

症例	年齢	性	臨床診断	肝細胞		病理診断
				BSEP	MRP2	
1	1才1ヶ月	男	原因不明の黄疸	(+)	(#)	PFIC1疑い
2	2ヶ月	女	原因不明の黄疸	(-)	(#)	BRIC1疑い
3	6ヵ月	男	原因不明の胆汁うっ滞と肝機能障害	(-)	(#)	PFIC2
4	4ヵ月	男	原因不明の胆汁うっ滞、肝機能障害	(-)	(#)	PFIC2
5	7才	女	原因不明の黄疸	(-)	(#)	BRIC2疑い
6	2ヵ月	男	原因不明の肝障害	(+)	(+)	PIBD
7	1ヵ月	男	原因不明の胆汁うっ滞と肝機能障害	(+)	(+)	PIBD
8	3ヵ月	男	原因不明の胆汁うっ滞 新生児呼吸促迫症候群	(+)	(+)	PIBD
9	6ヵ月	男	原因不明の肝障害	(+)	(+)	脂肪肝・NICCD
10	14才9ヶ月	女	原因不明の肝不全、心不全	(+)	(+)	肝硬変・ウィルソン病
11	11ヵ月	女	原因不明の肝障害	(+)	(+)	胆道系疾患疑い
12	1ヵ月	男	高ビリルビン血症	(+)	ND	巨細胞性肝炎
13	3ヵ月	女	21 trisomy + 高ビリルビン血症	(+)	(#)	巨細胞性肝炎
14	14才2ヶ月	女	原因不明の胆汁うっ滞と脾腎シャント	(+)	(#)	胆汁うっ滞

NICCD: neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrIn deficiency

ND: 検索せず

PIBD: paucity of interlobular bile duct.

