

200936153A

厚生労働省科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと
治療指針の作成に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中村 公俊

平成 22 年 (2010) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告書

高チロシン血症を示す新生児期における最終診断への診断プロトコールと 治療指針の作成に関する研究 -----	1
中村 公俊	

II. 分担研究報告

1. 肝細胞酵素欠損症に対する肝細胞移植の現状 -----	7
奥山 虎之	
2. 高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと 治療指針の作成に関する研究（代謝性肝疾患に対する肝臓移植について） -----	9
笠原 群生	
3. 高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと 治療指針の作成に関する研究（NTBC療法について） -----	12
伊藤 道徳	
4. 高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと 治療指針の作成に関する研究（酵素活性の測定について） -----	14
但馬 剛	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	17
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	19
-----------------------	----

V. 研究構成員 -----	49
----------------	----

VI. 遺伝性高チロシン血症の診断治療指針 -----	51
-----------------------------	----

I. 総括研究報告

高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと 治療指針の作成に関する研究

研究代表者 中村公俊 熊本大学医学部附属病院 講師

研究要旨

本研究では、わが国における高チロシン血症の発生状況について調査した。高チロシン血症は遺伝的にも生化学的にも多様な疾患群であり、その患者数は増加しつつある。われわれが行った全国調査（回答率 71%）では、遺伝性高チロシン血症 I 型 5 例、II 型 2 例、III 型 1 例の回答があった。そのほかに原因不明の高チロシン血症が 10 例回答されており、確定診断に至らない症例も少なくないと考えられた。高チロシン血症の確定診断は血中チロシン値のみでは困難であり、先進医療に基づく複数の検査が必要である。また、高チロシン血症の治療として、主に食事療法が行われているが、最先端の治療は、新規薬物治療や肝臓移植の導入に伴い大きく変化した。しかしわが国の多くの患者はその恩恵を十分に受けていない。また、肝臓移植は先天代謝異常症の小児期患者に対する治療法として確立し、高チロシン血症 I 型患者の予後を大きく改善していると考えられた。

A. 研究目的

高チロシン血症はタンデムマスを利用した新規新生児スクリーニングの対象疾患に含まれており、新生児期に患者が発見されることもある。しかし新生児期に血中チロシン高値を示す児は多く、その中から希少難病である遺伝性高チロシン血症を発見することは困難なことも少なくない。高チロシン血症は遺伝的にも生化学的にも多様な疾患群であり、患者数はタンデムマスマスクリーニングの進展とともに増加している。チロシン高値は新生児の 0.85%、欧米でも 0.5-1.8% に認められる頻度の高い異常である。一方で、重度の肝硬変、精神発達遅滞などが生じる遺伝性高チロシン血症は希少難病であり、多くのチロシン高値を示す新生児から、この希少難病を発見するための診断指針は確立していない。その確定診断は血中チロシン値のみでは困難であり、先進医療に基づく複数の検査が必要となってきた。高チロシン血症の最先端の治療は、新規薬物治療や肝臓移植の導入などにより予後の改善が期待できるようになった。しかし、わが国の多くの患者では、先進医療を取り入れた診断治療指針が十分に提供されていない。そこで、わが国における高チロシン血症の患者の診断・治療の状況について調査し、高チロシン血症の診断基準、治療指針を作成するこ

とを目的とした。

B. 研究方法

われわれはタンデム質量分析計を用いた新生児ろ紙血中のチロシンを測定し、高チロシン血症を示す新生児数を検討した。測定にはタンデム質量分析計（MICROMASS Quattro micro API）、HPLC（Waters 2795 Alliance）を用いた。試料として新生児スクリーニング用ろ紙血液を重松らの方法に準じて前処理を行わない、血中チロシン値 8mg/dl 以上をチロシン高値とした。次に、全国の 930 施設を対象とした全国調査（回答率 71%）を行った。その調査では、遺伝性高チロシン血症 I 型 5 例、II 型 2 例、III 型 1 例の回答があった。そのほかに原因不明の高チロシン血症が 10 例回答されており、確定診断に至らない症例も少なくないと考えられた。確定診断のための検査法のひとつとして、高チロシン血症 I 型におけるゲノム DNA からのエクソン直接塩基配列解析法による遺伝子診断系を設定した。鑑別疾患となる高チロシン血症 II 型・III 型については、酵素反応産物を HPLC によって分離・定量する酵素診断系を設定した。

遺伝性高チロシン血症を含む先天性代謝異常症に対する生体肝移植症例の国内調査においては、1990 年から 2008 年末までに、日本肝移植研究会に登録さ

れた小児代謝性肝疾患に対する生体肝移植症例の実態調査を、日本肝移植研究会データベースに基づき実施した。また、全国調査において報告された症例として、現在 NTBC (ORFADIN) および低チロシン・低フェニルアラニン食餌療法で治療中の高チロシン血症 I 型の患児の治療経過と今後の問題点について検討した。遺伝性高チロシン血症 I 型においては、尿中有機酸分析におけるサクシニルアセトン、遅発型の高チロシン血症 I 型においてはチロシン値と尿中サクシニルアセトン、軽微な異常値を示す例では酵素活性測定を検討した。遺伝性高チロシン血症 II 型、III 型においては、チロシン、サクシニルアセトンと、肝生検による酵素活性の測定を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は熊本大学倫理委員会の承認と保護者への説明と同意に基づいて行った。

