

200936226A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

Alagille 症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の
診断ガイドライン作成、実態調査
並びに生体資料のバンク化に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 須磨崎 亮

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告		
Alagille症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の診断ガイドライン作成、 実態調査並びに生体資料のバンク化に関する研究	-----	1
須磨崎 亮		
II. 分担研究報告		
1. Alagille症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の診断ガイドライン作成、 実態調査並びに生体試料のバンク化に関する研究	-----	9
小崎 健次郎		
2. Alagille症候群の長期経過に関する検討に関する研究	-----	12
田澤 雄作		
3. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型および2型の病理組織学的検討に関する研究	-----	14
鹿毛 政義		
4. 遺伝性胆汁うっ滞疾患：PFIC3の電子顕微鏡所見による診断の可能性に関する研究	--	17
乾 あやの		
5. 遺伝性胆汁うっ滞性疾患(胆汁酸代謝異常症)の診断と治療に関する研究	-----	20
木村 昭彦		
III. アラジール症候群の診断基準（案）	-----	27
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
V. 研究成果の刊行物・別刷	-----	31

I . 総括研究報告書

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

Alagille 症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の診断ガイドライン作成、
実態調査並びに生体試料のバンク化

研究代表者 須磨崎亮 筑波大学大学院人間総合科学研究科教授

研究要旨

Alagille 症候群について、全国疫学調査、診断基準案の策定、遺伝子診断法の改良、長期予後の検討を行った。さらに、Alagille 症候群と類縁の遺伝性胆汁うっ滞性疾患である進行性家族性肝内胆汁うっ滞症や先天性胆汁酸代謝異常症について、主として鑑別診断の点から班研究を推進した。

Alagille 症候群の患者数は、我が国では 200 名程度以下と推定された。本症の診断方法としては、84%が主として臨床的な症候によってのみ診断されており、遺伝子診断の利用は少数例に留まっていた。一方、熱変性高速液体クロマトグラフィー法（DHLPC）ーシーケンシング法の導入によって、遺伝子診断がより簡便に実施できることが明らかになった。本邦の Alagille 症候群患者について実際の問題となっている症候を調査したところ、肝胆道系の症候が 75%で、心疾患や肺血管の異常が 52%で、中枢神経症状が 16%で治療の対象になっていた。欧米で大きな問題となっている脳血管異常は、今回の調査では 2 例（1.8%）のみであった。限られた症例数についての予後調査であり、今後も慎重な経過観察が必要であるが、Alagille 症候群の長期予後は必ずしも悪くない例も多いことが示唆された。

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の病型診断には、肝組織内の BSEP:Bile Salt Export Pump の発現を免疫組織学的に検討することが、極めて有用であることが判明した。進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 3 型についても、肝組織の電子顕微鏡学的検討や MDR3:Multidrug Resistance 3 の免疫病理学的検出が有用であることが示唆された。

先天性胆汁酸代謝異常症には多様な病型が含まれるが、尿中胆汁酸の分析により効率的にスクリーニングできることが明らかになった。

分担研究者

小崎健次郎	慶應義塾大学医学部 小児科学教室 准教授	乾あやの	済生会横浜市東部病院 こどもセンター 担当部長
木村昭彦	久留米大学医学部医学科 小児科学講座 講師	鹿毛政義	久留米大学医学部 病院病理部 教授
田澤雄作	国立病院機構仙台医療センター 小児科 総合成育部長		

A. 研究目的

Alagille症候群は遺伝性胆汁うっ滞性疾患の中で最も頻度が多く、常染色体優性遺伝形式をとる疾患である。本症は肝内胆管の減少という肝病理所見と共に、胆汁うっ滞、心血管奇形、椎体の異常、眼球の異常、特異的な顔貌などの臨床症状を伴う症候群として提唱された。その

後、病気の原因として*JAG1*遺伝子や*NOTCH2*遺伝子の変異が同定され、疾患概念は変貌しつつある。すなわち腎不全など新たな症状が前景に立つ非典型例の存在、同一家系内で同じ変異アリルを有しながら症状のほとんどない不完全浸透例から肝移植や心臓手術の必要な重症例まで多様な重篤度を取りうる事が判明し

てきた。さらに本症と類似して乳幼児期に胆汁うっ滞をきたす多数の遺伝性胆汁うっ滞性疾患が発見され、本症とこれらの類縁疾患の鑑別が重要な課題となっている。

重症なAlagille症候群では、肝移植や心臓手術の導入によって予後は改善しつつあるが、これらの複雑な治療を考慮に入れた治療戦略の確立が求められている。さらに米国からの報告では、近年、乳幼児期の本症はこれらの手術などの進歩によって予後は改善する一方、頭蓋内の血管異常が重要な合併症として注目されるようになっている。

Alagille症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患については、日本でも熱心な研究者によって世界水準の研究が積み重ねられてきたが、個別の研究に留まっており、全国の患者さんの抱える問題に直接アプローチする研究は実施されてこなかった。

今回、私共は平成21年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「Alagille症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の診断ガイドライン作成、実態調査並びに生体試料のバンク化」の助成を得て、これらの研究に取り組むことにした。

本年度は研究の初年度として、本邦におけるAlagille症候群患者の実態を明らかにするために全国一次調査を実施して症例の収集に努め、これらの患者さんの抱える問題点の概略を調査した。さらに近年新たに導入された遺伝学的診断法を本症の診断にどのように役立てるかという観点に重点を置いて、Alagille症候群の新たな診断基準案を策定した。さらに簡便な遺伝子診断法の検討や、予備的な予後調査を実施した。

さらにAlagille症候群と類縁の遺伝性胆汁うっ滞性疾患である進行性家族性肝内胆汁うっ滞症や胆汁酸代謝異常症の診断法について検討し、本症との鑑別診断の概要を明らかにした。

B. 研究方法

1. Alagille症候群

1.1. 全国一次調査

全国の大学病院小児科、小児専門病院内科または消化器科・循環器科、300床以上の総合病院小児科を対象として、はがきによる一次アンケート調査を実施した。郵送は全621施設に行われ、Alagille症候群患者の有無、診断法、患者さんの抱える問題点について調査した。

