

X 幼少期の肝疾患

小児非症候性肝内胆管減少症

Nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts in children

Key words: 黄疸, 皮膚そう痒, サイトメガロウイルス, 肝内胆汁うっ滞

十河 剛
乾 あやの

1. 概念・定義

肝内胆管減少症 (paucity of interlobular bile ducts: PIBD) は小葉間胆管の減少があるが、肝外胆管の閉鎖のないものとされる¹⁾。病理学的には少なくとも5個以上の門脈域を検索し、小葉間胆管数/門脈数比が0.5以下(正常0.9-1.8)とされるが²⁾、報告によりその病理学的な定義は様々である³⁻⁵⁾。

PIBDの中には特異的顔貌、心血管奇形、後部胎生環、椎骨癒合不全などの肝外合併症をもつ症候性 (Alagille 症候群) のグループと特徴的な肝外病変のない非症候性のグループに分類される。

本稿では非症候性 (nonsyndromic) PIBD (NS-PIBD) について述べる。

2. 疫 学

NS-PIBDの多くは新生児期から乳児期早期に黄疸で発症し、胆道閉鎖症との鑑別が問題となる^{2,3-5)}。乳児期以降に発症する症例もみられる⁶⁾。嚢胞線維症や $\alpha 1$ -antitrypsin欠損症など、我が国ではまれな疾患が原因で発症することもあるが、特発性のものもあり、様々な原因があるため発症頻度は明らかではない。直接型優位の高ビリルビン血症もしくはいわゆる‘新生児肝炎’の5.6-15.6%はNS-PIBDと報告されている¹⁾。また、Alagilleら⁷⁾はPIBDの60%が症候性であり、40%がNS-PIBDと報告している。Kahn¹⁾は生後28日未満発症の直接型高ビリルビン血症の最も頻度の高い病態はNS-PIBDとしており、非閉塞性直接型高ビリルビン血症

33例中22例がNS-PIBDであったと報告している。

一般的に発症頻度に男女差はないとされる³⁻⁵⁾。家族歴として、同様の疾患を認めたり、肝疾患や胆汁うっ滞症がみられたりすることが多い^{4,5)}。また、血族結婚を認めることが多いとの報告もある⁴⁾。出生歴ではKahnら³⁾は17人中16人がいわゆる未熟児であったと報告しているが、その他の報告では必ずしも低出生体重児、早産児、small for date (SFD) 児が多いということはない^{4,5)}。

3. 病 因

本症における肝内胆管の減少の機序は不明である。原因となる疾患としては、嚢胞線維症 (cystic fibrosis)、 $\alpha 1$ -antitrypsin欠損症、Niemann-Pick type C、ミトコンドリアDNA枯渇症候群、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (progressive familial intrahepatic cholestasis: PFIC)、ARC (arthrogryposis multiplex congenital, renal dysfunction, and cholestasis) 症候群、21 trisomy、遺伝性疾患や染色体異常などに伴うもの^{3,5)}やサイトメガロウイルス感染症^{3,5,8-10)}、風疹²⁾、梅毒¹¹⁾などの先天性感染に伴うもの、下垂体機能低下症⁵⁾といった内分泌異常に基づくものなどが知られている。しかし、報告により異なるが、原因の特定できない特発性が30-100%を占めるといわれている³⁻⁵⁾。

4. 病 態

胆管減少の機序としては、胆管の発生異常、萎縮、胆管の破壊の3要素が考えられている。

Tsuyoshi Sogo, Ayano Inui: Hepatology and Gastroenterology Group, Children's Center for Health and Development, Saiseikai Yokohama City Tobu Hospital 済生会横浜市東部病院こどもセンター 肝臓消化器グループ

0047-1852/10/¥40/頁/JCOPY

特発性 NS-PIBD では連続した管腔構造のある ductal plate が多く残存していることから, ductal plate の成熟過程の障害である可能性も示唆されている¹⁾。胆管の廃用性萎縮は $\alpha 1$ -antitrypsin 症例においてみられるとされるが, まだ証明されたわけではない。多くの患者では, 子宮内での感染などによる胆管の破壊が胆管減少の原因と考えられている。電子顕微鏡では基底膜の破壊と胆管上皮へのリンパ球浸潤がみられており³⁾, これらは胆管破壊説を支持する所見である。

