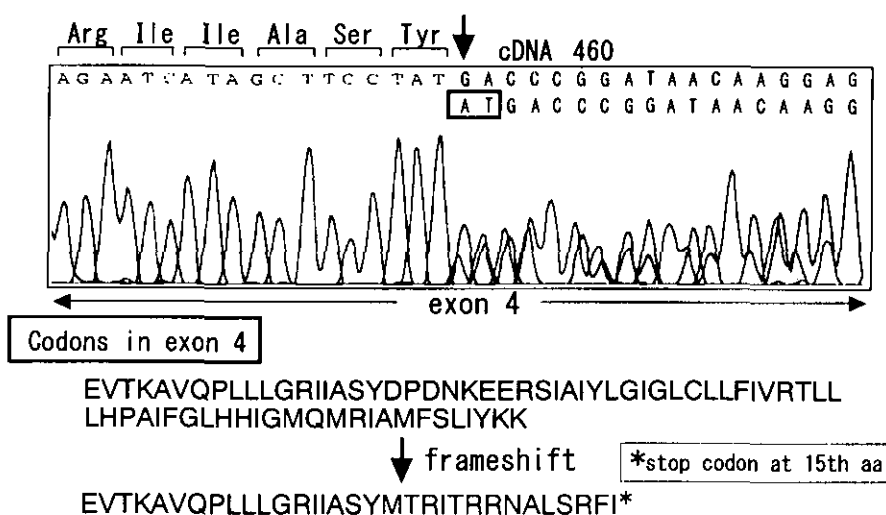


図 1 症例 1 の一方の CFTR アリルに見いだされた 460insAT 変異。cDNA の 460 番目の塩基位置に 2 塩基 AT が挿入され、その結果 frameshift が起こり以後 15 番目のコドンが停止コドンになっている。

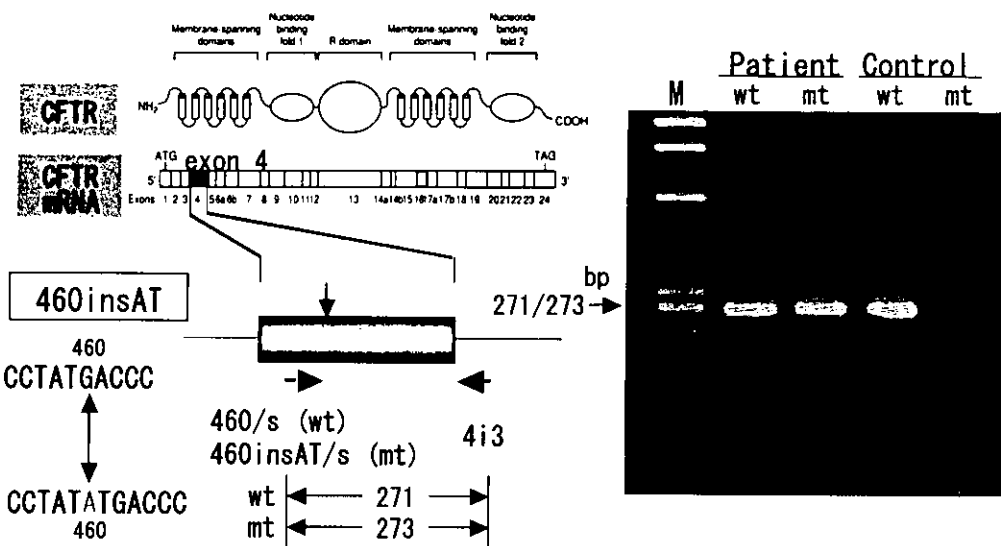


図2 症例1の460insAT変異のアリル特異的PCR増幅反応による確認。患者では460/s(wt)と460insAT/s(mt)プライマーのいずれでもPCR増幅されるが、健常者では460insAT/s(mt)プライマーでは増幅反応が起こらない。

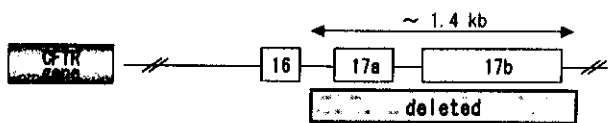


図3 症例2のCFTR遺伝子のエクソン17a, 17bを含む1.4 kbの欠失。本症例は両アリルに同一の変異が存在するホモ接合体である。

でコードされるアミノ酸に frame shift を起こし挿入部位から15番目が停止コドンとなる変異である(図1)。さらに変異アリル特異的プライマ

ーを用いたPCR増幅により、患者が同変異のヘテロ接合体であることを確認している(図2)。

症例2はイントロン16からイントロン17bに及ぶ約1.4 kbの領域の欠失がホモ接合体として確認された(図3)。これは両親が血族結婚であることよりともに同一変異のヘテロ保因者であると想定できるが、検索はされていない。残念ながら、CFTR遺伝子の欠失部位の塩基配列の詳細は患児の死亡により確認ができていないが、表現型としては高度の臨床症状を呈した膵機能不全を併発した重症型のCFである。また、症例1と同様、125Cが両アリルに認められている。