1.2. 診断基準（案）の策定

PubMedで調査し得た2000年以降に発表されたAlagille症候群に関する論文45編、米国NIHのデータベース2か所（OMIM:Online Mendelian Inheritance of Man 及びGARD:Genetic And Rare Diseases Information Center）を参考にして、わが国の現状に合致した診断基準案を策定した。

1.3. 遺伝子診断の方法

臨床的にAlagille症候群と診断された患者由来の末梢血からDNAを抽出し、これを用いて原因遺伝子のDNA診断法について検討した。まず、塩基配列を決定する前に熱変性高速液体クロマトグラフィー法

（DHPLC:Denaturing High Performance Liquid Chromatography）を行うDHPLC-シーケンシング法の有効性を検討した。

次に塩基配列決定によって変異の同定されなかった症例に対して、アレイCGH法を行い網羅的な解析を行うことによって、診断能の向上が得られるか否かを検討した。

1.4. 長期の診療で見出された患者さんの抱える問題点と長期予後

東北大学小児科ならびに関連病院で加療中の7症例を対象として、Alagille症候群の症候と重篤度、長期予後を後方視的に検討した。

2. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症

2.1. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の肝組織における病理学的な解析

久留米大学附属病院で診療中の進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型3例と久留米大学附属病院病理部に送付され、臨床症状と遺伝子

診断によって進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2型と診断された4症例について、肝組織の病理学的な検討を行った。また、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型の原因遺伝子である BSEP:Bile Salt Export Pumpの肝組織における発現を、酵素抗体法によって検討した。

2.2. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 3型の診断

皮膚掻痒感と黄疸を主訴に受診した8歳の女兒について、詳細な診察と肝生検による肝組織の病理学的な評価を行った。

3. 先天性胆汁酸代謝異常症

全国から胆汁酸研究所並びに久留米大学小児科に、尿や血清の胆汁酸の分析を依頼された症例について、ガスクロマトグラフィ/質量分析法によって、異常胆汁酸の有無を検討した。

さらに先天性胆汁酸代謝異常症が疑われた症例について、直接塩基配列決定法により当該遺伝子の検索を行った。

(倫理面への配慮)

各分担研究者の所属施設における倫理基準を遵守した。

C. 研究結果

1. Alagille症候群

1.1. 全国一次調査

全国の小児診療を行う 621 施設に一次調査用紙を郵送し、367 施設 (59%) から回答を得た。全国 61 施設から 114 例の Alagille 症候群患者が集積された。回答率が患者数に依存しないと仮定すると、わが国の総患者数は 193 名となり、実数はこれ以下と推定された。

これらの患者について国内分布を図 1 に示した。各県別にみると、人口あたりの本症患者数に 40 倍以上の差がみられた。

集積された 114 例の診断法について検討すると臨床診断によるものが 96 例 (84%)、遺伝子診断のみによるものが 8 例 (7%)、両方法を併用している症例が 10 例 (9%) であった

(図 2)。

本症患者について治療対象となった臓器の分布を図 3 に示した。本調査によれば、わが国の Alagille 症候群患者については、胆汁うっ滞と心・肺血管奇形、発達遅延が主要な問題であった。

1.2. 診断基準 (案) の策定

Alagille症候群の診断基準案を表 1 と III 資料に添付した。Alagille症候群の診断を典型例、非典型例、変異アリルを有するが症状の乏しい不完全浸透例に分けて、各々について診断基準を示した。典型例は従来の臨床病理学的な Alagille 症候群の診断基準と同一内容である。

近年導入された遺伝的診断法を用いて非典型例や不完全浸透例を診断する基準を明らかにした。

1.3. 遺伝子診断の方法

DNA塩基配列決定前にスクリーニング検査として熱変性高速液体クロマトグラフィー法 (DHPLC法) を行う DHPLC-シーケンシング法の有用性が明らかとなった。

DHPLC-シーケンシング法によって遺伝子変異が同定されなかった症例 1 例について、アレイ CDG 解析を行い、*JAG1* 遺伝子を含む染色体の領域が 1 コピー減少している症例を発見した。これにより、Alagille 症候群の遺伝子診断では、アレイ CGH 法の導入によって診断能が向上する可能性が示唆された。

1.4. 長期の診療で見出された患者さんの抱える問題点と長期予後

乳幼児期に Alagille 症候群と診断され、現在も外来通院加療を継続している 7 症例について、医学的な問題点を後方視的に検討した。現在、いずれの症例も年齢は 10~24 歳に達している。

現時点では総ビリルビンは全例正常範囲内にあるが γ GTP は全例で高値であった。高コレステロール血症が 3 例で認められ、メバロチン内服でも正常化していない。肝画像検査では肝腫大以外の異常所見を呈する者はおらず、胆

汁うっ滞性肝硬変への進行はみられなかった。1例では腎石灰化症がみられ、他の1例では慢性甲状腺炎を合併し、低身長を呈していた。中枢神経異常を呈した症例はいなかった。

2. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症

2.1. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の病理学的な解析

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型3例、2型4例の計7症例について、肝組織の病理学的検討を行った。2型は1型に比較して、線維性隔壁の拡大や小葉構造の改変など、より進行した肝病理像を呈していた。さらに、2型は胆汁うっ滞もより高度であり、巨細胞性肝炎を呈する例が見られた。

BSEPの免疫組織学的な解析を行ったところ、2型の4例全てでBSEPの発現が欠如していた。酵素抗体法によるBSEPの検出は、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型の診断に有用であることが判明した。

2.2. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型について

突然、肝内胆汁うっ滞を呈した8歳女兒について精査を行った。肝組織では門脈域の線維化と変性した小葉間胆管の増生が認められ、電子顕微鏡学的な検討では、肝細胞の細胞質内に電子密度の高い小型のミエリン様構造物の沈着が多数見られ、リン脂質の沈着が推測された。この結果から進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型を疑い、肝組織中のMDR3の発現を検討したところ、発現が見られなかった。