表 1. PFIC もしくは BRIC が疑われて肝生検が施行された 14 症例のプロフィール

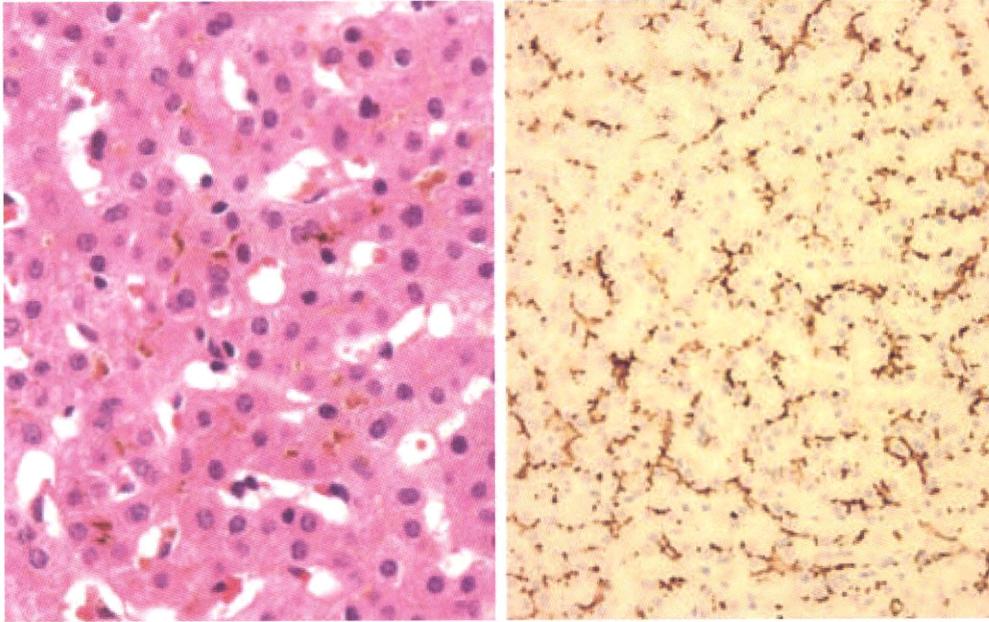


図1. BRIC1が疑われる症例2の肝組織。(左)肝細胞の腺房様配列と著明な胆汁栓、HEX200、(右)同部の免疫組織科学。BSEPが強発現している。X100

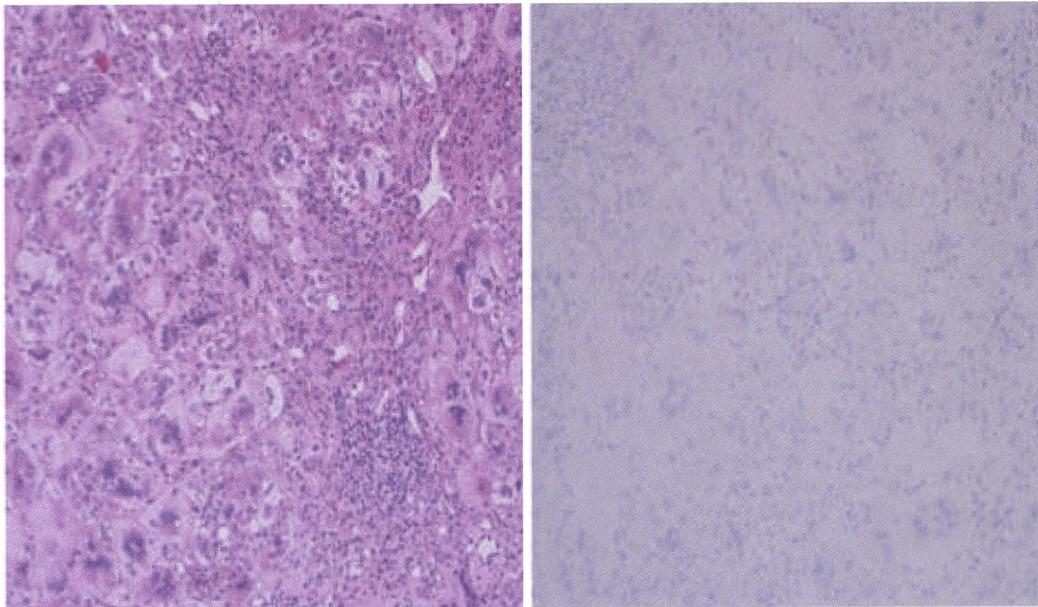


図2. PFIC2が疑われる症例3の肝組織。(左)門脈域の線維化、炎症細胞浸潤と多核化巨細胞化した肝細胞が見られる。HEX200、(右)同部の免疫組織化学。BSEPの発現はない。X200

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

Alagille 症候群などの遺伝性胆汁うっ滞性疾患の診断ガイドラインの作成  
新生児ヘモクロマトーシス、ウイルス性肝炎、その他の代謝性疾患  
に関するサイトマップ

研究分担者	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
研究協力者	小松陽樹	済生会横浜市東部病院	こどもセンター	副部長
研究協力者	十河 剛	済生会横浜市東部病院	こどもセンター	医長
研究協力者	藤澤知雄	済生会横浜市東部病院	こどもセンター	小児肝臓部門長

研究要旨

乳児胆汁うっ滞をきたす疾患を国民が幅広く理解し、迅速かつ正確に診断するため、1)新生児ヘモクロマトーシス、2)ウイルス性肝炎、3)その他の代謝性疾患について、サイトマップ作成した。乳児胆汁うっ滞性疾患は多岐にわたるため、他分野との連携と情報の共有が必須である。

A. 研究目的

乳児胆汁うっ滞をきたす疾患を国民が幅広く理解し、迅速かつ正確に診断するため、1.新生児ヘモクロマトーシス、2.ウイルス性肝炎、3.その他の代謝性疾患について、サイトマップ作成した。

B. 研究結果

1. 新生児ヘモクロマトーシス

<診断のポイント>

(1) よくみられる臨床症状は、出血傾向でその原因は播種性血管内凝固です。遅くとも生後1か月未満に

発症します。

(2) 特徴的検査所見は、凝固能の低下で、プロトロンビン時間が20秒以上あるいはINRが2以上の場合、この疾患を疑います。

<総論および病態>

新生児ヘモクロマトーシスは、肝臓とそれ以外の臓器(主に、心臓、膵臓、唾液腺)に鉄沈着をきたします。鉄が臓器に過剰に沈着して臓器障害をおこすため、ヘモクロマトーシスと呼ばれていますが、遺伝性ヘモクロマトーシスとは全く異なる病気で、今のところ遺伝子異常は認め

られていません。現在、最も有力なのは母子間の同種免疫疾患です。

#### <診断の詳細>

世界的にも診断基準は確立していません。生後1か月未満の症例で凝固能低下が認められ、肝臓のMRIで鉄沈着を示唆する画像が得られれば、新生児ヘモクロマトーシスを疑ってトランスフェリンの飽和率を測定してください。30%を超え、唾液腺の生検で鉄沈着があれば可能性は高いです。

#### <治療と予後>

予後は様々ですが、肝不全で死亡する頻度が高いです。無治療で寛解する症例もあります。肝移植をおこなっても他の代謝疾患ほど生存率は高くありません。鉄キレート剤と抗酸化療法を行います。わが国では入手できない薬剤が一部あります。一方、最近では同種免疫疾患の観点から、免疫グロブリン製剤や交換輸血によって救命できた症例報告がみられています。

#### <文献>

1. Inui A, et al. A case of neonatal hemochromatosis-like liver failure with spontaneous remission. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 40:374-7.
2. Escolano-Margarit MV, et al. Exchange transfusion as a

possible therapy for neonatal hemochromatosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 50:566-8

3. Rand EB, et al. Treatment of neonatal hemochromatosis with exchange transfusion and intravenous immunoglobulin. *J Pediatr.* 2009 ;155:566-71
4. Whittington PF, et al., Outcome of pregnancies at risk for neonatal hemochromatosis is improved by treatment with high-dose intravenous immunoglobulin. *Pediatrics.* 2008 ;121:e1615-21.
5. Rodrigues F, et al. Neonatal hemochromatosis--medical treatment vs. transplantation: the king's experience. *Liver Transpl.* 2005 ;11:1417-24.