C. 研究結果

タンデムマスを用いた高チロシン血症を示す新生児数を検討したところ、新生児 72,695 人中に 8.0mg/dl 以上のチロシン高値を認めた新生児は 95 人 (0.13%) 存在した。これらの新生児はチロシン値のみでは遺伝性高チロシン血症との区別は困難であった。

次に、全国の 930 施設を対象とした全国調査（回答率 71%）を行った。その調査では、遺伝性高チロシン血症 I 型 5 例、II 型 2 例、III 型 1 例の回答があった。そのほかに原因不明の高チロシン血症が 10 例回答されており、確定診断に至らない症例も少なくないと考えられた。確定診断のための検査法のひとつとして、高チロシン血症 I 型におけるゲノム DNA からのエクソン直接塩基配列解析法による遺伝子診断系を設定した。鑑別疾患となる高チロシン血症 II 型・III 型については、酵素反応産物を HPLC によって分離・定量する酵素診断系を設定した。

図 1

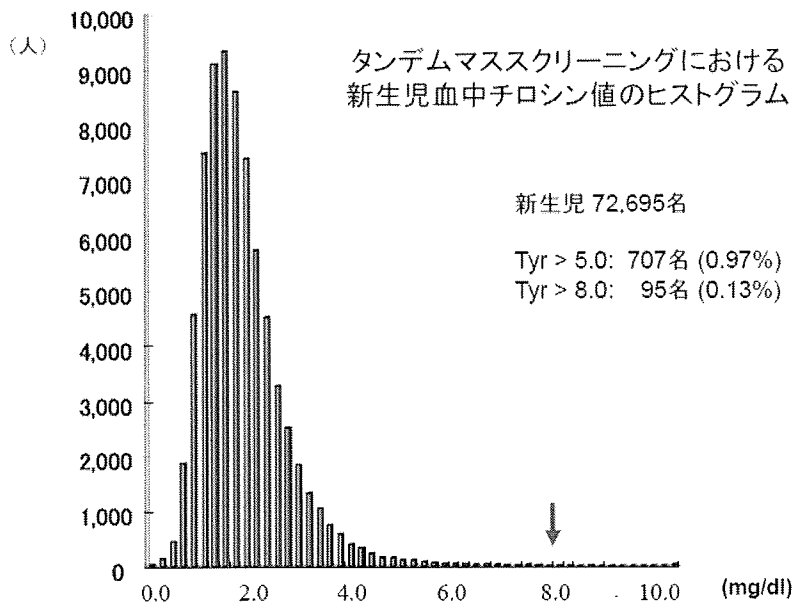


図2 遺伝性高チロシン血症の代謝障害部位

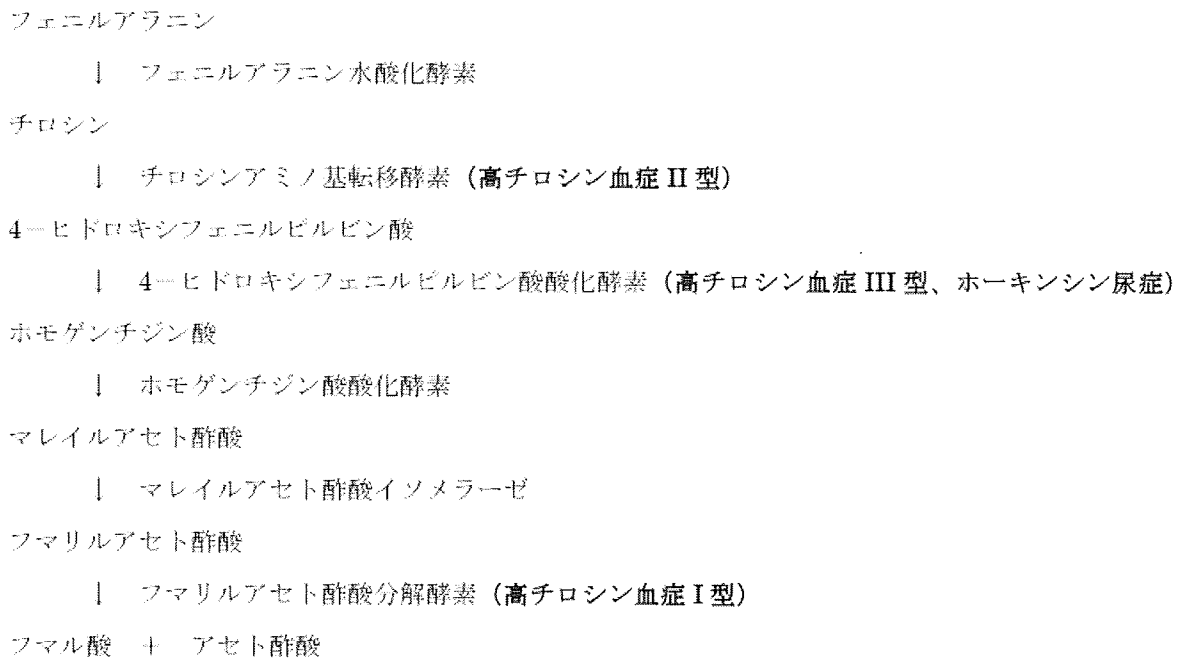


表1 高チロシン血症の分類

病型	遺伝性	血漿中のチロシン上昇	酵素欠損	主な症状
遺伝性高チロシン血症Ⅰ型	常劣	軽度	フマリルアセト酢酸分解酵素	肝細胞障害 尿細管障害 低血糖 ガラクトース代謝異常 神経症状 肝細胞癌
遺伝性高チロシン血症Ⅱ型	常劣	高度	チロシンアミノ基転移酵素	精神発達遅延 皮膚の異常角化 角膜びらん 潰瘍
遺伝性高チロシン血症Ⅲ型	常劣	中等度	4ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素	失調 けいれん 軽度の精神発達遅延
ホーキンシン尿症	常優	一過性	4ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素	一過性発育遅延 食欲不振
肝障害に伴う高チロシン血症	原疾患による	さまざま		原疾患による
新生児一過性高チロシン血症	なし	さまざま		無症状または不活発