以上から、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型と診断された。

3. 先天性胆汁酸代謝異常症

乳児期の閉塞性黄疸にもかかわらず、血清総胆汁酸やγGTPの高値が見られない3症例について尿中胆汁酸分析を行った。1例で3β-hydroxy-Δ⁵ bile acidsの異常排泄が、2例で3-oxo-Δ⁴ bile acidsの異常排泄がみられたことから、先天性胆汁酸代謝異常症が強く疑われた。そこで各々の責任遺伝子の変異を検索した

ところ、3β-hydroxy-Δ⁵-C₂₇-steroid dehydrogenase/isomerase欠損症および、3-oxo-Δ⁴-steroid 5β-reductase欠損症と診断が確定した。いずれの症例も、今まで報告のない、新規の変異であった。これら3症例のうち、2症例でCDCA(ケノデオキシコール酸)の補充療法が開始され、治療効果が明かとなっている。

D. 考察

1. Alagille症候群

1.1. 全国一次調査

わが国で初めてAlagille症候群について全国調査が実施され、114症例が集積され、総患者数は193名以下と推計された。小児慢性特定疾患治療研究事業による平成18年度の登録症例数は、Alagille症候群66例、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症27例である。さらに日本肝移植研究会による平成20年度までの肝移植登録症例数は、Alagille症候群59例、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症31例であった。従来から、Alagille症候群患者の約1/3で肝移植が必要になるとされている。

これらのことを総合するとわが国におけるAlagille症候群の患者数は、200名程度以下と推定され、今回の全国調査の精度が高いことが裏付けられた。

一方、各県別にみると人口当たりのAlagille症候群患者数に大きな差があることが判明した。これらの解釈については、限られた症例の遺伝的解析に基づく所見ではあるが、創始者効果(founder effect)は明らかでないので、家系分布の地域差は考え難い。従来からAlagille症候群の研究が盛んな東北大学や鳥取大学の周辺で患者数が多いことを考慮すると、他地域での診断見のがし例の存在や今回の全国調査における多重登録の可能性が推測される。これらについて、今後の再検討が必要である。

Alagille症候群では、多種類の臓器に異常を呈し、多様な症状をきたしうる。必要によって

は、肝臓、循環器、腎臓、神経など多種類の専門家による集学的な治療が必要になる場合も想定される。わが国の Alagille 症候群患者について、実際にどのような治療が行われているか、今回初めて調査された。胆汁うっ滞と心・肺血管奇形、発達遅延が主要な問題であり、日本では米国で問題となっている脳血管障害の報告は2例（1.8%）であった。

1.2. 診断基準の策定

欧米からの報告によれば、典型的な Alagille 症候群患者の家系で遺伝子検索を行うと、変異アリルを有するが症状の乏しい不完全浸透例が多数発見される。このような人を従来の基準に沿って Alagille 症候群と診断することはできない。また、本人については医学的治療の必要がないと考えられるので、これらの不完全浸透例について遺伝学的検査を行うことは、医学的・倫理的側面から慎重な配慮が必要である。

一方、このような不完全浸透例の両親から重篤な Alagille 症候群の患児が出生した場合、胆管減少を有する保護者がこどもの肝移植ドナーになることは危険である。また、遺伝相談の点から、変異アリルの有無を知りたいとする希望はありうる。ただし注意すべきは、遺伝子診断のみでは疾患の重篤度は不明である事で、わが国の現状では、出世前診断の対象にはならないと考えられる。今後、Alagille 症候群における遺伝子診断の適応について、検討する必要がある。

1.3. 遺伝子診断の方法について

DNA塩基配列の決定による Alagille 症候群の遺伝子診断には、2つの問題が存在する。1つは責任遺伝子のサイズが大きく、変異のホットスポットがないために、DNAを用いた直接塩基配列決定法では検査法のコストが極めて高くなる事である。2つめは、直接塩基配列決定法によって、一塩基置換や数塩基

の欠失や重複は容易に検出されるが、欠失や重複の領域が大きい場合、塩基配列決定法による変異の診断は困難である。

本年度の研究により、前者については DHPLC—シーケンシング法が有効であり、後者についてはアレイ CGH法が使用できる可能性が明らかとなった。これらの方法は他の遺伝性胆汁うっ滞性疾患の遺伝子診断にも役立てられる可能性が高く、来年度以降これらについても検討する予定である。

1.4. 長期の診療で見出された患者さんの抱える問題点と長期予後

Alagille 症候群の臨床像についての記載では、胆汁うっ滞の強い乳幼児期は詳細な記述が多いが、成長してからの病像について不明であった。今回の研究では7例という限られた症例数ではあるが、十代以降の長期経過が明らかとなった。5例では胆汁うっ滞性肝障害や、高脂血症に対する長期的な治療が必要であった。一方、肝病変の進行、成長障害、中枢神経の異常などはみられず、今後慎重な経過観察は必要であるが、長期予後は必ずしも悪くない症例も多いことが示唆された。この事は、本症患者さんにとって大きな福音となるであろう。

2. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症

2.1. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の免疫病理学的な解析

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症は、新生児・乳児期から胆汁うっ滞をきたす Alagille 症候群の類縁疾患である。いずれも高度の搔痒感や肝病変の進行をきたすことが多く、これらの場合、肝移植の適応となる。

従来の研究により、1型の場合は肝移植を行っても難治性下痢や高度の脂肪肝などの合併症が起りやすく、肝移植の適応、時期について慎重な考慮が必要である。一方、2型の場合は1型よりも進行が早い場合が多く、幼児期に成人型肝がんを発症する可能性もあるが、肝移植を行えば完治する可能性が高い。したがって肝移植の時期を決めるために、進

行性家族性肝内胆汁うっ滞症の1型と2型を鑑別する意義は大きい。

遺伝子診断は1型と2型を鑑別する1つの有力な方法であるが、遺伝子サイズが大きいことや変異のホットスポットがないことから、塩基配列の決定による遺伝子診断の実施は困難である。

本研究により、肝組織のBSEPの免疫染色により進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型の診断が可能であることが確認された。本法の普及により、今後進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の病型診断が大きく進歩することが期待される。