通常は細胞内から毛細胆管への胆汁の輸送は正常とされる¹⁾。ただし, PFIC による NS-PIBD 例も報告されており⁵⁾, 原因不明例の中には PFIC と診断されていない症例が隠れている可能性はある。

5. 診断と鑑別診断

臨床症状は胆道閉鎖症 (biliary atresia) と NS-PIBD は類似しているが, 胆道閉鎖症では外科的治療が必要となるため, 早急に鑑別が必要である。更に新生児期から胆汁うっ滞をきたす疾患はすべて鑑別にあがる。

a. 臨床症状

臨床症状としては黄疸, 皮膚そう痒, 肝腫大, 褐色尿, 白色便などである。通常, 黄疸は生後 1 週間以内にみられ, 白色便は 3 カ月以内にみられる。しかし, 黄疸発現が遅れる例, 白色便のみみられない例, 間欠的に出現する例もある^{4,5)}。皮膚そう痒はみられないこともあるが, 黄疸は必須である³⁻⁵⁾。黄疸や皮膚そう痒は消失することもあるが, 多くは持続する^{1,4,5)}。

b. 血液検査所見

3mg/dL 以上の直接型高ビリルビン血症がみられる^{1,3,4)}。175mg/dL を超える高コレステロール血症は 11-50% にみられる^{1,3,4)}。トランスアミナーゼ値は上昇するが, その程度は様々である^{1,4)}。アルカリホスファターゼ値や γ -GTP 値はほとんどの症例で上昇するが, 正常例もある^{1,4,5)}。

c. 肝病理組織学的所見

1) 光学顕微鏡所見

肝内胆管減少の基準は, 前述したように正常径の肝動脈を有する門脈域での小葉間胆管数/門脈数比が 0.5 以下の場合をいう²⁾ことが多いが, 報告によりその値は様々である。小児では小葉間胆管数/門脈数比は 0.9-1.8 が正常とされている。在胎 38 週には小葉間胆管数/門脈数比は 0.9 を超えるが, 在胎 38 週未満では 0.9 以下では正常の可能性はある¹²⁾。

肝組織像は生後 3 カ月を境にして異なる^{1,3)}。生後 3 カ月までは, 肝細胞の巨細胞変性が目立ち, 中等度から高度の毛細胆管の胆汁栓や肝細胞内の胆汁色素沈着がみられる。髓外造血や類洞の線維化もみられ, 門脈周囲の肝細胞に銅の蓄積がみられる。中小の門脈域では胆管が減少し, 小葉間胆管数/門脈数比が典型例では 0.2 以下となる^{1,3)}。残存した胆管は核濃縮がみられ, 胆管上皮は密に集簇する。門脈域の炎症細胞浸潤や線維性拡大もみられるが, 限界板は保たれる^{1,3,5)}。

生後 3 カ月を超えると, 小葉内の変化は目立たなくなる^{1,3)}。巨細胞性変性は全体の 1/3 程度の症例にしかみられなくなり, 胆汁栓や胆汁色素沈着がみられても軽度となる。類洞の線維化がみられ, 門脈域は線維性に拡大し, 一部では肝硬変へ進行する^{1,3-5)}。門脈域の炎症細胞浸潤は軽度となる^{1,2)}。経時的に観察すると胆管減少がみられた例でも, みられなくなることがあるが, 胆管病変が patchy に存在する可能性はある^{1,3)}。

小葉間胆管を連続切片で観察すると, 胆管上皮の配列の乱れ, 炎症細胞浸潤, 管腔構造の狭小化, あるいは胆管の減少・消失が分節的に認められ, 一見正常なものと同様に破壊像を示すものが混在している²⁾。

生後 3 カ月以前に生検で NS-PIBD と診断されても, 白色便が持続する場合には再度肝生検を行い, 細胆管の増生がみられた場合には胆道の閉塞性病変を示唆する所見であるので, 胆道閉鎖症を再度鑑別する必要がある¹⁾。ただし, 胆道閉鎖症と NS-PIBD の病変が同時に存在す