表1 これまでわが国でCFTR遺伝子変異が確認されたCF症例とその臨床的特徴

Case	Age	Sex	PI/PS	CI-	Mutation	Exon	Mutation	Exon	CP	Outcome
1**	23y	F	PI	96	DF508	10	R347H+D979A	7, 16	-	alive
2**	23y	F	PI	102	DF508	10	R347H+D979A	7, 16	-	alive
3	15y	F	PI	201	H1085R	17b	H1085R	17b	+	alive/HOT
4	8y	M	PI	153	1525-18G->A	ivs 9	1742delAG	11	-	alive
5	1y5m	F	PI	126	M152R	4	1540del110	10	-	alive
6	1y1m	F	PI	ND	DF508	10	L571S	12	-	deceased
7	15y	M	PI	74	125C	1	Q98R	4	-	alive
8	42y	F	PS	ND	E217G	4	Q1352H	22	-	deceased
9*	21y	M	PI	166	125C	1	L441P	9	-	alive/HOT
10*	16y	F	PI	100	125C	1	L441P	9	-	alive
11	9y	F	PI	166	1540del110	10	1540del110	10	-	alive
12*	30y	M	PS	403	125C+T1086I	1, 17b	125C+T1086I	1, 17b	-	alive (ABPA)
13*	28y	F	PS	ND	125C+T1086I	1, 17b	125C+T1086I	1, 17b	-	alive
14	17y	F	PS	ND	R75X	3	R347H	7	-	alive
15	26y	F	PI	121	E267V	6b	T663P	13	-	alive (TP)
16	28y	M	PI	117	125C	1	460insAT	4	-	deceased
17	11y	M	PI	154	125C+del1.4kb	1, 17a, b	125C+del1.4kb	1, 17a, b	-	deceased

PI/PS: pancreatic insufficiency/sufficiency, CP: consanguineous parents, ** twins, * siblings

これまでにわが国において遺伝子変異解析の行われた CF 症例の一覧を表 1 に示す。

D. 考察

わが国の CF 研究は、本研究班およびその前身である厚生省特定疾患難治性肺疾患調査研究班を中心に進められ、主に肺機能不全を呈した重症例の集積と全国施設での実態調査などに主眼が置かれてきた。しかしながら、これら症例における原因遺伝子 CFTR の変異解析と遺伝子診断に関しては必ずしも十分ではなかった。近年漸く変異検出体制が確立され、着実に変異の様相が明らかにされつつある^{3,6,9,10)}。今年度研究でも改めて明らかにされたように、すでに全世界では 1,000 種以上の病的変異が報告されているにも拘わらず、わが国の CF 患者における CFTR 遺伝子変異はきわめて稀なもの、あるいはこれまで報告のないものが大半を占め、欧米人の変異スペクトラムと全く様相を異にしている^{3,6)}。したがって欧米人を対象としたスクリーニング体系では変異は検出されない可能性が高い。一方、CFTR が成因や病態の形成に関わる、いわゆる CFTR-関連疾患は多岐にわたり、さらにその概念が拡大しつつある³⁾。例えば、男性不妊の先天性両側精管欠損症 (CBAVD)¹⁵⁾、びまん性汎細気管支炎 (DPB)¹⁶⁾、慢性肺炎、慢性副鼻腔炎¹⁷⁾などでは、健常者やその他の疾患対照に比べ明らかに変異 CFTR 対立遺伝子の保有率が高いことがこれまでに明らかにされている³⁾。

E. 結語

人種や民族により CFTR 変異のスペクトラムが大きく異なっているため、診断や保因者スクリーニングの上で、対象集団の人種、民族性がきわめて重要である。今後わが国の日本人 CF 症例を本研究班を中心に、さらに単一臓器病変のみを呈する CFTR-関連疾患にもその対象を広げて出来る限り多く解析し、原因となる CFTR 遺伝子の病的変異の種類、頻度を明らかにしたうえで、わが国独自の、かつ疾患特異的なスクリーニング体制をさらに確立してゆかなければならない。