遺伝性高チロシン血症を含む先天性代謝異常症に対する生体肝移植症例の国内調査においては、1990年から2008年末までに、日本肝移植研究会に登録された小児代謝性肝疾患に対する生体肝移植症例の実態調査を、日本肝移植研究会データベースに基づき実施し、代謝性疾患25例の移植適応・周術期管理を検討した。また、全国調査において報告された症例として、現在NTBC(ORFADIN)および低チロシン・低フェニルアラニン食餌療法で治療中の高チロシン血症I型の患児の治療経過と今後の問題点について検討した。これらの検討から、診断指針の確立のためには、遺伝性高チロシン血症I型においては、尿中有機酸分析におけるサクシニルアセトン増加の検出、遅発型の高チロシン血症I型においては、紙血チロシン値と尿中サクシニルアセトンの増加の検出、軽微な異常値を示す例では酵素活性測定が必要である。遺伝性高チロシン血症II型、III型においては、チロシン高値が著明であり、サクシニルアセトンの増加を伴わないことを確認し、肝生検による酵素活性の測定を行うことが必要である。このほか、新生児一過性高チロシン血症の鑑別などが重要であることなどを診断の指針とした。

D. 考察

タンデムマス検査と全国の実態調査によって、わが国における高チロシン血症の診断治療の実態を把握することができた。特にタンデムマスによる高チロシン血症を示す新生児数、遺伝性高チロシン血症と一過性高チロシン血症とのチロシン値の比較についての検討は高チロシン血症の診断指針を考えるうえで重要であった。また、全国の930施設を対象とした全国調査は、わが国では初めて行われた高チロシン血症についての実態調査であった。多くのチロシン高値を示す新生児から、この希少難病を発見するための診断指針として、先進医療に基づく複数の検査を試みた。高チロシン血症の最先端の治療は、新規薬物治療や肝臓移植の導入などにより予後の改善が期待できるようになった。そして今回の調査結果に基づいて、効率的な診断、治療の方法について多施設による前方視的検証モデルを作成することが次の課題の一つと考えら

れた。高チロシン血症I型の治療においては、ニチシノン(ORFADIN)を用いた治療を行っている症例の実態と治療の問題点を明らかにすることができた。特に、ニチシノンはわが国では未承認薬であるため、医師の個人輸入によって無償で提供されている。もし有償となれば1日当たり約10万円程度の治療費が必要となり、本治療を中止せざるを得ない。すなわち今後早急にわが国での承認が望まれる治療薬の一つであることが明らかになった。

欧米においては高チロシン血症の治療は食事治療の内容、新規薬物治療の導入などにおいて近年急速に変化している。そのため、わが国の状況を正確に把握し、必要な診断治療の課題を明らかにした本研究の意義は大きい。高チロシン血症の治療として主に食事療法が行われてきているが、肝臓移植の導入に伴い、重症例の生命予後は改善している。これらの課題を解決することによって、高チロシン血症の診断、治療指針には、先進医療を取り入れた検査、治療薬が不可欠であることが明らかになった。診断においては、普及型C18カラムを用いた逆相クロマトグラフィ法という汎用性の高い方法を採用することで、タンデムマス新生児スクリーニング対象である有機酸・脂肪酸代謝異常症の酵素診断に応用している分析システムがそのまま高チロシン血症の診断に有用である。多種類の稀少疾患の酵素診断系を長期間継続して実施するためにはこのような省力化した方法を確認することが大切であると考えられた。

E. 結論

遺伝性高チロシン血症と鑑別が困難である新生児一過性高チロシン血症はチロシン分解系の成熟に関連して、新生児期に一過性に高チロシン血症を示すと考えられている。チロシン濃度が極端に高い場合は精神発達に影響を与えることが懸念されている。また、重篤な進行性肝障害が合併した場合には、遺伝性高チロシン血症との鑑別は臨床的には困難である。遺伝性高チロシン血症では先進医療に基づく治療を必要とするため、確定診断が重要であり、包括的な診断指針の確立が急務である。また、LC/MS(液体クロマトグラフィ・マススペクトロメトリー)法を用いて高チ

ロシン血症を呈する疾患の病態解明が必要である。極少量の血液検体を利用したチロシンの測定方法を用いてベッドサイド、外来診療あるいは自宅、外出先などで簡単にチロシンを測定する持ち運び可能な簡易測定装置を用いた食事療法のコントロールを試みることにより、患者の QOL が改善する可能性がある。さらに上記の高チロシン血症の患者の臨床状況の収集と解析によって構築した前方視的研究モデルにおいて、高チロシン血症の病態を明らかにしたい。