## 2. ウイルス性肝炎

#### <診断のポイント>

黄疸をきたす乳児期までのウイルス性肝炎は、そのほとんどが B 型肝炎です。乳児期の急性 B 型肝炎は、母子感染あるいは家族内の水平感染が感染経路なので、詳細な問診と家族内の B 型肝炎の検索により診断できます。

#### <総論および病態>

ウイルス性肝炎とは、肝炎ウイルス感染による肝細胞障害を意味し

ます。黄疸を伴う肝機能異常は、この時期サイトメガロウイルス感染症でもみられますが、サイトメガロウイルスは肝細胞内で増殖しないため、肝炎ウイルスではありません。B 型肝炎の母子垂直感染では、約 85%が肝炎をおこさずにキャリア化します。また残りの 15%は一過性感染で終息しますが、黄疸がみられるほどの重症な肝炎をおこすことはほとんどありません。黄疸をきたす重症肝炎をおこすのは、水平感染がほとんどです。キャリア化することはありませんが、一部劇症化します。

#### <診断の詳細>

HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体、IgM-HBc 抗体、HBV DNA(リアルタイム PCR 法)で診断をします。HBs 抗原が陰性であっても、それ以外の検査データのいずれかが、陽性であれば HBV 感染症を疑い、小児肝臓専門医へ連絡をとってください。

#### <治療と予後>

劇症化するかを正確に診断することが重要です。乳児では脳症の判断は極めて困難なため、①T.B $\geq$ 2.0mg/dl、②ALT $\geq$ 1.000 IU/L、③PT<60% あるいは PT-INR>1.5、のいずれかを満たした場合は、早急に小児肝臓専門医に連絡をとってください。上記3項目のうち、2項目以上を満たした場合は、小児肝臓専

門医の施設へ搬送してください。上記3項目のうち、2項目を満たしていても抗ウイルス療法と人工肝補助療法で内科的に救命できる可能性が高いです。

#### <文献>

- 1 白木和夫. B型肝炎母子感染防止の糸口と展開. 小児科臨床. 2004; 57:1995-2001
2. 乾あやの 他. 本邦における小児期の劇症肝不全. 日本腹部救急医学会雑誌. 2009 29:583-9.
3. Aomatsu T, et al. Fulminant hepatitis B and acute hepatitis B due to intrafamilial transmission of HBV after chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma in an HBV carrier. Eur J Pediatr. 2010;169:167-71.
4. 十河 剛 他. 小児期の劇症肝不全の最近の治療. 小児科. 2008 ;49:1885-93

#### 3. その他の代謝性疾患

##### <診断のポイント>

黄疸には二種類あり、間接型ビリルビン優位か直接型ビリルビン優位かで疾患は大きく異なります。直接型ビリルビン優位とは、総ビリルビン値のうちの直接型ビリルビンが15%を占めるかあるいは直接型ビリルビン値が1.5mg/dl以上を示すものを言います。

### <総論および病態>

直接型ビリルビン優位であれば、他の項目で説明された疾患を鑑別します。それ以外の疾患は、わが国では頻度は少ないですが、①遺伝性高チロシン血症、②ガラクトース代謝異常症があります。

#### ① 遺伝性高チロシン血症 I 型

フマリルアセト酢酸ヒドラーゼ欠損によって血中チロシンが高値を示す I 型では細胞内に蓄積するフマリルアセト酢酸の毒性により肝細胞障害がみられ、黄疸を呈します。

#### ②ガラクトース代謝異常症 I 型

ガラクトース代謝において、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ (GALT) 欠損症では生後 2 週間以内にその 90% で黄疸がみられます。

間接型ビリルビン優位であれば、Crigler-Najjar 症候群があります。肝臓内での UDP-グルクロン酸転移酵素の活性低下によります。

### <診断の詳細>

#### ① 遺伝性高チロシン血症 I 型

尿中有機酸分析で尿中サクシニルアセトンの増加がみられます。

#### ②ガラクトース代謝異常症 I 型

新生児マス・スクリーニングでガラクトース血症が見られた場合、残ったろ紙血を用いて GALT 活性を

測定することができます。

Crigler-Najjar 症候群には I 型と II 型があり、黄疸の程度とフェノバルビタールに対する反応によって臨床的にはほぼ診断がつきます。確定診断には UDP-グルクロン酸転移酵素遺伝子 (UGT1A1) の変異を検査します。

### <治療と予後>

#### ① 遺伝性高チロシン血症 I 型

肝障害の進行を早急に防止することが重要で、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 NTBC の投与と低フェニルアラニン・低チロシン食を行います。但し、NTBC は国内では入手困難で個人輸入となります。肝硬変、肝癌へ進行した場合は、肝移植となります。

#### ②ガラクトース代謝異常症 I 型

無ガラクトース食を生後 3 か月までに開始します。それ以降になると精神発達遅滞を示します。

Crigler-Najjar 症候群 I 型は、UGT1A1 の残存活性がなく新生児早期からの著明な高ビリルビン血症で連日の光線療法が必要となります。しかし、その効果も思春期には低下するため、肝移植の適応となります。II 型では UGT1A1 の残存活性は 10% 以下であり、高ビリルビン血症は新生児期から遷延します。黄疸

の程度はI型より軽く、フェノバルビタールの投与によりビリルビン値の低下がみられます。ほとんどの場合、治療は必要ありませんが、稀にフェノバルビタールの投与が必要な高ビリルビン血症の症例があります。

<文献>.