F. 参考文献

1. Welsh MJ, Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th

- edn. New York: McGraw-Hill, 1995: 3799-876.
2. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992; 256: 774-9.
3. 吉村邦彦. のう胞性線維症. *日内会誌* 2003, 92:1198-205.
4. Tsui L-C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: S47-53.
5. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>.
6. 吉村邦彦. 日本人 cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異解析. 厚生労働省特定疾患対策研究事業難治性肺疾患に関する調査研究班 平成 14 年度総括・分担研究報告書 2003: 213-6.
7. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 544-7.
8. 吉村邦彦. 嚢胞性線維症の保因者スクリーニング. *遺伝子診療 '96*. 東京: 医学書院. 1996: 63-6.
9. Yoshimura K, Wakazono Y, Iizuka S, Morokawa N, Tada H, Eto Y. A Japanese patient homozygous for the H1085R mutation in the CFTR gene presents with a severe form of cystic fibrosis. *Clin Genet* 1999; 56: 173-5.
10. Morokawa N, Iizuka S, Tanano A, Katsube A, Muraji T, Eto Y, Yoshimura K. Severe cystic fibrosis in a Japanese girl caused by two novel CFTR gene mutations M152R and 1540del10. *Hum Mut, Mutation and Polymorphism Report #109*, 2000 (online).
11. Hojo S, Fujita J, Mywaki H, Obayashi Y, Takahara J, Bartholomew DW. Severe cystic fibrosis associated with deltaF508/R347H+D979A compound heterozygous genotype. *Clin Genet* 1998; 53: 50-3.
12. Seki K, Abo W, Yamamoto Y, Matsuura A. Identification of novel mutations of the CFTR gene in a Japanese patient with cystic

- fibrosis. *Tohoku J Exp Med* 1999; 187: 323-8.
13. Cutting GR, Curristan SM, Nash E, Rosenstein BJ, Lerer I, Abeliovich D, Hill A, Graham C. Analysis of four diverse population groups indicates that a subset of cystic fibrosis mutations occur in common among Caucasians. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1185-94.
 14. Yoshimura K, Iizuka S, Morokawa N, Kikuta H, Kadota J, Kohno S, Tai H, Eto Y. Polymorphic 125C in the 5' untranslated region of the CFTR gene exon 1 is likely causative of severe phenotype of cystic fibrosis in Japan. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: A656.
 15. Anzai C, Yoshimura K, Morokawa N, Okada H, Kamidono S, Eto Y. High prevalence of mutations of the CFTR gene in Japanese individuals with congenital bilateral absence of the vas deferens. *J Cystic Fibrosis* 2003; 2: 14-8.
 16. Yoshimura K, Iizuka S, Anzai C, Morokawa N, Tanabe O, Kojima A, Nakata K, Eto Y. Diffuse panbronchiolitis is closely associated with mutations of the CFTR gene. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: A77.
 17. 吉村邦彦, 坂本 晋. Cystic fibrosis と鼻・副鼻腔病変. *JOHNS* 2003; 19: 820-824.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Anzai C, Yoshimura K, Morokawa N, Okada H, Kamidono S, Eto Y. High prevalence of mutations of the CFTR gene in Japanese individuals with congenital bilateral absence of the vas deferens. *J Cystic Fibrosis* 2003; 2, 14-18.
- 2) 吉村邦彦. 日本人 cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異解析. 厚生労働省特定疾患対策研究事業難治性肺疾患に関する調査研究班 平成 14 年度総括・分担研究報告書 2003: 213-6.

- 3) 吉村邦彦, 坂本 晋. Cystic fibrosis と鼻・副鼻腔病変. *JOHNS* 2003; 19: 820-4.
- 4) 吉村邦彦. のう胞性線維症. *日内会誌*, 2003; 92: 1198-205.
- 5) 吉村邦彦. 日本人における CFTR の遺伝子多型. 工藤翔二, 土屋了介, 金澤 実, 太田 健編. *Annual Review 2003 呼吸器*. 東京: 中外医学社. 2003: 128-36.

2. 学会発表

- 1) Kishi K, Homma S, Kurosaki A, Motoi N, Kono T, Nakata K, Yoshimura K. Clinico-pathological characteristics of peripheral lung tumors less than 1 cm in diameter. American Thoracic Society 2003 International Conference. Seattle May 16-21, 2003
- 2) Tsuboi E, Kawabata M, Kishi K, Narui K, Homma S, Nakatani T, Kato M, Endo K, Inoue R, Iki E, Nakata K, Yoshimura K. Long-term effects of pulmonary rehabilitation in patients with pulmonary emphysema. American Thoracic Society 2003 International Conference. Seattle May 16-21, 2003
- 3) Fujiwara T, Tanaka N, Kataoka M, Nakamura H, Saji H, Kato H, Saijo Y, Nukiwa T, Yoshimura K, Sato T, Akiba T, Eto Y. Multicenter phase I trial of adenovirus expressing the wild-type p53 gene (ad-p53) administered intratumorally for the treatment of advanced lung cancer patients: safety, efficacy, transgene expression, and shedding in biological fluids. The 9th Annual Meeting 2003 of the Japanese Society of Gene Therapy. Tokyo July 18-20, 2003

1. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

慢性膵炎の遺伝的背景：日本人の CFTR 遺伝子多型の研究

研究報告者 成瀬 達 名古屋大学大学院病態修復内科学 助教授
共同研究者 藤木理代, 石黒 洋, 洪 繁, 山本明子, 竹村俊洋,
北川元二, 近藤孝晴¹⁾, 早川哲夫²⁾
¹⁾ 名古屋大学大学院病態修復内科学,
²⁾ 国家共済名城病院