2.2. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型について

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型は1型、2型と異なり、 γ -GTPが高値を示す。小児期における進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型の記載は少なく、本邦での診断確定も困難であった。遺伝性胆汁うっ滞症に含まれるが、発症年齢は必ずしも乳幼児期とは限らず、他の胆汁うっ滞症との鑑別は容易ではない。本研究により、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型の診断について比較的簡便な方法が提案できた意義は大きい。

3. 先天性胆汁酸代謝異常症

胆汁酸代謝異常症には多数の病型が含まれるが、いずれも乳幼児期に肝内胆汁うっ滞をきたすため、Alagille 症候群や進行性家族性肝内胆汁うっ滞症との鑑別が重要である。また、一部の胆汁酸代謝異常症では、成熟胆汁酸であるケノデオキシコール酸 (CDCA) の補充により、

治療効果が得られる点でも、早期診断・早期治療が求められている。

今回の研究によって、尿中の胆汁酸分析を行うことで、希少疾患である胆汁酸代謝異常症が効率的にスクリーニングできることが確定した。今後、この方法を普及させることは、Alagille 症候群の類縁疾患の診断に大きく寄与すると期待される。

E. 結論

本年度の研究によって、Alagille症候群の患者数の把握、診断基準案の策定、簡便な遺伝子診断法の導入が行われた。さらに、本症に類縁の進行性家族性肝内胆汁うっ滞症や先天性胆汁酸代謝異常症について、実用的な診断法を見出すことができた。今後、これらの成果を社会に広く周知して、我が国におけるAlagille症候群を含む遺伝性胆汁うっ滞症の診断の向上に寄与していく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