また、欧米においては高チロシン血症の診断、治療が近年急速に変化しており、食事治療の内容、新規薬物治療の導入などが国で取り入れるべき課題は多い。そのため、高チロシン血症の治療として主に行われる食事療法の標準化や、肝臓移植の適応基準の確立によって、重症例の生命予後がどの程度改善するのかを検証する必要がある。これらの課題を解決することによって、高チロシン血症の診断、治療指針として、先進医療を取り入れた検査、治療薬を利用することができる。さらに、新規のアミノ酸測定法や、酵素活性の測定法を臨床応用することによって、新規測定技術の基礎を確立できる。多種類の稀少疾患の診断技術を応用した高チロシン血症の診断法を確立することで、高チロシン血症のみならず他の先天代謝異常症の診断も継続して進む可能性があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Kumamoto S, Katafuchi T, Nakamura K, Endo F, Oda E, Okuyama T, Kroos MA, Reuser AJ, Okumiya T High frequency of acid alpha-glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese Population. Mol. Genet. Metab. 97, 190-5. (2009)

Nakamura Y, Matsumoto S, Mochida T, Nakamura K,

Takehana K, Endo F. Glycine regulates proliferation and differentiation of salivary-gland-derived progenitor cells. Cell Tissue Res. 336, 203-12 (2009)

Fujii H, Kono K, Goto S, Onishi T, Kawai H, Hirata KI, Hattori K, Nakamura K, Endo F, Fukagawa M. Prevalence and Cardiovascular Features of Japanese Hemodialysis Patients with Fabry Disease. Am J Nephrol. 16, 527-535. (2009)

遺伝性高チロシン血症 中村公俊、遠藤文夫 小児疾患診療のための病態生理 2 小児内科 41 増刊号 (2009)

テトラヒドロビオプテリン(BH4)反応性高フェニルアラニン血症に対する天然型 BH4 製剤塩酸サプロテリンの適正使用に関する暫定指針 日本先天代謝異常学会：BH4 反応性高フェニルアラニン血症の診断と治療に関する専門委員会 大浦敏博、新宅治夫、高柳正樹、呉繁夫、大和田操、松原洋一、芳野信、岡野善行、伊藤哲也、奥山虎之、中村公俊、松尾雅文、遠藤文夫 日本小児科学会雑誌 133, 649-653 (2009)

血中アミノ酸分析によって診断できる先天性アミノ酸代謝異常症 「広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査」 III 生化学的検査 中村公俊、遠藤文夫 日本臨床 67, 625-629

2. 学会発表

Newborn screening with tandem mass spectrometry in South-Western Japan Nakamura K, Hattori K, Matsumoto S, Tasaki R, Mitsubuchi H, Endo F The 11th International Congress on Inborn Errors of Metabolism, Aug 29 - Sep 02, 2009, San Diego, California, USA

Screening for Fabry Disease in Japan Nakamura K, Hattori K, Matsumoto S, Nagano K, Mitsubuchi H and Endo F The 11th International Congress on Inborn

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

Errors of Metabolism, Aug 29 - Sep 02, 2009, San Diego, California, USA

九州・四国地区におけるタンデムマススクリーニングの現状 中村公俊, 服部希世子, 田崎隆二, 松本志郎, 三潤浩, 遠藤文夫 第 51 回日本先天代謝異常学会 2009 年 11 月 5-7 日 東京

ろ紙血を用いたファブリー病のスクリーニング 中村公俊, 服部希世子, 松本志郎, 田崎隆二, 藤田春雄, 三潤浩, 遠藤文夫 第 51 回日本先天代謝異常学会 2009 年 11 月 5-7 日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

II. 分担研究報告

肝細胞酵素欠損症に対する肝細胞移植の現状

研究分担者 奥山虎之 国立成育医療センター 臨床検査部長

研究要旨

肝細胞の酵素欠損に起因した先天代謝異常症において、肝臓移植が行われている。しかし、肝臓移植は、新生児早期に実施することは困難であり、肝臓移植までの「つなぎ治療」としての肝細胞移植療法が注目されている。欧州で実施されている肝細胞移植の臨床試験の現状について調査した。

共同研究者

遠藤文夫（熊本大学小児科）

A. 研究目的

肝細胞の酵素欠損に起因した先天代謝異常症において、肝臓移植が適応される症例がある。特に、日本では生体肝移植が普及し、その成績も良好である。しかし、新生児期に肝臓移植を行っても、その成績は良くない。重症型尿素サイクル異常症やチロシン血症 I 型などでは、新生児期の治療が予後に大きな影響がある。肝臓移植が可能となるまでの「つなぎ治療」として、肝細胞移植の臨床試験がドイツのハイデルベルク大学で行われている。本研究では、肝細胞移植の臨床試験の詳細を調査し、本邦での実施の可能性を検証することを目的とする。

B. 研究方法

ハイデルベルグ大学で実施されている肝細胞移植臨床試験の状況を調査する。具体的には、プロトコールの詳細調査、これまでに実施された症例の結果を検討する。これらの結果をもとに、わが国での肝細胞移植の実施の可能性について考察する。