【研究要旨】

慢性膵炎の遺伝的背景を明らかにする目的で, CFTR 遺伝子変異および多型を解析した. 健常人 162 名, 慢性膵炎患者 65 名 (アルコール性 51 名, 特発性 14 名) を対象とした. 白人の 20 の主な嚢胞線維症原因 CFTR 遺伝子変異と日本で報告されている 9 の CFTR 遺伝子変異は, 健常人, 慢性膵炎患者ともに認めなかった. 正常な CFTR 蛋白量が減少する (TG)12 多型が, 日本人では白人に比べ非常に多い特徴があった. アルコール性慢性膵炎では, M470-(TG)12 ホモ接合体の頻度が健常人に比べて有意に高かった. 一方, 特発性慢性膵炎は, CFTR 機能が低下する (TG)11-V470 ホモ接合体に Q1352H または R1453W 多型を合併する症例が多かった.

A. 研究目的

CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) は cAMP に調節される Cl⁻チャネルであり, 全身の上皮膜細胞に発現している. 膵臓では, 膵導管細胞の管腔膜に発現し膵液への HCO₃⁻の分泌に重要な役割を果たしている. 嚢胞線維症 (CF) では, CFTR 遺伝子変異により Cl⁻チャネル機能が消失するため, 汗の Cl⁻濃度が高くなる. また, 消化管, 気道, 膵管上皮細胞における Cl⁻分泌障害のため分泌液が粘調になる. その結果, 胎便性イレウス, 気道感染症の反復による呼吸不全, 膵外分泌機能不全による栄養障害を引き起こす. びまん性汎細気管支炎, 副鼻腔炎, 男性不妊症, 特発性膵炎の一部の患者は CFTR 遺伝子変異を高頻度に合併しており, CFTR 関連疾患として注目されている¹⁾.

CF は欧米人に多いがアジアの諸国では極めて稀な疾患で, 日本人の CFTR 遺伝子変異や多型の報告も少ない. 一方, 慢性膵炎の発症率は欧米と日本でほぼ同じである. 日本人の慢性膵炎においても, 汗の Cl⁻濃度が高い患者が多く, CFTR の機能低下の存在が強く示唆されている^{2), 3)}. 本研究では, 日本人の慢性膵炎患者における CFTR 遺伝子変異および多型, 特に exon 9 の欠損が高まる (TG)repeat, poly T および Cl⁻チャネル機能を低下させる M470V 多型を中心に解析した.

B. 研究方法

健常人162名, アルコール性慢性膵炎51名, 特

発性慢性膵炎患14名を対象とした. 慢性膵炎の診断は日本膵臓学会慢性膵炎臨床診断基準に従った.

末梢血から DNA を抽出した. (TG)repeat および poly T はダイレクトシーケンス法により, M470V は制限酵素 (HphI) により解析した. ハプロタイプマーカーとして intron6a にある (GATT)_n を用いた.

ヨーロッパ人で最も頻度の高い 20 の CF 原因遺伝子変異 (E60X, R117H, R334W, R347P, A455E, ΔI507, ΔF508, G542X, G551D, R553X, 621+1G→T, 1078delT, R1162X, S1251N, W1282X, N1303K, 1717-1G→A, 2183AA→G, 3659delC, 3849+10kb C>T) は解析キット (AstraZeneca 社) により調べた. 日本で報告された 9 の CF 原因遺伝子変異 (R75X, Q98R, M152R, R347H, L441P, L571S, D979A, H1085R, T1086I) および非 CF 原因遺伝子多型 (Q1352H, R1453W) は Masscode System による SNP 解析を行った.

(倫理面への配慮) 名古屋大学倫理委員会の承認を得ている.

C. 研究結果

1. CF 原因遺伝子変異

欧米および日本で報告されている 29 の CF 原因遺伝子変異は健常人, 慢性膵炎ともに認めなかった.

2. poly T

日本人の大多数 (97.5%) は 7T であった. 5T の

表1 poly T のアレル頻度

	alleles	5T	6T	7T	9T
normal subjects	324	2 (0.6)	4 (1.2)	316 (97.5)	2 (0.6)
chronic pancreatitis	130	2 (1.5)	0 (0.0)	125 (96.2)	3 (2.3)
alcoholic	102	2 (2.0)	0 (0.0)	97 (95.1)	3 (2.9)
idiopathic	28	0 (0.0)	0 (0.0)	28 (100.0)	0 (0.0)

(%)

頻度は健常人，慢性膵炎ともに低く，poly T の分布に各群間に有意差を認めなかった．新たに6Tを健常人(1.2%)に発見した(表1)．

3. TG repeat

健常人と慢性膵炎で，(TG)11 と(TG)12 のアレル頻度はほぼ同じであった(表2)．しかし，アルコール性慢性膵炎の(TG)12 ホモ接合体の頻度は健常人に比べ有意に(p=0.038)高かった(図1)．特発性慢性膵炎では(TG)11 ホモ接合体と(TG)12 ホモ接合体の頻度が高い傾向にあった．