岩淵 敦、須磨崎 亮：Alagille 症候群、小児科診療 小児の症候群 2009 305 頁

岩淵 敦、須磨崎 亮：Aagenase 症候群、小児科診療 小児の症候群 2009 304 頁

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 アラジール症候群患者の国内分布（県別）

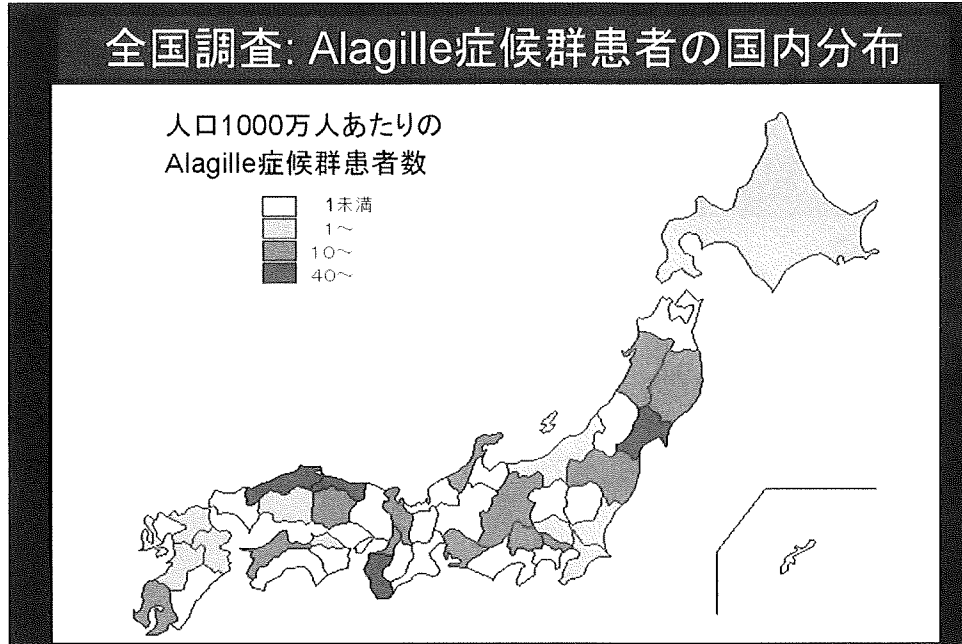


図2 アラジール症候群の遺伝子診断

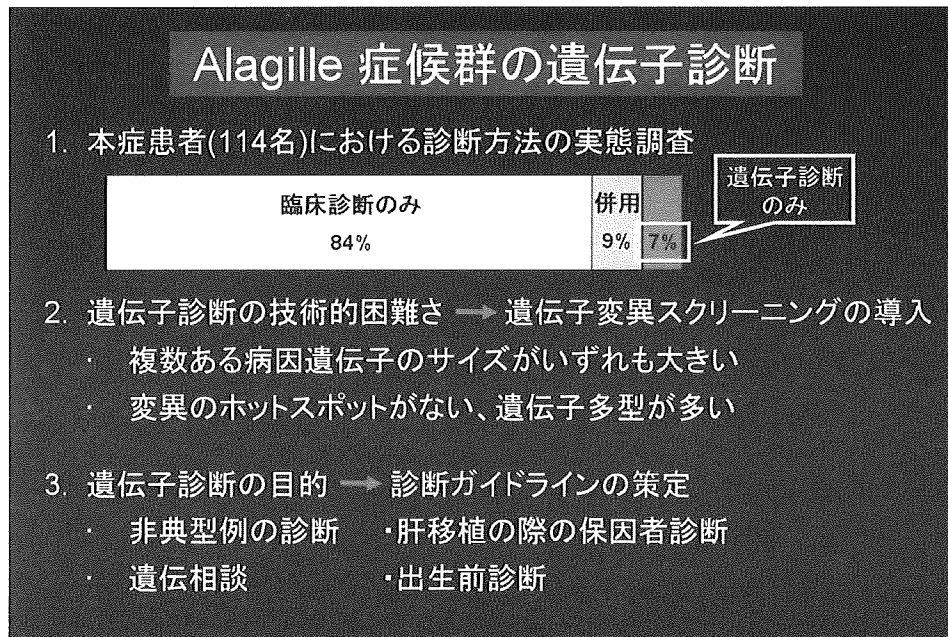


図3 アラジール症候群の患者の抱える問題点と予後

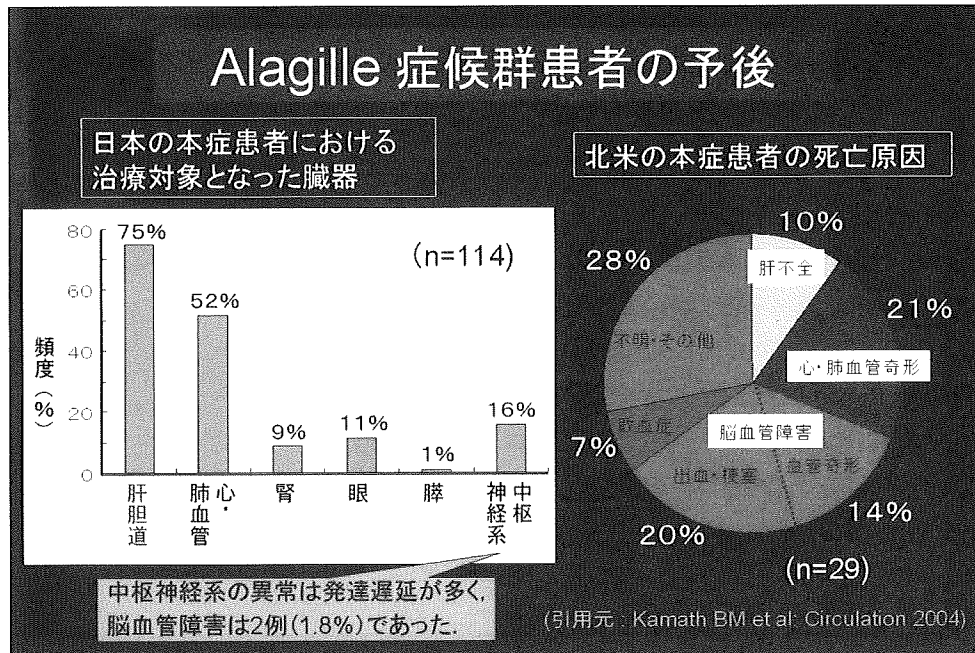


表1 アラジール症候群の診断基準 (案)

診断基準 (案)

1. 主要な症候
 - i. 肝病理所見における肝内胆管の減少
 - ii. 臨床所見
 - ①胆汁うっ滞 ②心血管奇形 ③椎体異常 ④眼球異常 ⑤特徴的顔貌
2. 腎臓、脳血管、脾臓などの異常も本症の診断に重要な所見である
3. 参考事項 (遺伝的診断)
 - i. 常染色体優性遺伝に矛盾しない家族歴
 - ii. 遺伝子診断 (*JAG1* または *NOTCH2* 遺伝子変異を認める)
4. アラジール症候群の診断基準
 - 典型例:
 - ・ 1の i を満たし、かつ、ii の①から⑤のうち、3項目以上を満たす
 - 非典型例、または変異アリルを有するが症状の乏しい不完全浸透例:
 - ・ 1、または2のアラジール症候群の症候が1項目以上見られる
 - ・ 常染色体優性遺伝に矛盾しない家族歴
 - ・ 遺伝子診断 上記の3項目のうち、2項目以上を満たす

II. 分担研究報告書

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

Alagille 症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の診断ガイドライン作成、
実態調査並びに生体試料のバンク化

研究分担者 小崎健次郎 慶應義塾大学医学部小児科学教室

研究論旨

Alagille 症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の原因遺伝子が明かにされつつあるが、原因遺伝子やその変異部位は極めて多様性に富んでおり、実地臨床では正確な遺伝子診断は容易ではない。従来から使用されている DNA シーケンシング法によれば、一塩基の置換や数塩基の欠失・重複の検出が可能であるが、2つの問題点が存在していた。① 遺伝子変異が在する部位は、患者毎に異なっているため、遺伝子の全領域の DNA 塩基配列を決定する必要がある。DNA 塩基配列の決定にはコストがかかるため、別の方法によって遺伝子変異のある部位を予測することができれば、より安価に遺伝子診断を実施することが可能となる。② DNA 塩基配列決定法により 1 塩基置換や数塩基の欠失・重複は検出が可能であるが、それより大きな欠失や重複を認める場合、検出が極めて困難であった。本研究では、1) DNA 塩基配列決定の前に、スクリーニング検査として DHPLC 法を導入し、検査の普及を図り (DHPLC-シーケンシング法)、2) DHPLC-シーケンシング法により変異の同定されなかった症例に対して、アレイ CGH 法による解析を行い、診断効率の向上を実現した。遺伝性胆汁うっ滞性疾患の分子遺伝学的病因について、網羅的に解析を行う計画の feasibility が示された。

A. 研究目的

Alagille症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患に含まれる一部の疾患については原因遺伝子が明らかにされており、DNAシーケンシング法により遺伝子診断を実施する事が可能である。DNAシーケンシング法によれば、一塩基の置換や数塩基の欠失・重複の検出が可能であるが、2つの問題点が存在していた。① 遺伝子変異が在する部位は、患者毎に異なっているため、遺伝子の全領域のDNA塩基配列を決定する必要がある。DNA塩基配列の決定にはコストがかかるため、別の方法によって遺伝子変異のある部位を予測することができれば、より安価に遺伝子診断を実施することが可能となる。② DNA塩基配列決定法により1塩基置換や数塩基の欠失・重複は検出が可能であるが、

それより大きな欠失や重複を認める場合、検出が極めて困難であった。欠失や重複の範囲が大きければGバンド染色体検査染色体検査により異常の検出が可能であるが、大部分の欠失・重複は微細であるために、染色体検査では検出されず、相当数の症例について「偽陰性」となっていると考えられる。

従来の染色体検査法よりも解像度が高い検査としてアレイCGH法検査が注目されている。ゲノム全領域に由来する数十塩基の配列をガラス板上に配置したマイクロアレイに、患者由来ゲノムDNAをハイブリダイズさせ、欠失や重複の有無を調べる技術である。

本研究では、1) DNA塩基配列決定の前に、スクリーニング検査としてDHPLC法を導入し、検査の普及を図ること (DHPLC-シーケンシ

グ法)、2) DHPLC-シーケンシング法により変異の同定されなかった症例に対して、アレイ CGH法による解析を行い、診断効率の向上を目指した。

B. 研究方法

1. DHPLC-シーケンシング法解析

患者由来の末梢血からゲノムを抽出し、アラジル症候群原因遺伝子JAG1遺伝子を複数領域に分けてPCR法で増幅、DHPLC(熱変性高速エク対クロマトグラフィー法)により変異をスクリーニングした。液体クロマトグラフィーによる波形ピークの分裂が認められた領域については、DNAシーケンシング法でDNA塩基配列を決定した。