（倫理面への配慮）

本研究では、特に倫理面での問題はない。

C. 研究結果

（1）臨床試験プロトコールの概要：

治験責任医師は、ハイデルベルグ大学 Georg Friedrich Hoffmann 教授。治験依頼者は、

Cytonet GmbH & Co. KG。移植に用いる細胞（薬剤）は、注入用ヒト異種肝細胞（凍結保存、ABO 型適合ヒト成人肝細胞で解凍後 50%以上の生細胞を認めるもの）である。適応疾患は、尿素サイクル異常症のカルバモイルリン酸合成酵素 I 欠損症（CPSD）オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症（OTCD）アルギニノコハク酸合成酵素欠損症（シトルリン血症）で、新生児および生後 3 ヶ月までの乳児で門脈へのアクセスが可能であること、血清アンモニア濃度が 250 $\mu\text{mol/L}$ 以下でかつ文書による同意取得された症例で実施する。目的は、尿素サイクル異常症（UCD）の新生児および乳児に対し、肝細胞懸濁液を反復投与することの安全性および有効性を検討することである。主要評価項目は、肝細胞投与の安全性である。投与時の酸素飽和度、門脈圧および流量の測定により評価する。および門脈への投与カテーテル留置の安全性を評価する。本試験は、ドイツ国内の約 10 の施設で実施。15 例の患者を組入れた時点で、得られた試験データが評価可能かどうかにかかわらず、一旦打ち切りとする。また、10 例が投与を受け、主要評価項目の完全な評価が可能で、すべてのデータクエリーが完了したのちにデータベースを固定した時点でも一旦打ち切りとする。

（2）肝細胞移植の実例

（症例 1）CPSI 欠損症。高アンモニア血症（1800 $\mu\text{mol/L}$ ）による Coma が生後 3 日目に認められた。内科的治療を行ったが、はじめの 10

週間は不安定で、生後2か月時に肝細胞移植を施行した。移植後は、高アンモニア血症はほとんど認めなくなった。1歳5か月のときに、肝臓移植を行った。摘出肝臓のCPS1酵素活性は、正常者の4%程度であった。

（症例2）オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症 生後3日目に1150 μ mol/lの高アンモニア血症によるこん睡状態となる。生後9日目に肝細胞移植をおこない、その後高アンモニア血症を認めなくなった。11か月のときに、肝臓移植を行った。摘出肝臓のOTC活性は、正常肝臓の5-10%であった。

D. 考察

ハイデルベルグ大学における肝細胞移植の臨床試験は、着実に症例数を増している。移植ヒト肝細胞を調製している治験依頼者のCytonet GmbH & Co. KGは、米国での治験も開始する予定である。日本でも、条件さえ整えば、治験をすることは可能であろう。現在、治験対象疾患は尿素サイクル異常症に限定しているが、移植細胞のGrowth Advantageが期待できる高チロシン血症I型においてはより有効である可能性が高い

E. 結論

肝細胞酵素欠損に起因する先天代謝異常症の肝臓移植のつなぎ治療として、肝細胞移植が有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

「高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと
治療指針の作成に関する研究」

分担研究者 笠原群生 国立成育医療センター 医長

研究要旨

代謝性肝疾患に対する肝臓移植について

共同研究者

阪本 靖介(所属)国立成育医療センター

福田 晃也(所属)国立成育医療センター

A. 研究目的

代謝性疾患に対する肝移植は、その症例数の少なから、移植適応・周術期管理において未だ基準を作成するに至っていない。当院で実施した代謝性肝症例を考察し、移植適応・管理方法を明らかにする。

B. 研究方法

2005年11月から2009年11月の4年で生体肝移植112例を実施した。代謝性疾患は25例で有機酸代謝異常11例(Methylmalonic academia(MMA)10例、Propionic academia(PA)1例)、尿素サイクル異常症8例(Ornithin transcarbamylase deficiency(OTCD)4例、Carbamyl phosphate synthetase 1 deficiency (CPS1D)4例)、糖原病(GSD)1b 4例、Wilson病2例に肝移植を適応した。移植適応・周術期管理を検討した。

(倫理面への配慮)

生体肝移植と同様に、ドナー・レシピエントの人権擁護には細心の注意を払う。

C. 研究結果

頻回のMetabolic decompensation,著しいQOLの低下、易感染性、および非代償性肝硬変を肝移植適応とした。移植時年齢は4か月から10歳8か月であった。

D. 考察

1. 内科管理

代謝疾患が疑われた場合に、基本的データ・病歴(ドナー既往歴・体格・血液型)を含めた、全国標準の患者

紹介シートを作成していただきたい。これを点数化し、どの治療を選択すべきか指針をいただきたい。

A. 尿素サイクル異常症:内科的治療で高アンモニア血症の発作がコントロールできない症例には、早期に移植を考慮すべきと考えている。不安定な代謝コントロールにより移植時期を延ばすことが、発作に伴う患者の発達遅延につながる可能性があるからである。手術成績が安定した現在、肝移植により完治可能であり良好なQOLが得られる。当院で肝移植を行った尿素サイクル異常症の年齢は 9.7 ± 9.6 カ月(4か月~2歳9か月)、体重 8.3 ± 2.1 kg(6.1~13.0kg)と非常に小さい症例が多かった。比較的早期の肝移植適応にも関わらず、当院でのOTCD男児3例、CPS1D3例においては、頻回の高アンモニア血症発作によると思われる発達遅延を認めた。肝移植後は食事制限なく、健常児と同様の食生活を送りながら通学可能であることは、家族のQOLを著しく向上する。内科的治療でどこまで経過観察すべきなのか、どうなったら肝移植を考慮すべきなのか、指針が求められる。内科治療においても、発作時の薬剤使用指針、体外循環適応基準が求められる。

B. 糖原病1b 4例に肝移植を適応した。当院で肝移植を行った症例の年齢は 3.6 ± 2.1 歳(1歳1か月~8歳4か月)であった。一般的に糖原病の肝移植適応は、血糖コントロール不良、成長・発達遅延、肝腫瘍と報告されている。自験例ではこの他に、好中球減少に伴う易感染性を認め、Granulocyte stimulating factor(G-CSF)使用にも関わらず、頻回の上気道感染等を認め長期入院管理を要した。