表2 TG repeat のアレル頻度

	alleles	TG10	TG11	TG12	TG13
normal subjects	324	0 (0)	165 (51)	156 (48)	3 (1)
chronic pancreatitis	130	1 (1)	57 (44)	71 (55)	1 (1)
alcoholic	102	1 (1)	42 (41)	58 (57)	1 (1)
idiopathic	28	0 (0)	15 (54)	13 (46)	0 (0)

(%)

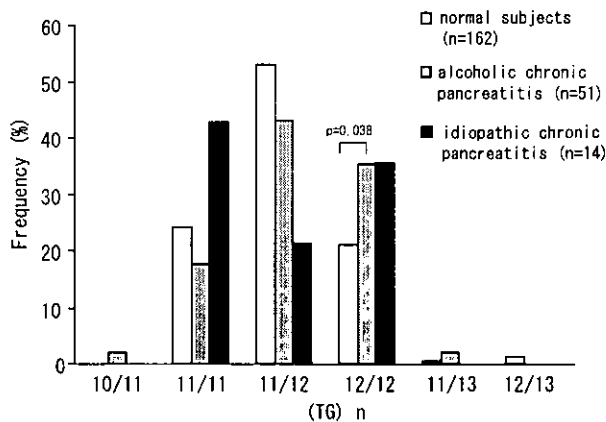


図1 TG repeats の genotype の頻度

4. M470V

アルコール性慢性膵炎群では M470 ホモ接合体の頻度が有意に(p<0.05)高かった(表3)．一方，特発性慢性膵炎群では V470 ホモ接合体の頻度が高い傾向にあった．

表3 M470V の genotype の頻度

	n	M/M	M/V	V/V
normal subjects	162	24 (15)	82 (51)	56 (35)
chronic pancreatitis	65	17 (26)	25 (38)	23 (35)
alcoholic	51	14 (27)*	21 (41)	16 (31)
idiopathic	14	3 (21)	4 (29)	7 (50)

* p<0.05

(%)

白人では(GATT)6/(TG)10/M470, (GATT)6/(TG)11/M470 および(GATT)7/(TG)11/V470 が主なハプロタイプであったが，日本人では(GATT)6/(TG)12/M470 と(GATT)7/(TG)11/V470が多かった(図2)．

(5) 多型に基づく CFTR 遺伝型の分類

CFTR の Cl⁻チャンネル機能に関連する M470V の遺伝型を X 軸に，CFTR 蛋白量に関連する TG repeat の遺伝型を Y 軸に，各遺伝型の頻度を Z 軸に，示したものが図3である．アルコール性慢性膵炎では，蛋白量が低下するがチャンネル機能が保たれる(TG)12/M470 ホモ接合体の頻度が高い傾向にあった．一方，特発性慢性膵炎群では，蛋白量は正常であるが Cl⁻チャンネル機能が低下する(TG)11/V470 ホモ接合体が最も高い頻度を示した．

(6) Q1352H と R1453W

Q1352H は健常人(3.7%)に比べ慢性膵炎(12.3%)で有意に頻度が高かった．特発性慢性膵炎群では R1453W の頻度が高い傾向(1人はホモ接合体)にあった．Q1352H と R1453W は，(TG)11/V470 アレル上にあり，慢性膵炎では(TG)11/V470 ホモ接合体とこれらの多型を合わせ持つ症例が高頻度に見られた．

D. 考察

本研究では，健常人，慢性膵炎患者ともに CF の原因となる CFTR 遺伝子変異は認められなかった．白人では，特発性慢性膵炎における 5T の頻度が高い(10%)と報告されている．しかし，日本人では，健常人，慢性膵炎ともに 5T の頻度は低かった．

一方，日本人では(TG)の反復数の多い(TG)12が高頻度に認められることが大きな特徴であった．(TG)repeat が長くなるほど exon 9 が欠損しやすく，(TG)12 では約 30%が Cl⁻チャンネル機能をもたない蛋白となる⁴⁾．慢性膵炎では健常人に比べて(TG)12/12 の頻度が高く，正常な CFTR 蛋白量の減少が本症に関連すると推定される．V470 は M470

に比し Cl⁻チャンネル機能が約 40%低下すると報告されている。また, Q1352H と R1453W も Cl⁻チャンネル機能を低下させる多型であることが判っている。両多型はともに V470 とリンクしていた。従って, (TG)11/V470 ホモ接合体に Q1352H あるいは R1453W が合併すると, CFTR 機能が更に低下すると推定される。