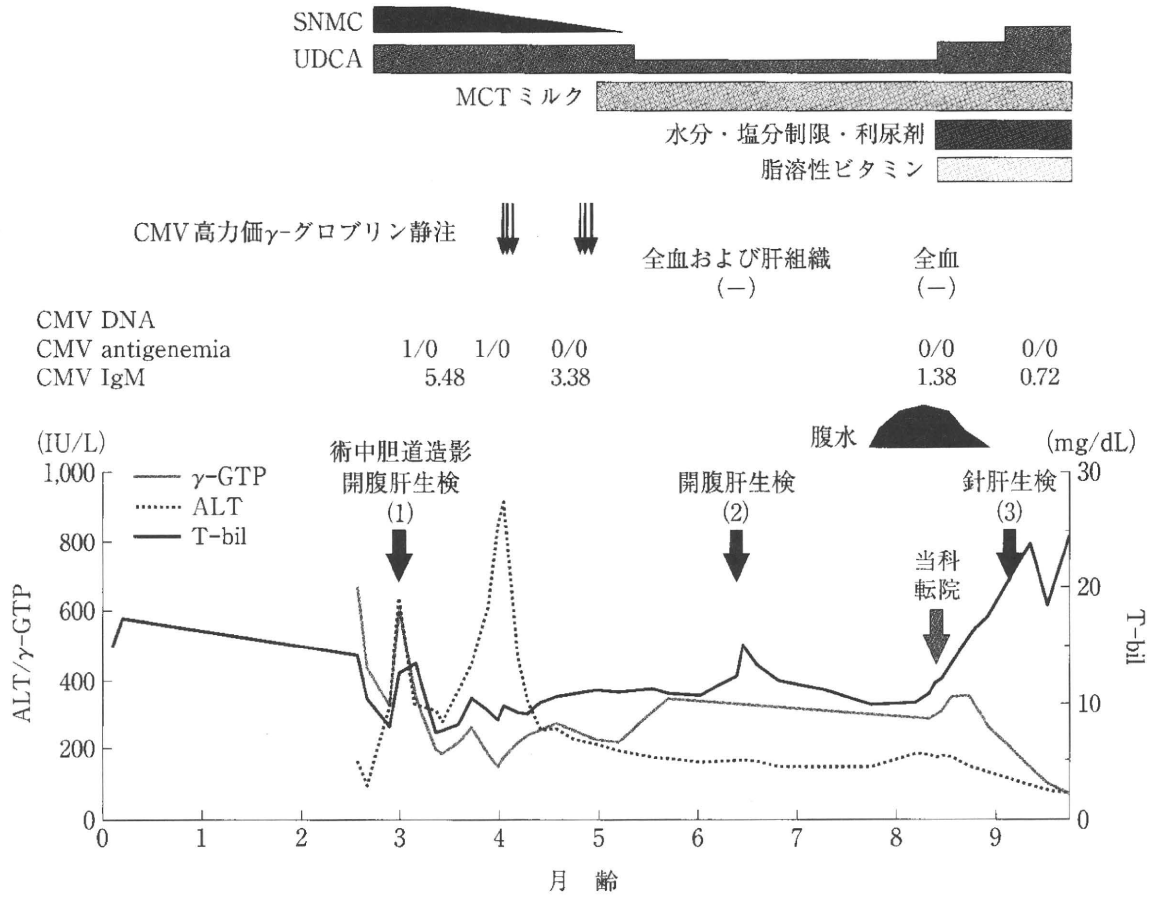


図1 経過表

生後8カ月男児。当初、NS-PIBDと診断されていたが、肝移植時に総胆管が痕跡程度にしか認められず、胆道閉鎖症と診断した。

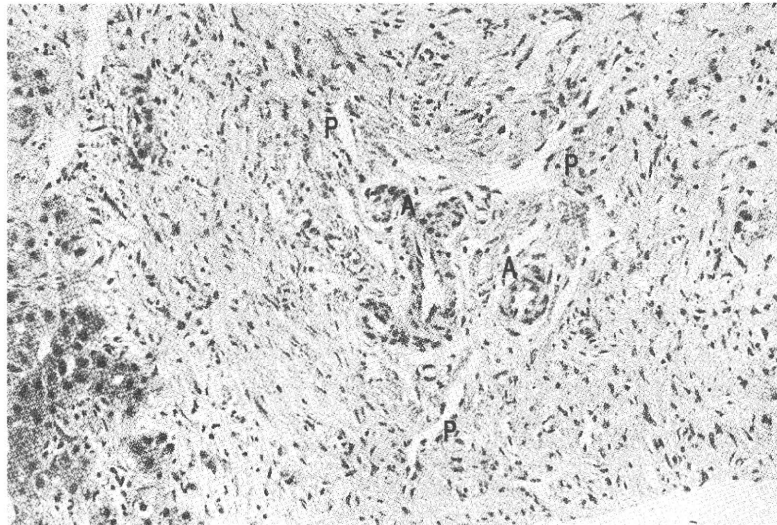


図2 肝組織 (HE 強拡大)

門脈域は線維性に拡大し、小葉間胆管を認めない。細胆管・偽胆管の増生もみられない。

P: 門脈, A: 肝動脈.

る症例もある¹⁾。図1, 2は著者らが経験した生後3カ月時のサイトメガロウイルス血中抗原陽性で胆道造影では総胆管および左右肝管が描出され、生後10カ月時の生体部分肝移植を施行された際の摘出肝では総胆管が痕跡程度にしか認められず、最終的に胆道閉鎖症と診断した症例である。生後9カ月時の針肝生検で得た肝組織では小葉間胆管を認めず(図2)、サイトメガロウイルス感染が関与したNS-PIBDと診断されていた。

2) 電子顕微鏡所見^{1,3)}

肝細胞内には多数のリソソームと電子密度の高い顆粒や層状構造のある封入体がみられ、これらは胆汁もしくは胆汁生成物質と考えられている。毛細胆管は拡張し、微絨毛は減少する。

生後3カ月を過ぎると、肝細胞内のリソソームと封入体は更に増加し、滑面小胞体は、特にフェノバルビタールを投与されている患者では増加する。毛細胆管の変化は生後3カ月を過ぎると軽快するか消失する。

6. 治療と予後