4例では肝移植後に血糖値ばかりでなく、好中球数も改

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

善を認め G-CSF 使用なく、易感染性も改善した。
glucose-6-phosphate -catalytic subunit3 関与の可能性
があり、解析中である。

C. 有機酸代謝異常に対する肝移植も、その自然予後の
悪さから積極的に肝移植の適応としている。移植後も原
疾患に対する内科治療を継続する必要がある、短期予後
は満足すべきものだが、長期予後に関しては未だ結論を
得ていない。PA では肝移植後に重篤な心機能障害を認
めておらず、良好な QOL で経過観察している(PA の心
筋障害は発作に伴うものである可能性が高いのではない
か)。MMA に対する肝移植は、術後アシドーシス発作の
頻度が減り、嘔吐がなくなり経口摂取ができるようになる
利点があるが、肝移植後に腎障害を 30%に、痙攣を 30%
に認めており、その適応は慎重を期すべきである。当院
では堀川先生と相談して免疫抑制治療も行っているが、
MMA児では術後 CMV に代表されるウイルス感染症が
多く、Host の易感染性はもちろんだが通常疾患よりも low
dose immunosuppression で管理できる可能性がある。今後、
成長発達・腎障害・神経障害の長期経過報告をすべきで
ある。また術後蛋白制限解除(脳死移植では多くが全く
解除されている)についても、指針が必要である。

D. Wilson 病等の自己肝臓に肝硬変を有する代謝性疾
患では、肝予備能を考慮し移植時期を決定している。す
べて内科治療で管理できるとの意見があるが、非代償性
肝硬変の場合は、内科管理を行いながら時期を逸せず
に移植施設に相談をいただきたい。

E. 結論

代謝性疾患に対する生体肝移植は、術後 QOL 改善を
認め、適応を厳格にすれば有効な治療であると考えられ
た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Sato S, Kasahara M, Fukuda A, Mizuguchi K, Nakagawa S, Muguruma T, Saito O, Karaki C, Nakagawa A, Yoshii K, Horikawa R. Liver transplantation in a patient with propionic acidemia requiring extra corporeal membrane oxygenation during severe metabolic decompensation. *Pediatr Transplant*. 13,790-793, 2009
2. Sasaki K, Kasahara M, Fukuda A, Shigeta T, Tanaka H, Nakagawa S, Nakagawa A, Nakayasiro M. Living donor liver transplantation with vena cava reconstruction using a cryopreserved allograft for a pediatric patient with Budd-Chiari syndrome. *Transplantation*. 2009 Jan 27;87(2):304-5
3. Yoshitoshi EY, Takada Y, Oike F, Sakamoto S, Ogawa K, Kanazawa H, Ogura Y, Okamoto S, Haga H, Ueda M, Egawa H, Kasahara M, Tanaka K, Uemoto S. Long-term outcomes for 32 cases of Wilson's disease after living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2009 Jan 27;87(2):261-7.
4. Yokoyama S, Kasahara M, Fukuda A, Sato S, Koda F, Nakagawa A. Epstein-Barr virus-associated erythema nodosum after living-donor liver transplantation: A case report. *Liver Transpl*. 2009 Apr;15(4):446-448
5. Shigeta T, Kasahara M, Kimura T, Fukuda A, Sasaki K, Arai K, Nakagawa A, Nakagawa S, Kobayashi K, Soneda S, Kitagawa H. Liver transplantation for an infant with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency using heterozygote living donor. *Pediatr Transplant* 2009;3:52-55
6. Sakamoto S, Kasahara M, Shigeta T, Fukuda A, Tanaka H, Matsuno N. Feasibility of using the graft's umbilical vein as a patch graft for hepatic vein reconstruction in pediatric living donor liver transplantation. *Transpl Int*. 2009 Sep 8.
7. Sasaki K, Kasahara M, Fukuda A, Shigeta T, Tanaka H, Nakagawa S, Mitsui K, Harada R, Nakagawa A. Living donor liver transplantation for hepatoblastoma

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatr
Transplant*. 2009 May 30

8. Kasahara M, Nakagawa A, Sakamoto S, Tanaka H, Shigeta T, Fukuda A, Nosaka S, Matsui A. Living donor liver transplantation for congenital absence of the portal vein with situs inversus. *Liver Transpl*. 2009 28;15(11):1641-1643
9. Kasahara M, Horikawa R, Sakamoto S, Shigeta T, Tanaka H, Fukuda A, Abe K, Yoshii K, Naiki Y, Kosaki R, Nakagawa A.. Living donor liver transplantation for glycogen storage disease type Ib. *Liver Transpl*. 2009 Dec;15(12):1867-71

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

「高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと治療指針の作成に関する研究」

分担研究者 伊藤 道德 独立行政法人国立病院機構香川小児病院副院長

研究要旨

本年度は、現在2-(2-ニトロ-4-トリフルオロメチル-ベンゾイル)-1,3-シクロヘキサネジオン(NTBC, ORFADIN)および低チロシン・低フェニルアラニン食餌療法で治療中のチロシン血症I型の13歳患児の治療有効性と今後の問題点について検討した。患児は9ヶ月時より上記治療を開始し、その後順調な経過をとっており本治療法は有効である。しかしながら、NTBCはわが国では未だ薬価収載されていないため、国外メーカからメーカの好意により無償で医師の個人輸入で入手している。メーカの情報によると現在の当該薬は、2,894円/kg体重/日であり、本患児は40kgのため、もし有償となれば115,760円/日となり本治療の継続は中止せざるを得ない。今後早急にわが国での承認が望まれる。