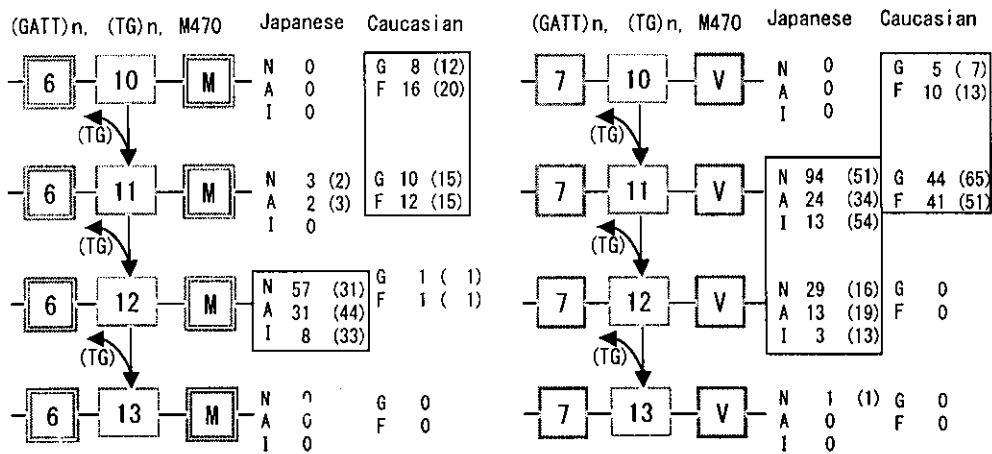
E. 結語

日本人においては, アルコール性慢性膵炎は CFTR の蛋白量が減少する (TG)12 ホモ接合体と関連していることが多い。一方, 特発性慢性膵炎は

CFTR 機能が低下する (TG)11/V470 ホモ接合体に Q1352H, R1453W などが合併する遺伝子型と関連している。

F. 参考文献

1. Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Fujiki K, Hayakawa T. Cystic fibrosis and related diseases of the pancreas. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2002; 16: 511-26.
2. Hanawa M, Takebe T, Takahashi S, Koizumi M, Endo K. The significance of the sweat test in chronic pancreatitis. Tohoku J Exp



N: normal subjects, A: alcoholic chronic pancreatitis, I: idiopathic chronic pancreatitis
G: Greek, Tzetzis M et al., 2001., F: French, Pallares-Ruiz Net et al., 1999.

図2 (GATT)n-(TG)n-M470V のハプロタイプの分布

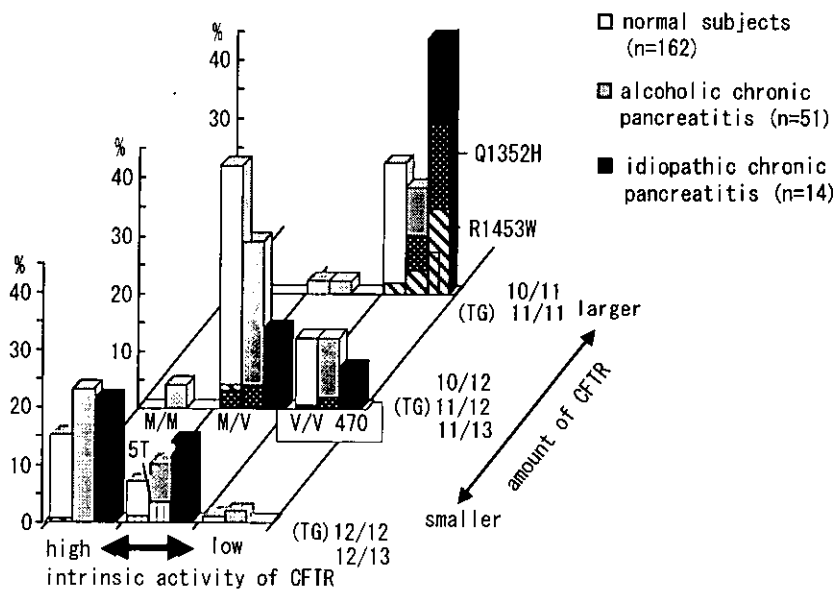


図3 (TG)n および M470V の遺伝型の分布

Med 1978; 125: 59-69.

3. Naruse S, Ishiguro H, Suzuki Y, Fujiki K, SBH Ko, Mizuno N, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Jin C, Suzuki R, Kitagawa M, Tsuda T, Kondo T, Hayakawa T. A finger sweat chloride test for the detection of the high-risk group of chronic pancreatitis. Pancreas 2004; in press.
4. Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. Nat Genet 1993; 3: 151-6.

G. 健康危険情報

該当なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiki K, Ishiguro H, Ko SBH, Mizuno N, Suzuki Y, Takemura T, Yamamoto A, Yoshikawa T, Kitagawa M, Hayakawa T, Sakai Y, Takayama T, Saito M, Kondo T, Naruse S. Genetic evidence for CFTR dysfunction in Japanese: background for chronic pancreatitis. J Med Genet 2004;in press.