2. アレイ CGH法解析

患者に由来するゲノムDNAをCy5、正常対照者由来のゲノムDNAをCy3でラベル化し、アレイ上で65 μ m、40時間のハイブリダイゼーションを行い、マイクロアレイスキャナーにて、スキャンし、これを専用ソフトウェアにて数値化した後、各遺伝子のゲノムコピー数を解析した。

ハイブリダイゼーションおよびデータの数値解析にはアジレント社のマイクロアレイシステムを利用した。

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社)を用いて血液からDNAを抽出、その後アジレント社のダイレクト法プロトコルに沿ってサンプルを調整、65 $^{\circ}$ C、40時間ハイブリダイゼーションを行い洗浄後スキャンし、これをFeature Extractionソフトウェアにて数値化した。Agilent Genomic Workbenchソフトウェアによって解析を行った。

(倫理面への配慮)

慶應大学倫理委員会の承認を得て、アレイ CGH 解析をおこなった。

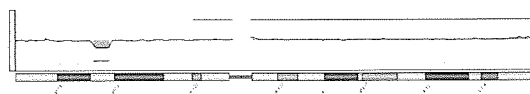
C. 研究結果及び考察

1. DHPLC-シーケンシング法解析

臨床的にアラジル症候群と考えられた6症例について、アレイ CGH 検査を実施した。3症例について変異を認めた。

2. アレイ CGH 法解析

アレイ CGH 解析によりアラジル症候群原因遺伝子番染色体の全域が1コピー減少している例を示す。



灰色で示した部分のシグナルが減少しており、ゲノムコピー数の減少(モノソミー)を示す。

D. 評価

1. 達成度

アレイ CGH を用いて、アラジル症候群の遺伝子診断の精度を向上させるためのシステムが整備された。本年度の研究では、アラジル症候群の検討を行い、遺伝性胆汁うっ滞性疾患の遺伝子診断のためのアレイ CGH 使用のフィージビリティを示した。来年度以降、他の遺伝子をターゲットとしたアレイ CGH の解析系の整備を進めて行く。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

DHPLC-シーケンシング法を用いて、Alagille 症候群などの遺伝性胆汁うっ滞性疾患の遺伝子診断のシステムを整備できた。DNA チップを使った同様の試みが報告されているが、塩基レベルの欠失や重複を検出できないことから普及に至っていない。

海外ではここ1~2年の間にアレイ CGH 法による検査が急速に普及しつつあるが、わが国における普及は進んでいない。今後、DHPLC シーケンシング法やアレイ CGH 法の臨床検査としての有用性を示す事により、わが国の遺伝性胆汁うっ滞性疾患の研究・診療のレベルを国際水準に高める事に貢献した。遺伝性胆汁うっ滞症の臨床情報と遺伝情報の両者を包含した系統的な解析は世

界的にも行われておらず、本研究の学術的・国際的意義は高い。

3. 今後の展望

遺伝性胆汁うっ滞性疾患のサンプルを多数保有する国内外の施設と関係を取り、短期間に多数の検体の解析を行い、遺伝性胆汁うっ滞性疾患の分子遺伝学的病因について、網羅的に解析を行う計画の feasibility が示された。遺伝子診断により確定された Alagille 症候群患者集団について、臨床情報と遺伝情報の両データを詳細な分析を通じて、新たな診断アルゴリズムや診断基準の確立が期待できる。

4. 研究内容の効率性

ゲノムの DNA を用いた解析である事から、検体の輸送が比較的容易であり、研究班の中で蓄積されつつある。少量のゲノム DNA から、症例について順次、速やかに解析を進めてゆけると期待できる。

E. 結論

DHPLC-シーケンシング法・アレイCGHを用いて、遺伝性胆汁うっ滞性疾患を有する患者のゲノムDNAを用いて、遺伝的要因を網羅的に解析できることを示した。

F. 研究発表

1.国内	
2.海外	
口頭発表	0件
原著論文による発表	0件
それ以外（レビュー等）の発表	0件

G. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得	なし
2.実用新案登録	なし
3.その他	なし

Alagille 症候群の長期経過に関する検討

研究分担者 田澤雄作 国立病院機構仙台医療センター・小児科・部長

研究協力者 虻川大樹 宮城県立こども病院総合診療科・部長

研究要旨

乳幼児期に診断された Alagille 症候群の臨床像を集約し、Alagille 症候群の診断、治療、合併症の問題点を明らかにし、乳幼児期に認められるそのほかの胆汁うっ滞性疾患との鑑別診断の要点を明らかにし、最終的に、Alagille 症候群を含めた遺伝性胆汁うっ滞性疾患の診断ガイドラインの作成並びに実態調査の構築を目標とした。

A. 研究目的

乳幼児期に診断された Alagille 症候群 (AGS) の長期追跡例について、臨床経過および各種データを分析し、長期経過における問題点を明らかにする。

B. 研究方法

乳幼児期に AGS と臨床的に診断され、現在も外来通院加療を継続している 7 例を対象として、各症候の有無と重篤度を後方視的に検討した。内訳は男女比 2 : 5、現在の年齢 10~24 歳で、同胞が 2 組 4 例、うち 1 組が双胎¹⁾である。症例 7 は遺伝子解析にて *JAG1* 変異が確認されている。

C. 研究結果

(1) 胆汁うっ滞性肝障害

診断時には全例で胆汁うっ滞性肝障害を呈し、内科的治療の対象となったが、双胎の 2 例 (症例 3・4) はその後肝障害が軽快し、22 歳となった現在では無治療となっている。総ビリルビンは全例で正常範囲内であり、一方 γ-GTP は全例で高値であった。総コレステロール値は 3 例で異常高値であり、メバロチン内服にても正常化していない。最年長で肝障害が最も強い症例 1 は、軽度の血小板減少を呈してい