A. 研究目的

チロジン血症I型は、北川らによって初めて報告された常染色体劣性の遺伝形式をとるフマリルアセト酢酸ヒドロラーゼ (FAH) の欠損による疾患で、重篤な肝障害、腎尿細管障害を主要症状とし、多くの症例では乳児期早期に肝不全や出血などにより死亡することが多い。また、緩やかに進行する慢性型でも肝硬変から肝癌を高率に発症し死亡することが多い。本症においては肝臓移植が唯一の治療とされてきたが、1992年に Lindstedt らが 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸酸化酵素の阻害剤である 2-(2-ニトロ-4-トリフルオロメチル-ベンゾイル)-1,3-シクロヘキサネジオン (NTBC, ORFADIN) による治療の有効性を報告して以来、200例以上の症例で治療経過が検討され、その有効性が報告されている。しかしながら、現在わが国において NTBC は薬価収載されてはおらず医師の個人輸入として使用するしかない状況である。そこで今年度は、チロジン血症I型患児の薬物療法の治療プロトコールを確立するために、現在わが国において NTBC 療法を受けている患児の臨床経過からその有効性と問題点について検討したので報告する。

B. 研究方法

生後9ヵ月から13歳の現在までNTBC療法および低チロシン・低フェニルアラニン食事療法による治療を受けてきたチロジン血症I型患児の治療経過を解析し、その有

効性について検討した。また、その治療経過から明らかになった問題点についても検討した。

C. 研究結果

症例は13歳の男児で、6ヵ月時に肝脾腫、軽度の肝機能障害、 α -フェトプロテイン (AFP) 著明高値、血液凝固因子の低下を認め、尿代謝スクリーニングでDNPH反応陽性、ニトロソナフトール反応陽性、尿中チロジン排泄増多を認めたため、チロジン血症I型が疑われた。その後の精査で、血漿チロジン値が7.30mg/dlと高値であり、尿中有機酸分析では、チロジンの代謝産物である4-ヒドロキシフェニルピルビン酸、4-ヒドロキシフェニル乳酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸の著明な排泄増多に加えて、サクシニルアセトンの排泄増多を認め、チロジン血症I型と化学診断された。確定診断のための生検肝によるFAH活性の測定では、 $93\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ と疾患対照の肝硬変患者の活性($5.14\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$)に比較しても低値であり、チロジン血症I型と確定診断した。また、生検肝の病理診断では肝硬変であった。化学診断後、家族に本症の治療法として肝臓移植およびNTBC療法があることを説明したところ、家族の希望によりNTBC療法を行うことになった。NTBCは熊本大学遠藤文夫先生を通じて、Gotenberg大学のLindstedt教授より、またスウェーデンオーファン社が製造販売を開始してからは同社の好意により無償提供を受けることができ

た。NTBC が入手できるまでは、低チロシン・低フェニルアラニン食事療法を行ったが、その効果は不十分であった。NTBC が入手できた 9 か月時より、NTBC による薬物療法 (1 mg/kg/日) と低チロシン・低フェニルアラニン食事療法の併用療法を開始した。投与開始後徐々に検査結果は改善し、治療開始 1 年後は全ての検査結果が正常範囲となった。また、肝臓も治療開始 8 ヶ月後には表面が平滑となり、1 年後には季肋下約 2 cm となり、その後も徐々に改善し現在では肝腫大は認められなくなっている。また、定期的な腹部 MRI 検査では、これまで肝臓に腫瘍性病変は認めていない。

現在 NTBC は、スエーデンオーファン社の行為により無償提供されているが、これまでに有償化の話が数回あった。この時に提示された金額は 2,894 円/mg であり、家族に支払いできる金額ではなく、また研究費等での支払いも困難であった。このため、スエーデンオーファン社へその有効性と家族からの要望などを伝えたところ、本患児についてはわが国において薬価収載されるまでは無償で提供してくれることになったが、わが国において薬価収載見通しが無い現状では、いつまで無償提供が続くか不明な状態である。また、低チロシン・低フェニルアラニン食事療法に用いる低チロシン・低フェニルアラニンミルクは特殊ミルク事業により提供を受けているが、これも 20 歳までしか受けることができない。

D. 考察

チロシン血症 I 型に対する治療法としては、肝臓移植が唯一の治療法とされてきたが、薬物療法としての NTBC 療法が提唱されてから、その有効性が報告されている。わが国において NTBC による治療を受けてきた患児においても短期間のみならず長期間での有効性を確認することができた。チロシン血症 I 型の治療プロトコールにおいて NTBC 療法は取り入れられるべき治療法であり、肝臓移植となる症例においても、移植が実施できるまでの治療として有効な治療法と考えられる。しかしながら、現在まで NTBC はわが国において薬価収載されておらず、医師の個人輸入として入手するしかない状況である。また今後の患児においては、有償となるが、その場合 2,894 円/kg/日となるため 5kg の患児でも 14,470 円/日が必要であり、これだけの金額を払うことは不可能である。このた

め、早急に本剤の薬価収載が望まれる。スエーデンオーファン社もわが国における薬価収載のための努力を行ってきたが、わが国における本症の患者数が平成 19 年度の小児慢性疾患治療研究事業に登録されている患者数で 9 名しかいないため、販売担当会社が見つけられなかった。このため現時点では、スエーデンオーファン社による薬価収載への手続きは中断している状態であり、今後何らかの方法によりわが国での薬価収載への手続きが再開され、迅速に承認されることを検討する必要がある。