2. 学会発表

- 1) 藤木理代, 石黒 洋, 洪 繁, 水野伸匡, 山本明子, 馬淵龍彦, 二口祥子, 横畑幸司, 竹村俊洋, 水野聡己, 山本剛, 北川元二, 早川哲夫, 高山哲夫, 酒井雄三, 近藤孝晴, 成瀬達. 日本人の慢性膵炎患者における CFTR 遺伝子多型の解析. 第 48 回日本人類遺伝学会 長崎 2003 年 10 月 22-24 日

I. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む.)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

膵嚢胞線維症における SLC26 蛋白の役割

研究報告者 成瀬 達 名古屋大学大学院病態修復内科学 助教授
共同研究者 洪 繁, 石黒 洋, 水野伸匡, 山本明子, 藤木理代,
馬淵龍彦, 横畑幸司, 竹村俊洋, 二口祥子, 水野聡己,
山本 剛, 北川元二¹⁾, 早川哲夫²⁾
¹⁾ 名古屋大学大学院病態修復内科学
²⁾ 国家共済名城病院

【研究要旨】

膵嚢胞線維症の原因遺伝子である CFTR クロライドチャンネルが、重炭酸イオンの輸送体である SLC26 輸送体に及ぼす影響を検討した。ヒト由来の HEK293 細胞に CFTR と DRA (SLC26A3) 遺伝子を導入し、細胞膜に発現した DRA の陰イオン交換輸送活性を、顕微蛍光法にて細胞内 pH を測定することにより評価した。軽症型の嚢胞線維症を起こす CFTR 遺伝子変異 (R117H) と重症型を起こす遺伝子変異 (G551D) をそれぞれ野生型のヒト CFTR 遺伝子に導入した。細胞に変異 CFTR と DRA を共発現させ、CFTR の遺伝子変異が DRA に及ぼす影響を検討した。CFTR と DRA を共発現させた細胞の陰イオン交換輸送活性は、Forskolin による CFTR の活性化により、DRA 単独の陰イオン交換輸送活性の約 6 倍に増加した。CFTR 変異遺伝子 (R117H) は、DRA の陰イオン交換輸送活性を約 2.5 倍に増加させたが、変異遺伝子 (G551D) には DRA の活性化作用がなかった。CFTR による SLC26 輸送体 (DRA) の活性化は、上皮膜での重炭酸イオン輸送に重要な役割を果たしている。膵嚢胞線維症の患者ではこの調節機構が障害されていると推察された。

A. 研究目的

嚢胞線維症は cAMP 依存性のクロライドチャンネルである cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) の遺伝子変異により起こる常染色体劣性遺伝性疾患である¹⁾。CFTR は人の膵導管細胞の管腔膜側に発現し、膵の水と重炭酸イオン分泌に重要な働きをしていると考えられている。セクレチンにより、細胞内 cAMP 濃度が上昇すると CFTR が活性化されクロライドイオン (Cl⁻) が管腔膜側に分泌される。重炭酸イオンは管腔膜上に存在する陰イオン交換輸送体により Cl⁻ と交換に管腔内に分泌されることが知られている²⁾。

嚢胞線維症の患者の上皮膜では Cl⁻ 分泌障害とともに重炭酸イオン輸送障害が存在することが知られている。この重炭酸イオン輸送障害は、嚢胞線維症患者の病態と深くかかわっていると推察されている³⁾ が、重炭酸イオン分泌障害における CFTR Cl⁻ チャンネルの果たす役割は不明であった。

これまでも培養細胞に CFTR 蛋白を発現させると、CFTR の活性化にともない細胞膜での陰イオン交換輸送活性が亢進することが知られていた⁴⁾。しかし、CFTR により活性化される分子が何かは不明であった。そこで我々は、CFTR Cl⁻ チャンネ

ルにより活性化される陰イオン交換輸送体を明らかにするために、Solute carrier (SLC) 輸送体の中で、陰イオン交換輸送体ファミリー (SLC26 輸送体)⁵⁾ に属する Down-regulated in adenoma (DRA: SLC26A3) に着目し、この蛋白の陰イオン交換輸送活性が CFTR の活性化により影響されるかどうか検討した。また膵嚢胞線維症の重症度の異なる遺伝子変異を野生型ヒト CFTR 遺伝子に導入し、DRA の陰イオン交換輸送活性に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

ヒト由来の HEK293 細胞に CFTR と DRA 遺伝子を導入し、細胞膜に発現した DRA の陰イオン交換輸送活性を、pH 感受性色素 (BCECF AM; 2', 7'-bis - (2-carboxyethyl) - 5 - (and-6) - carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester) を用いた顕微蛍光法にて、細胞内 pH を測定し評価した。軽症の嚢胞線維症を起こす CFTR 遺伝子変異 (R117H) と重症嚢胞線維症を起こす遺伝子変異 (G551D) を quick change mutagenesis 法 (Stratagene, La Jolla, CA) にて、それぞれ野生型ヒト CFTR 遺伝子に変異を導入した。これら二種類の変異 CFTR 遺伝子をそれぞれ DRA と共発