- 1.中村公俊 他. 遺伝性高チロシン血症.小児内科. 2009 41 (増刊号):341-347.
- 2.岡野善行. ガラクトース血症. 小児内科. 2009 41 (増刊号):410-414.
3. 丸尾良浩. 体質性黄疸. 小児内科. 2009 40 (増刊号):638-643
- 4.小松陽樹 他. 黄疸. 小児内科 2000 32:453-460

### C. 考察

乳児胆汁うっ滞性疾患は多岐にわたるため、他分野との連携が必要である。特に代謝性疾患では日本先天性代謝異常学会と情報を共有することにより、正確かつ迅速な診断が可能と考えられた。

### D. 結論

乳児胆汁うっ滞性疾患を迅速かつ正確に診断するために、サイトマップの作成と他分野の連携、情報の共有が重要である。

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（2）

研究分担者 木村昭彦 久留米大学小児科

研究協力者 水落建輝 久留米大学小児科

研究協力者 関 祥孝 久留米大学小児科

研究要旨

昨年に続き原因不明な新生児・乳児期胆汁うっ滞症の生化学検査および尿中胆汁酸分析を行うことにより、胆汁酸代謝異常症の早期発見および治療を行うと共に遺伝子診断法の確立を試みた。平成 22 年度は新たに 2 例の胆汁酸代謝異常症（3-oxo- $\Delta^4$ -steroid 5 $\beta$ -reductase 欠損症 1 例、oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症 1 例）を発見し、現在治療および経過観察中である。

平成 23 年度は、さらに胆汁酸代謝異常症の発見に努め本診断法および治療法を確立したい。

A. 研究目的

本研究の目的は、遺伝性胆汁うっ滞性疾患である胆汁酸代謝異常症を早期発見し治療することにより肝移植を回避し QOL を高めることである。

B. 研究方法

1. 生体試料採取：すでに我々が明らかにしたように、胆汁酸代謝異常症の場合（現在 7 種類存在し、それぞれに特異的な異常胆汁酸を検出する）尿中に異常胆汁酸が多量に排泄されることより、原因不明の新生児・乳児期の胆汁うっ滞症

を経験し胆汁酸代謝異常症を疑う所見（後述）がみられるならば、その症例の尿を採取し胆汁酸分析を行う。

2. 胆汁酸分析法：尿中胆汁酸を全て遊離型にし（脱アミノ酸および脱硫酸抱合）、それをシリル化、さらに TMS 化し GC-MS を用いて分析定量（SIM 法）した。個々の胆汁酸の標品は、シグマ製品および北海道医療大学薬学部で合成された物を使用した。
3. 検査結果の検討：原因不明の新生児・乳児期胆汁うっ滞症の生化学

検査より、以前から報告されている胆汁酸代謝異常症に特徴とされる血清 $\gamma$ -GTP および総胆汁酸値が低値あるいは正常範囲であることを確認する。

4. 一次胆汁酸療法：一次胆汁酸である cholic acid (CA) あるいは chenodeoxycholic acid (CDCA) を用いて FXR を介して cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (*CYP7A1*) に negative feedback をかけ異常胆汁酸の生成を抑制する。異常胆汁酸は肝硬変への進展を促進すると考えられている。
5. 遺伝子検索：臨床的（生化学検査および胆汁酸分析結果より）に胆汁酸代謝異常症を強く疑われた症例において血液中のリンパ球より genomic DNA を採取し、これより遺伝子検索を行った。
6. 倫理面の配慮：久留米大学倫理委員会に「胆汁酸代謝および分泌機構に関する遺伝子研究（研究番号 43）」を審査していただき評価・承認された後に本研究をスタートさせた。また、家族へ本研究に対しての不利益、危険性についても十分に説明し同意を得た。

上記1-5について検討した。

### C. 研究結果

昨年度、我々の胆汁酸分析システム

（十年前より原因不明の新生児・乳児期胆汁うっ滞症の尿中胆汁酸分析を行ってきた。これが浸透し全国より分析依頼が行われるようになり、年間20-40例の胆汁酸分析を行っている）により、本年度は2例の胆汁酸代謝異常症疑い例を経験した。2例とも従来の報告と同様血清 $\gamma$ -GTP と血清総胆汁酸値は正常値を示した。

#### <症例1>

6ヶ月女児、遷延性黄疸の精査で、T-Bil/D-Bil 6.3/3.6 mg/dL、AST/ALT 315/229 U/L、 $\gamma$ -GTP 61 U/L、TBA 5.2  $\mu$ mol/L、と胆汁うっ滞型肝障害を認めた。 $\gamma$ -GTP、TBA が正常値のため胆汁酸代謝異常症を疑い、GC-MS を用いて尿中胆汁酸分析を行った。その結果 3-oxo- $\Delta^4$ -bile acids を多量に検出し 3-oxo- $\Delta^4$ -steroid 5 $\beta$ -reductase 欠損症と診断し、確定診断のために *SRD5B1* の遺伝子検索を行った。解析結果は、患者 G223E/R261C heterozygote、父親 G223E heterozygote、母親 R261C heterozygote であった（図1）。

診断後 CDCA と UDCA による胆汁酸療法を行っている。胆汁うっ滞は徐々に改善しているが肝機能の改善には時間がかかりそうである。検査所見では肝硬変の進展は見られていない。

#### <症例2>

6ヶ月女児、遷延性黄疸、肝脾腫の精

査目的で肝機能検査を行った。T-Bil/D-Bil 13.1/7.7 mg/dL、AST/ALT 803/345 U/L、 $\gamma$ -GTP 36 U/L、TBA 6.5  $\mu$ mol/L、と胆汁うっ滞型肝障害を認めた。 $\gamma$ -GTP、TBA が正常値のため胆汁酸代謝異常症を疑い、GC-MS を用いて尿中胆汁酸分析を行った。その結果、 $3\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$  bile acids を多量に検出し oxysterol  $7\alpha$ -hydroxylase 欠損症と診断した。確定診断のため *CYP7B1* の遺伝子検索を行った。解析結果は、患者 R112X/R417C heterozygote、父親 R112X heterozygote、母親 R417C heterozygote であった (図 2)。