基礎疾患がある場合にはそれに対する治療を行うが、NS-PIBDに対する特異的な治療はなく、胆汁うっ滞による合併症の予防や皮膚そう痒のコントロールが中心となる。高脂血症にはフィブラート系薬剤やHMG-CoA阻害剤、皮膚そう痒にはコレステラミン、フェノバルビタ

ールやリファンピシンを使用することもあるが、その効果は一定ではない。脂質や脂溶性ビタミン吸収障害に対して、中鎖脂肪酸(medium chain triglyceride: MCT)製剤、脂溶性ビタミン(ビタミンA, D, E, K)を投与する。

一般に症候性PIBDと比較して、予後不良とされる。原疾患の有無や家族歴の有無が予後を必ずしも規定しない³⁾。α1-antitrypsin欠損症患者ではNS-PIBDを合併する群と合併しない群とでは合併する群の方が予後不良であり、胆管病変が予後を左右することがわかっている¹⁾。

NS-PIBDの患者の経過は大きく2つに分けられる。30-55%の症例では肝移植を受けるか死亡する³⁻⁵⁾が、全く無症状で、病理学的にも胆管が増加する症例も、特に特発性ではみられる^{4,5,13)}。無症状で経過し、血液検査で肝胆道系酵素の上昇がみられるのみであるにもかかわらず、肝硬変へ進行する家族例も報告されている¹⁴⁾。Brugueraら⁶⁾は、NS-PIBDと成人発症の特発性胆管減少症(idiopathic ductopenia)は臨床的、生化学的、肝組織学的に似かよっており、成人発症の特発性胆管減少症は小児期にみられるNS-PIBDの遅発型ではないかと推測している。