現させ、DRA の陰イオン交換輸送活性を測定した。
 (倫理面への配慮) 本実験は培養細胞を用いており該当しない。

C. 研究結果

DRA と CFTR を共発現する細胞では、Forskolin による CFTR の活性化により、DRA の陰イオン交換輸送活性が亢進した (図 1 A, B)。CFTR による DRA 活性の増強作用は DRA 単独の約 6 倍であった (図 1 C)。

軽症の嚢胞線維症を起こす変異 CFTR 遺伝子

(R117H) は、野生型に比べ、DRA の活性化作用が減弱しており (図 2 B)、重症嚢胞線維症をおこす変異 CFTR 遺伝子 (G551D) は DRA の活性化作用が完全に消失していた (図 2 C)。

D. 考察

CFTR クロライドチャンネルは、さまざまな外分泌腺の上皮膜管腔膜側に発現し、 Cl^- だけでなく、水と重碳酸イオンの分泌に重要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細な分子機構は不明であった。

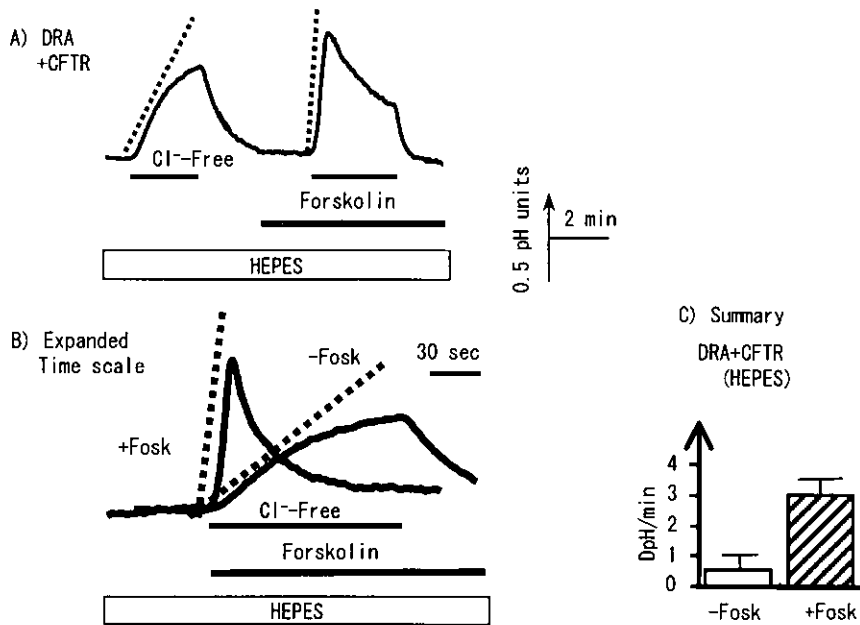


図 1 CFTRによるDRAの陰イオン交換輸送活性の亢進作用

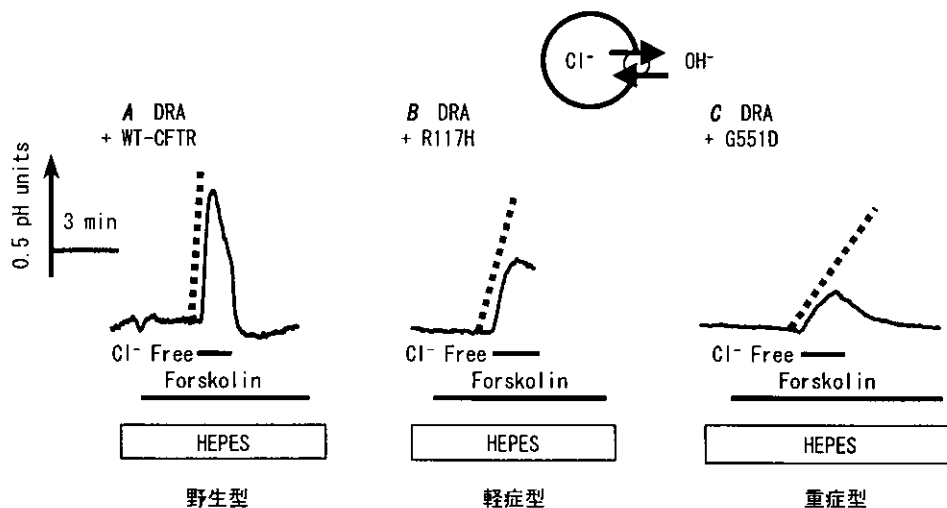


図 2 変異CFTR遺伝子がDRAの陰イオン交換輸送活性に及ぼす影響