UDCA で加療するも肝不全へ進行したため、8ヶ月時に母親をドナーとして生体肝移植を行った。移植後の経過は良好で肝障害はなく成長発達も順調である。

#### D. 考察

一般的に新生児・乳児期の胆汁うっ滞症は、黄疸、白色便で気付かれ肝機能検査が施行される。その結果、血清  $\gamma$ -GTP および総胆汁酸値が高値を示す。しかしながら、本胆汁酸代謝異常症は、血清  $\gamma$ -GTP および総胆汁酸値は低値もしくは正常値を示す。今回診断した2例の症例も同様の結果であり、したがって、この検査所見は大切であり、胆汁酸代謝異常症を発見する上で

重要と考えられる。ただし、血清  $\gamma$ -GTP の低値は進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC) でもみられ注意を要する場合もある。PFIC 場合総胆汁酸値が高値を示すので診断の手助けとなる。

現在まで胆汁酸代謝異常症は大きく分類すると7種類報告されている。その中で、少なくとも5種類 ( $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/iaomerase 欠損症、3-oxo- $\Delta^4$ -steroid  $5\beta$ -reductase 欠損症、oxysterol  $7\alpha$ -hydroxylase 欠損症、Zellweger 症候群、Smith-Lemli-Opitz 症候群) は尿中胆汁酸分析で疾患特異的な異常胆汁酸を検出し診断可能である。したがって、我々の分析方法は有用と考える。

一次胆汁酸療法は欧米の文献では、CA 療法が主体である。CA を用いた方が CDCA より肝毒性が少ないため有用であるが、残念なことに本邦では CA 製剤は生産されていない。しかし、CDCA は本邦で治療薬として手に入り、CA よりも肝毒性は強いが *CYP7A1* への胆汁酸生合成に関する negative feedback 機構は CA よりも効果的である。したがって、効果は十分期待出来る。事実我々の症例でも肝機能の改善をみている。したがって、肝障害が長期間持続し進行 (繊維化の進行がみられる場合) していなければ

CDCA の使用は可能である。

しかしながら、3-oxo- $\Delta^4$ -steroid 5 $\beta$ -reductase 欠損症への CDCA を用いた 1 次胆汁酸療法は 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/isomerase 欠損症に使用した場合のように劇的な効果はなく、肝障害の程度を評価しながら注意して使用する必要がある。ただし、多症例の使用経験が未だないため治療効果の評価は慎重にする必要がある。

また、oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症 (CYP7A1 への胆汁酸生合成に関する negative feedback 機構が本疾患の代謝経路 acidic pathway には働かない) に対する 1 次胆汁酸療法は効果がなく現在のところ肝移植のみが有効と考えられる。

遺伝子診断は、遺伝子の大きさにより時間やコストがかかるが診断的価値が高い。現在は我々の施設で行っているが継続的に出来るか心配である。簡便などどこでも出来る検査方法の確率が望まれる。

## E. 結論

胆汁酸代謝異常症の診断は、生化学検査 (血清 $\gamma$ -GTP および総胆汁酸値は低値もしくは正常値) により本症と気付く事が最も重要である。次に速やかに尿中胆汁酸分析を行い、その結果本症

の疑いがあれば直ちに一次胆汁酸療法を開始することを勧める。また、同時に遺伝子検索を行うべきである。

ただし、oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症には 1 次胆汁酸療法は期待出来ない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 木村昭彦. 胆汁酸合成異常症. 小児科臨床ピクシス 2010;23:222-5.
- (2) 水落建輝, 木村昭彦. 胆汁酸代謝異常症-診断へのアプローチと 1 次胆汁酸療法-. 小児科臨床 2010;63:2081-7.
- (3) Nishiura H, Kimura A, Yamato Y, Aoki K, Kurosawa T, Marsuishi T. Developmental pattern of urinary bile acid profile in preterm infants. *Pediatr Int* 2010;52:44-50.
- (4) Kimura A, Kage M, Nagata I, Mushiake S, Ohura T, Tazawa Y, Maisawa S, Tomomasa T, Abukawa D, Okano Y, Sumazaki R, Takayanagi M, Tamamori A, Yorifuji T, Yamato Y, Maeda K, Matsushita M, Matsuishi T, Tanigawa K, Kobayashi K, Saheki T. Histological findings in the liver of patients with intrahepatic cholestasis caused

by citrin deficiency.

Hepatol Res 2010;40:295-303.

- (5) Mizuochi T, Kimura A, Ueki I, Takahashi T, Hashimoto T, Takao A, Seki Y, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Matsuishi T. Molecular genetic and bile acid profiles in two Japanese patients with  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/isomerase deficiency. Pediatr Res 2010;68:258-63.