小葉間胆管の蛇行、門脈域のリンパ球浸潤を伴う細胆管の増生および限界板の破壊は予後不良因子である³⁾。

■ 文 献

- 1) Kahn E: Paucity of interlobular bile ducts. Arteriohepatic dysplasia and nonsyndromic duct paucity. *Perspect Pediatr Pathol* 14: 168-215, 1991.
- 2) 岡庭真理子: 小児非症候性肝内胆管閉鎖. 別冊日本臨牀 肝・胆道系症候群 肝臓編(下), p541-543, 日本臨牀社, 1995.
- 3) Kahn E, et al: Nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts: light and electron microscopic evaluation of sequential liver biopsies in early childhood. *Hepatology* 6: 890-901, 1986.
- 4) Koçak N, et al: Nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts: clinical and laboratory findings of 10 cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24: 44-48, 1997.
- 5) Yehezkel-Schildkraut V, et al: Nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts: report of 10 patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 37: 546-549, 2003.
- 6) Bruguera M, et al: Nonsyndromic paucity of intrahepatic bile ducts in infancy and idiopathic ductopenia in adulthood: the same syndrome? *Hepatology* 15: 830-834, 1992.
- 7) Alagille D: Management of paucity of interlobular bile ducts. *J Hepatol* 1: 561-565, 1985.
- 8) Finegold MJ, Carpenter RJ: Obliterative cholangitis due to cytomegalovirus: a possible precursor of paucity of intrahepatic bile ducts. *Hum Pathol* 13: 662-665, 1982.

- 9) Dimmick JE: Intrahepatic bile duct paucity and cytomegalovirus infection. *Pediatr Pathol* 13: 847-852, 1993.
- 10) Kage M, et al: Infantile cholestasis due to cytomegalovirus infection of the liver. A possible cause of paucity of interlobular bile ducts. *Arch Pathol Lab Med* 117: 942-944, 1993.
- 11) Sugiura H, et al: Nonsyndromatic paucity of intrahepatic bile ducts in congenital syphilis. *Acta Pathol Jpn* 38: 1061-1068, 1988.
- 12) Kahn E, et al: Human ontogeny of the bile duct to portal space ratio. *Hepatology* 10: 21-23, 1989.
- 13) Sacher M: Prognosis of nonsyndromic paucity of intrahepatic bile ducts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 7: 303, 1988.
- 14) Pereda T, et al: Hereditary nonsyndromic paucity of intrahepatic bile ducts as an indication for liver transplantation. *Transplant Proc* 35: 719-720, 2003.

XVI その他

巨細胞性肝炎

Giant cell hepatitis

Key words : giant cell transformation, 自己免疫性肝炎, 急性型, 劇症肝炎

乾 あやの
十河 剛
小松陽樹
藤澤知雄

1. 概念・定義¹⁾

巨細胞性肝炎は1950年代に胆道閉鎖症にみられる肝炎の特徴的所見の一つとして‘giant cell transformation’²⁾と報告され、巨細胞は10個以上の核が融合したものと当初定義づけられた³⁾。しかし、その後、胆道閉鎖症以外の様々な新生児から乳児にかけての胆汁うっ滞に伴う肝機能異常においても観察される所見であり、胆道閉鎖症に特異的な所見ではないことが判明した。現在では、4個以上の核が融合した大きな肝細胞で、細胞質は淡い顆粒やリポフスチン、ビリルビン、ヘモジデリンからなる茶褐色の顆粒を含むものとされている。

2. 病 因

巨細胞は、新生児から乳児期早期(infantile)におけるあらゆる肝疾患で認められる。すなわち、巨細胞性変化は非特異的所見であり、その有無で病理学的に確定診断することは困難である。表1に巨細胞性肝炎がみられる疾患を示した。古くは、胆道の構造上の閉鎖がないにもかかわらず、胆道閉鎖症に酷似した症状や検査所見がみられるものをいわゆる‘新生児肝炎’と呼んでいたが、遺伝子診断などの診断技術が進歩し、新たな疾患が独立していった。

一方、‘infantile’期以降は頻度が少なくなるが巨細胞性肝炎は報告されており、post-infantile giant cell hepatitisと呼ばれている。表2に主な病因を示した。post-infantile giant cell hepatitisはinfantile giant cell hepatitisと一部病