た。腹部エコーおよび CT 検査では、肝腫大以外の異常所見 (肝内腫瘤性病変、肝硬変) を呈する症例はなかった。

(2) 肝外症状

双胎の 2 例を除いた 5 例とも心・肺血管系の異常、眼病変、脊椎変形、特徴的顔貌を呈しており、完全型 AGS と診断された。腎病変を合併しているのは 1 例のみ (症例 2、腎石灰化症) で、中枢神経系の異常を呈した症例はいなかった。慢性甲状腺炎を合併した症例 5 のみが低身長を呈していた。

D. 考察

初期の報告では、AGS は一般に予後良好な経過をとるとされていた²⁾。しかし、その後の分子遺伝学的解明ならびに臨床研究によって、AGS は多様な臨床像および重症度を呈する疾患であり、その肝病変は当初の認識よりも重篤かつ進行性であることが明らかとなった³⁾⁴⁾。小児期に胆汁うっ滞が軽快しても、18 歳以降に肝不全、腎不全、肝細胞癌などの重篤な合併症が出現して死亡する症例が報告されており⁴⁾、AGS の長期予後は良好とはいえない。

自験の 7 例はいずれも乳幼児期に黄疸が消失しており、軽症例に該当する⁵⁾。しかし、全例で 10 歳以降も生化学データの異常が持続し、

5例で内科的治療を要している。最年長である症例1では血小板減少を呈しており、肝硬変・肝不全への進展が危惧される。

一方、肝外病変に関しては、幸いにも重篤・致命的な合併症を呈する症例はいなかったが、成長障害、腎障害（腎石灰化症）を各1例で認めた。今後加齢に伴って、AGS そのものや高脂血症による二次的な血管性病変が出現する可能性があり、注意を要する。

AGS は乳幼児期に診断されることが多いため、肝臓病を専門とする内科医でも AGS の知識や診療経験に乏しい。ゆえに AGS 患者の長期フォローは小児科医がそのまま継続することが多いが、小児科医は成人の脳血管障害や虚血性心疾患を適切に診療する能力に欠ける。AGS 患者の長期予後を改善するためには、症例の集積による長期経過の解明と、小児科・内科間のスムーズな連携が必要である。

E. 結論

AGS 自験 7 例の長期経過を検討したところ、5 例に対して胆汁うっ滞性肝障害や高脂血症に対する長期的な治療を要していた。今後肝硬変・肝不全や肝内腫瘍性病変、血管障害などの重篤な症状が出現する可能性があり、内科医と連携して注意深く経過観察する必要がある。

乳幼児期に認められる Alagille 症候群を含めたその他の胆汁うっ滞性疾患の診断及び鑑別診断の資料⁶⁾を作成し、今後の実態調査に役立てる。

文献

1) 大沼健兒, 他: Alagille 症候群の双胎例.

日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌
12:64-68, 1998.

2) Alagille D, et al: Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome of arteriohepatic dysplasia); Review of 80 cases. J Pediatr 110:195-200, 1987.

3) Hoffenberg EJ et al: Outcome of syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome) with onset of cholestasis in infancy. J Pediatr 127:220-224, 1995.

4) Schwarzenberg SJ et al: Long-term complications of arteriohepatic dysplasia. Am J Med 93:171-176, 1992.

5) 虻川大樹, 他: Alagille 症候群の予後と肝移植の適応に関する検討. 日本小児科学会雑誌 103:554-558, 1999.

6) 田澤雄作. 小児期胆汁うっ滞性疾患の臨床: Alagille 症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の診断・鑑別診断 (資料集). 平成 21 年度厚生省科学研究費補助金「難治疾患克服研究事業」2010.

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型および 2 型の病理組織学的検討

研究分担者 鹿毛 政義 久留米大学病院病理部 教授

研究要旨 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) の 7 例の肝生検を対象に、病理組織学的検討ならびに肝細胞の bile salt export pump (BSEP) の発現について免疫組織学的検索を行った。PFIC1 と PFIC2 の病理組織所見は異なり、PFIC2 では、肝細胞の BSEP の発現は認めなかった。肝生検は、PFIC の診断やスクリーニングに有用である。

A. 研究目的

かつて、原因不明の新生児期の胆汁うっ滞性疾患で病理組織学的に巨細胞性肝炎を呈する症例は、新生児肝炎として一括りに診断されていた。近年、これらの疾患に関する分子病理学的研究が進み、新たな疾患の分類や疾患概念が提唱されるようになった。進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 progressive familial intrahepatic cholestasis (以下 PFIC) は新生児期の胆汁うっ滞を来す疾患のひとつである。本疾患は乳児期に発症し、高度の慢性胆汁うっ滞が持続して、胆汁性肝硬変に進行する常染色体劣性遺伝疾患であり、近年、PFIC の原因遺伝子が同定された。その中核を成す病態は胆汁成分の細胞膜輸送を担う蛋白質の異常である。しかしながら、PFIC の肝病理形態については十分には解明されてはいない。今回、我々は PFIC の肝病理組織学的検討ならびに肝細胞の bile salt export pump (BSEP) の発現について免疫組織学的検索を行った。

B. 研究方法

遺伝子検査で確定診断された PFIC 症例の肝生検組織を検討した。症例は当施設の PFIC1

型 3 症例、他施設の PFIC2 型 4 症例である。そのうち PFIC1 型 2 症例はそれぞれ経過中 3 回、2 回肝生検されている。

免疫組織化学：BSEP の検索は、抗 BSEP (F-6) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) を用いて行った。BSEP の抗原の賦活化のために、薄切した肝組織標本に対しマイクロウェーブの照射を行った。

C. 研究結果

PFIC1 病理組織所見：門脈域から肝小葉内に伸展する細い隔壁性の線維化を示した。門脈域ならびに肝実質域に炎症細胞の浸潤は無いが、軽微であった。肝実質域には胆汁うっ滞は顕著でないが、胆汁栓が 1 例に認められた。(図 1) 肝細胞は軽度腫大を呈し、肝細胞索の乱れが見られた。巨細胞性肝炎を呈する症例はなかった。今回の検討症例では、初回肝生検で、多数の多核巨細胞が見られ、その後、多核巨細胞は減少し、細い隔壁性線維化が進行した症例がみられた。PFIC2 病理所見：胆汁うっ滞が高度で、肝細胞は風船様に腫大し、多核巨細胞性肝炎を呈した。線維化の程度は症例によって異なったが、PFIC1 型と比較すると比較的幅の広い隔壁性