## 2. 学会発表

- (1) 木村昭彦. 臨床症状と肝機能検査. プレコングレスセミナー2「胆汁酸代謝異常症と関連疾患」第37回日本小児栄養消化器肝臓学会 2010.10,8-10 (香川)
- (2) 水落建輝, 関祥孝, 西浦博史, 植木勲, 牛島高介, 木村昭彦, 松石豊次郎, 武井一, 入戸野博. 新生児肝炎の鑑別診断としての胆汁酸代謝異常症-本邦における診断法の確率-. 第113回日本小児科学会総会 2010.4.23-25 (岩手)
- (3) 関祥孝, 水落建輝, 西浦博史, 牛島高介, 大竹明, 武井一, 入戸野博, 木村昭彦, 新規  $5\beta$ -reductase 欠損症2例の遺伝子解析と臨床像. 第37回日本小児栄養消化器肝臓

学会 2010.10,8-10 (香川)

- (4) 水落建輝, 関祥孝, 橋本卓史, 鷹尾明, 武井一, 入戸野博, 木村昭彦. 胆汁酸代謝異常症に対する経口ケノデオキシコール酸療法. 第52回日本先天代謝異常学会 2010.10.21-23 (大阪)
- (5) 水落建輝, 関祥孝, 植木勲, 木村昭彦, 松石豊次郎. 胆汁酸代謝異常症の遺伝子解析と診断法の確率. 第63回九州小児科学会 2010.11.13-14 (鹿児島)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

图 1

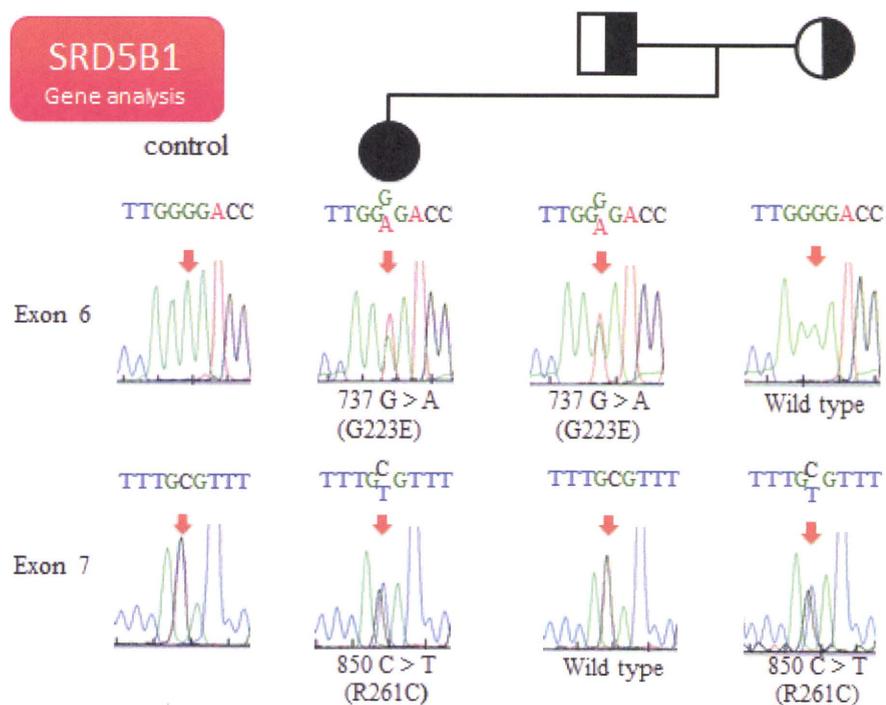
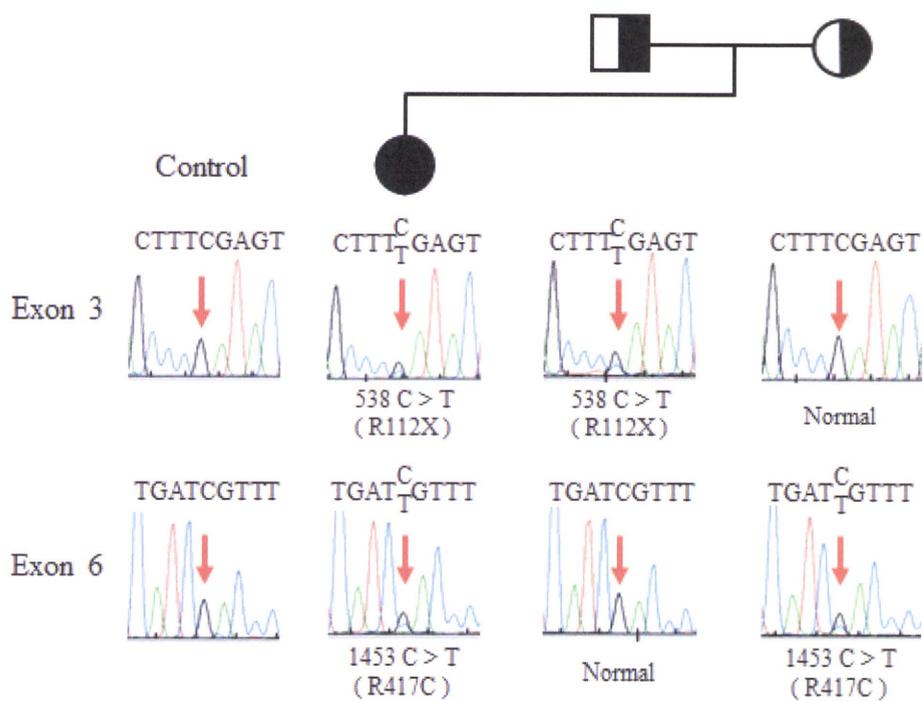


图 2



厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症の診断法と分子病理の究明

研究協力者 村山 圭 千葉県こども病院代謝科

#### 研究要旨

乳児の黄疸をきたす疾患の 1 つとして、ミトコンドリア肝症が挙げられる。中でも、肝不全をきたすようなミトコンドリア DNA 枯渇症候群の実体は、本邦において全く明らかになっていなかった。その最大の理由は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症の診断が、困難なためである。特に小児のミトコンドリア病は核 DNA の異常が非常に多く、従来行なわれてきたミトコンドリア DNA の解析や病理組織診断では限界がある。本研究では呼吸鎖酵素活性の測定と Blue Native 電気泳動によるタンパク質レベルの解析を組み合わせて、ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症を正確かつ迅速に診断し、中でもミトコンドリア肝症の発生頻度や、責任遺伝子などの分子病理を明らかにしていく。