また、NTBC 療法は低チロシン・低フェニルアラニン食事療法との併用療法が必要であるが、低チロシン・低フェニルアラニン食事療法に必要な特殊ミルクは 20 歳までしか提供を受けることができず、20 歳をすぎると治療が不可能となる。このため 20 歳以降も特殊ミルクを入手できるようにしていくことも必要である。

E. 結論

チロシン血症 I 型の薬物療法として、NTBC 療法は非常に有用である。しかし、現在 NTBC はわが国において承認されていないため、早急な承認が望まれる。また、低チロシン・低フェニルアラニン食事療法に必要な特殊ミルクの 20 歳以降の提供も必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

「高チロシン血症を示す新生児における最終診断への診断プロトコールと
治療指針の作成に関する研究」

分担研究者 但馬 剛 広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学・助教

研究要旨

新生児に高チロシン血症をもたらす多様な原因のうち、遺伝性高チロシン血症が鑑別診断の主要対象疾患である。なかでも最重症である1型について、遺伝子解析条件を設定した。また、1型-3型の酵素活性測定の前準備として、酵素反応産物を HPLC で分離・定量する分析条件を設定した。今後、臨床症例への応用や、1型については酵素反応基質の作成に取り組む必要がある。

共同研究者

なし

A. 研究目的

高チロシン血症（ないし尿中チロシン代謝産物の増加）を示す新生児は少なからず経験され、臨床症状を伴わない一過性の所見である場合が多いと考えられるが、十分な原因検索はなされていない状況にある。タンデムマス法による新生児スクリーニング施行地域の拡大に伴い、対象疾患となっている遺伝性高チロシン血症1型を中心に確定診断体制が求められており、検査法の整備に取り組んだ。

B. 研究方法

遺伝性高チロシン血症1型について、フマリルアセト酢酸加水分解酵素 (FAH) 遺伝子解析条件を検討した。酵素活性測定については、高速液体クロマトグラフィによる反応産物定量法の確立を目標に、遺伝性高チロシン血症1-3型の酵素反応産物分離条件を検討した。

（倫理面への配慮）

今年度は患者検体への応用は行っていないが、その場合は広島大学倫理委員会の承認を得て実施する。

C. 研究結果

白血球から抽出したゲノム DNA について FAH 遺伝子の各エクソンを PCR 増幅し、直接塩基配列解析法を行うためのプライマー作成並びに分析諸条件を設定した。

遺伝性高チロシン血症2型・3型の酵素反応は隣接し

ており、C18 カラムと 100mM NaH₂PO₄ + 20.5% アセトニトリルを移動相とする逆相 HPLC にて分離され、260nm 紫外吸光で検出可能であった（図1）。1型については、C18 カラム、移動相 5mM NH₄H₂PO₄, 210nm 紫外吸光にてフマル酸の検出が可能であった。

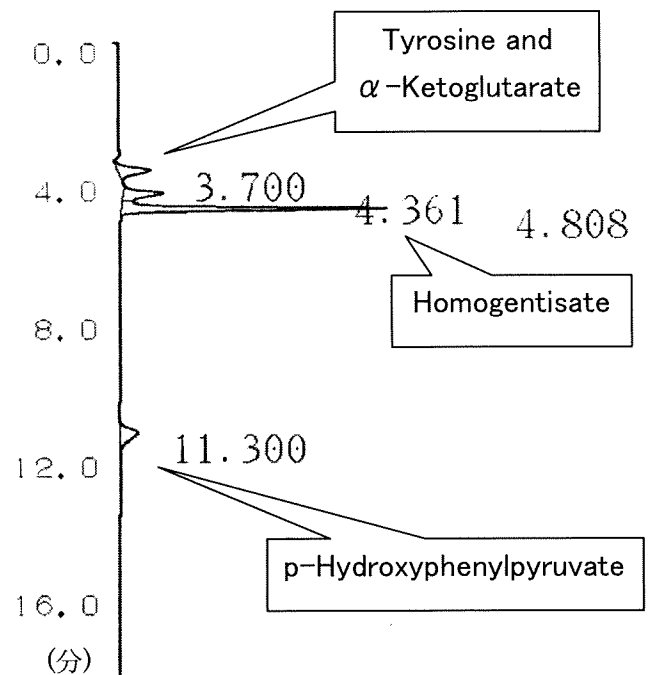


図1. 遺伝性高チロシン血症2型・3型の酵素反応基質および産物標品のクロマトグラム

D. 考察

チロシン代謝経路酵素のほとんどは肝・腎などでしか発現していない。FAH は白血球や線維芽細胞でも発現しているが、基質は市販されていない。従って、遺伝性高

チロシン血症の診断は、異常代謝産物の分析＋遺伝子解析で行うのが、方法論としては容易である。しかし、これらの方法は非典型例の診断や非罹患者の除外診断には弱いため、酵素活性も測定できることが望まれる。

すでに我々は C18 カラムを用いた逆相 HPLC という汎用性の高い方法による有機酸・脂肪酸代謝異常症の酵素診断を提供している。同じ分析システムをそのまま流用する方法を採ることで、多種類の稀少疾患の酵素診断系を長期間維持できるようにしたいと考えている。

E. 結論

遺伝性高チロシン血症 1 型の遺伝子診断系を設定した。2 型・3 型は酵素反応産物の定量法を設定し、生検肝組織があれば活性測定に応用可能である。1 型の酵素反応産物も定量可能であるが、活性測定には基質の作成法を今後検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表