の線維化を示し、肝小葉構築の改変を呈する症例があった。今回の検討症例では、1症例に肝細胞の胞体に Mallory 小体が見られた。(図2) 免疫組織化学の結果：PFIC1 では、肝細胞の毛細胆管に一致して BSEP の発現が見られたが、PFIC2 には、その発現は認めなかった。(図3)

D. 考察

PFIC の肝病理組織所見については、すでに欧米から報告されているが、本邦例においても、PFIC の 1 型と 2 型、それぞれに特徴ある肝病理組織所見を呈することが確認された。この組織所見の相違は、障害されるトランスポーターにより胆汁うっ滞の病態が異なることを反映していると推察されるが、両者の関連について、その詳細は不明である。

今回の検討で、PFIC が疑われる症例に対し、肝生検は診断的価値が高いことが明らかになった。BSEP の免疫組織化学的検索を加えることにより、PFIC2 の診断の絞込みは可能であると思われる。

E. 結論

PFIC の診断に関しては、肝生検は有用であると考えられる。PFIC の症例は少なく、病態解明のためには、今後、症例を集積し、検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ueki I, Kimura A, Chen HL, Yorifuji T, Mori J, Itoh S, Maruyama K, Ishige T, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Kage M, Matsuishi T. SRD5B1 gene analysis needed for the accurate diagnosis of primary 3-oxo-Delta-steroid 5beta-reductase deficiency. J Gastroenterol Hepatol. Vol.24(5), 776-785, 2009

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

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

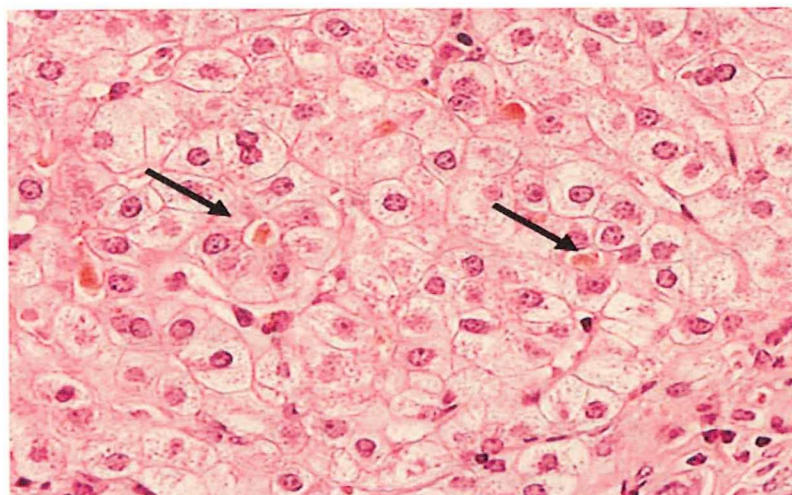


図 1. PFIC1 型の肝組織像 胆汁性（矢印）を容れた肝細胞の腺房様配列がみられ肝細胞は腫大している。

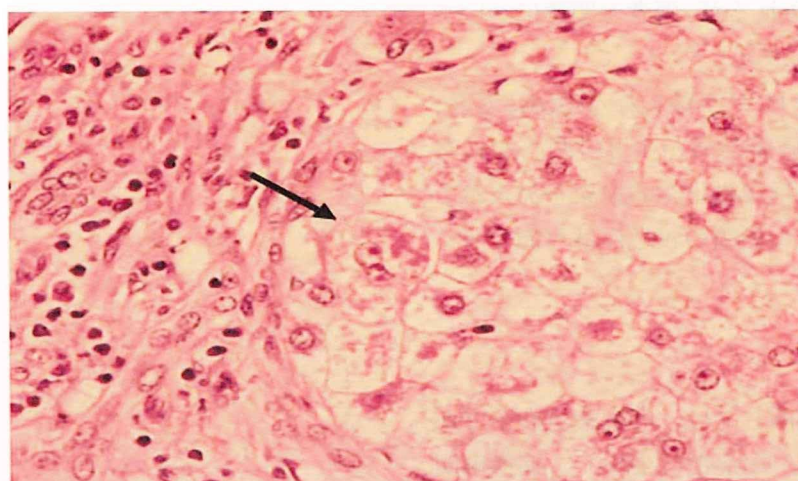
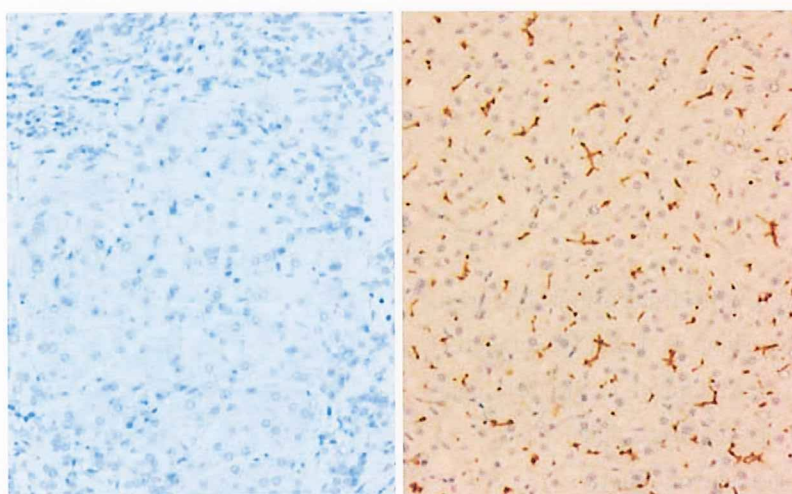


図 2. PFIC2 型の肝組織像 Mallory 小体（矢印）を有する腫大した肝細胞。



PFIC 2

対照（C型慢性肝炎）

図 3. 肝組織における BSEP の発現。PFIC2 型では発現はない。