#### A. 研究目的

本研究では呼吸鎖酵素活性の測定と Blue Native 電気泳動によるタンパク質レベルの解析を組み合わせて、ミトコンドリア呼吸鎖複合体異常症を正確かつ迅速に診断し、中でもミトコンドリア肝症の発生頻度や、責任遺伝子などの分子病理を明らかにしていくことを目的とする。

#### B. 研究対象

本研究で我々が対象とした症例は、Bernier らのミトコンドリア呼吸鎖異常症の診断基準において“可能性例 (possible)”以上の基準を満たした、本邦の症例である。臨床症状は、新生児

期致死性高乳酸血症から急性脳症、思春期の軽い筋緊張低下や食欲不振までにわたり非常に幅広い。大部分が原因不明の高乳酸血症症例であるが、一部は高乳酸血症を呈さずに多臓器にまたがる症状を呈したことからミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) を疑われた症例も含む。半数以上の症例が、新生児期から1歳までに発病していた。約4分の3の症例が、先天性高乳酸血症や何かのミトコンドリア異常症と臨床診断されていた。男女比はほぼ同等であった。

### C. 研究方法

試料は、組織については $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存された肝や筋肉の一片をホモジナイズし、600Gにて遠心後の上清を用いた。また皮膚線維芽細胞については、ミトコンドリア分画を単離したあと、界面活性剤であるドデシルマルトシドまたは Triton X によって可溶化し行った。酵素活性は分光光度計を用い、光化学的に呼吸鎖 I, II, III, IV 及び対象としてクエン酸合成酵素 (Citrate Synthase; CS) を測定した。呼吸鎖酵素活性は CS 及び Complex II との相対比で表し、対照 12 人の平均に対する%で示した。

Blue-native PAGE 解析は 4~13% 濃度勾配ゲルを用いて展開し、イムノブロット法を用いて呼吸鎖複合体の量と大きさを解析した。呼吸鎖複合体に対する各種モノクローナル抗体を用いて行った。さらに酵素活性にて有意な低下を示した症例に対しては、ミトコンドリア DNA (mtDNA) の枯渇があるか否か調べる目的で、mtDNA の比較定量 (Quantitative PCR ; qPCR) を施行した。精製 DNA を用いミトコンドリア (呼吸鎖 I-ND4 サブユニット) と核 (腓のう胞性線維症遺伝子エクソン 24) の DNA を real time PCR で増幅しその量比を正常コントロールに対する%で表した。qPCRにて mtDNA が正常コントロー

ルの 35%以下である<sup>3)</sup>ミトコンドリア DNA 枯渇症候群 (MDS) と診断された症例に対し、肝型 MDS の責任遺伝子の解析を行った。

### D. 研究結果

平成 22 年 12 月末現在、日本全国の臨床医 (主に小児科医) のご協力により、合計 351 症例から 511 検体 (皮膚線維芽細胞 196 検体、肝臓 137 検体、筋肉 124 検体、心臓 41 検体、その他腎臓・脾臓など 13 検体) のご提供を頂いた。これまでに 131 症例 (41%) を MRCD と診断した。この 131 例の中で、肝障害が前面に出てくるミトコンドリア肝症は 21 例 (16%) であった。

また、特に肝不全を起こすタイプは、ミトコンドリア DNA が減少することによって起こる「ミトコンドリア DNA 枯渇症候群 (mtDNA depletion syndrome)」として世界的に知られており、我々が診断した 21 例中に 13 症例含まれてることが判明した。そのうち 6 例は責任遺伝子の遺伝子確定まで終了しており (*POLG*; 1 例, *MPV17*; 2 例, *DGUOK*; 3 例)、各施設との共同論文という形で現在作成している (文献 1 は *MPV17* 遺伝子異常の症例報告である)。

### E. 考察及び今後の展望

ミトコンドリア肝症は MRCD において、16% 占める見過ごせない疾患であ

る。また診断に至ったミトコンドリア肝症の21例中13例は、ミトコンドリアDNA枯渴症候群であった。その多くは乳児期に発症しており、乳児胆汁うっ滞性肝障害の一因となることが明らかになった。ミトコンドリアDNA枯渴症候群の症例の多くは幼児期までに死亡しており、本症の予後の悪さが明らかになった。遺伝子診断も6例確定できたが、そのうちの*DGUOK*の遺伝子欠失(*DGUOK* c.143-308\_169del335)は、地域の異なる2家系から認められており、日本人におけるcommon mutationの可能性が示唆された。今後のさらなる蓄積が重要である。

論文(1)のように、ミトコンドリア肝症に対して、酵素欠損に応じた治療を行っていくことは、重要な治療戦略である。MRCDの分子病理の解明こそ治療に直結してくるものと思われる。

現在、埼玉医科大学との共同プロジェクトで、次世代シーケンサーを用いた網羅的なMRCD責任遺伝子解析を行っており、その結果が多いに期待される場所である。また、引き続き症例を正確かつ迅速に生化学診断していくことで、日本におけるMRCDの頻度や特徴、遺伝的背景にせまれる事はもとより、今後発展がさらなる治療への足がかりになっていくものと確信している。

## F.研究発表

### 1.論文発表

- (1) Kaji S, Murayama K, Nagata I, et al: Fluctuating liver functions in siblings with MPV17 mutations and possible improvement associated with dietary and pharmaceutical treatments targeting respiratory chain complex I. *Mol Genet Metab* 97: 292-296, 2009
- (2) Komaki H, Nishigaki Y, Fuku N, Hosoya H, Murayama K, Ohtake A, Goto Y, Wakamoto H, Koga Y, Tanaka M : Pyruvate therapy for Leigh syndrome due to cytochrome c oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta.* 1800(3) 313-315,2010
- (3) 村山 圭、森 雅人、大竹 明 . ミトコンドリア病(ミトコンドリア呼吸鎖異常症)ー最も頻度の高い先天代謝異常症ー 小児科臨床 63(10) 2071-2079 2010
- (4) 村山 圭. 先天性尿素サイクル異常症ーオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、アルギニノコハク酸尿症、アルギニン血症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 13 495-500 2010
- (5) 村山 圭. 周産期救急疾患への対応ー妊産婦・新生児死亡を防ぐため

に—新生児救急疾患 高アンモニア血症への対応.

周産期医学40 947-951 2010

(6) 村山 圭. 先天代謝異常症を見逃さない〈診断へのアプローチ—first line検査〉高アンモニア血症

小児内科 42 1097-1101 2010

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
木村昭彦	胆汁酸合成異常症	五十嵐 隆 高柳 正樹	小児科臨床ピクシス	中山書店	東京	2010	222-225
村山 圭	乳幼児突然死症候群	五十嵐 隆 高柳 正樹	小児科臨床ピクシス23	中山書店	東京	2010	57-59
村山 圭	ミトコンドリアレスキュー	五十嵐 隆 高柳 正樹	小児科臨床ピクシス23	中山書店	東京	2010	186-187
大竹 明 村山 圭	ミトコンドリア呼吸鎖異常症	五十嵐 隆 高柳 正樹	小児科臨床ピクシス23	中山書店	東京	2010	210-213

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版
須磨崎 亮	【肝内胆管、胆道、膵の腫瘍分類 WHOの新たな試みを含めて】肝内胆管、胆道、膵 共通の視点に立った腫瘍発生発生の観点から	肝・胆・膵	62(1)	7-15	2011
須磨崎亮、乾あやの、位田忍、長田郁夫、松井陽、虫明聡太郎	小児急性肝不全	小児科	52(1)	43-52	2011
須磨崎 亮、岩淵 敦	【肝・胆道系疾患を含めて 肝臓編(上)】肝内胆汁っ滞症Aagenase症候群	日本臨床 別冊肝・胆道系症候群 I		373-375	2010
Kimura A, Kage M, Nagata I, Mushiake S, Ohura T, Tazawa Y, Maisawa S, Tomomasa T, Abukawa D, Okano Y, Sumazaki R, Takayanagi M, Tamamori A, Yorifuji T, Yamato Y, Maeda K, Matsushita M, Matsuishi T, Tanikawa K, Kobayashi K, Saheki T	Histological findings in the livers of patients with neonatal intrahepatic cholestasis caused by citrin deficiency.	Hepatology Research	40(3)	295-303	2010

Tajiri T, Yoshida H, Obara K, Onji M, Kage M, Kitano S, Kokudo N, Kokubu S, Sakaida I, Sata M, Tajiri H, Tsukada K, Nonami T, Hashizume M, Hirota S, Murashima N, Moriyasu F, Saigenji K, Makuuchi H, Oho K, Yoshida T, Suzuki H, Hasumi A, Okita K, Futagawa S, Idezuki Y.	General rules for recording endoscopic findings of esophago-gastric varices. (2nd edition)	Digestive Endosc.	22(1)	1-9	2010
Karino Y, Toyota J, Kumada H, Katano Y, Izumi N, Kobashi H, Sata M, Moriyama M, Imazeki F, Kage M, Ishikawa H, Masaki N, Seriu T, Omata M.	Efficacy and resistance of entecavir following 3 years of treatment of Japanese patients with lamivudine-refractory chronic hepatitis B.	Hepatol Int.	4(1)	414-422	2010
Haratake J, Aishima S, Masuda T, Aoyama H, Miyawaka-Hayashi no A, Matsumoto T, Sanefuji H, Ojima H, Chen T, Yu E, Kim J, Park N, Tsui W, Nakanuma Y, Zen Y, Harada K, Sasaki M, Nomura A, Uehara T, Sano K, Kondo F, Fukusato T, Tsuneyama K, Ito M, Wakasa K, Nomoto M, Minato H, Haga H, Kage M, Yano H,	Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens: interobserver agreement.	Pathology International.	60(3)	167-174	2010
Morinaga A, Ogata T, Kage M, Kinoshita H, Aoyagi S	Comparison of liver regeneration after a splenectomy and splenic artery ligation in a dimethylnitrosamine-induced cirrhotic rat model.	HPB	12(1)	22-30	2010
谷川 健、鹿毛 政義	乳児期肝内胆汁うっ滞症、小児期肝内胆汁うっ滞症	別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ	13号	443-447	2010
鹿毛 政義、中島 収	特集 急性肝障害-薬物性肝障害とウイルス肝炎 急性肝障害の診断 急性肝障害の病理所見	臨床消化器内科	25巻 11号	1457-1465	2010