因が重複する。

3. 病 態⁵⁾

巨細胞性肝炎の病態については解明されていない。特異な疾患の一過程ではなく、未熟な肝細胞が様々な刺激に対して非特異的に反応している過程と考えられている。巨細胞性変化を生じやすい‘infantile’期は、‘post-infantile’に比して肝細胞の再生能力が高いが、代謝能力は劣る。すなわち、巨細胞性肝炎は、‘post-infantile’特に成人の成熟した代謝システムと細胞骨格をもち、かつ再生能力が減少した環境で出現しにくく、小児期では肝細胞の再生の指標になると考えられる。

巨細胞形成の機序には、2つの説がある。すなわち、肝細胞の無糸分裂によって惹起された結果とする説⁶⁾と細胞の融合の結果とする説⁷⁾である。いずれも20年以上前に提唱されたが、それ以降は様々な考察はなされているが、根本的な進展はない。電子顕微鏡学的所見では巨細胞内に細胞壁はなく、細胞培養ではDNA合成なく巨細胞は形成される。

4. 診断と鑑別診断

具体的に著者らが経験した巨細胞性肝炎を呈した症例を呈示する。

[症例1]

3カ月、胆道閉鎖症。3カ月健診にて、黄疸を指摘され当センターへ紹介となった。胆道シンチにて24時間後も胆汁の排泄がみられず、胆道閉鎖症と診断した。肝組織では、門脈域間に

Ayano Inui, Tsuyoshi Sogo, Haruki Komatsu, Tomoo Fujisawa: Division of Hepatology and Gastroenterology, Children's Center for Health and Development, Saiseikai Yokohamashi Tobu Hospital 済生会横浜市東部病院こどもセンター 肝臓・消化器部門

表1 Infantile giant cell hepatitisの成因(文献⁴⁾より改変)

感染	構造異常
トキソプラズマ	胆道閉鎖
風疹	胆道拡張症
サイトメガロ	新生児硬化性胆管炎
単純ヘルペス	濃縮胆汁症候群
梅毒	胆管消失
6型ヘルペス	Alagille 症候群
水痘	非症候性胆管消失症
B型肝炎	代謝
バルボB19	α_1 アンチトリプシン欠損症
腸管感染ウイルス(エコー, コクサッキー, アデノ)	先天性嚢胞性線維症
染色体異常	ガラクトース血症
18トリソミー	チロジン血症
21トリソミー	遺伝性果糖不耐症
内分泌	シトリン欠損症
下垂体性機能不全	糖原病
甲状腺機能低下	Niemann-Pick 病
自己免疫	進行性家族性肝内胆汁うっ滞症
新生児ループス	Zellweger 症候群
自己免疫性溶血性貧血	

表2 Post-infantile giant cell hepatitisの成因(文献⁵⁾より改変)

感染	薬剤/化学物質
A型肝炎	サリチル酸
B型肝炎	メトトレキサート
C型肝炎	6-メルカプトプリン
EBウイルス	クロルプロマジン
6型ヘルペス	クロメタシン
パラミキソ	塩化ビニル
自己免疫	その他
自己免疫性肝炎	鎌状赤血球症
自己免疫性溶血性貧血	サルコイドーシス
関節リウマチ	リンパ腫
全身性エリテマトーデス	副甲状腺機能低下 肝移植

伸びる架橋形成が著明で一部偽小葉形成がみられ(図1-a), 小葉内には巨細胞が散在していた(図1-b). 葛西手術にて胆汁の流出が得られた.

[症例2]

8歳, 劇症肝炎. 以前から, 'homeopathy' という民間療法の一環で'remedy(植物, 鉱物, 生物が混在)'を服用していた. 発疹から2日目に黄疸がみられ, 第7病日から鼻出血と傾眠傾

向がみられ, 当センターへ紹介入院となった.

入院時検査所見:T-Bil 21.5mg/dL, D-Bil 17.1mg/dL, AST 1,378IU/L, ALT 802IU/L, γ -GTP 43IU/L, PT 27.1%, ヘパプラスチンテスト10%であった. 直ちに, 血漿交換を開始し, 第8病日に施行した肝生検では, 肝細胞の巨細胞性変化が著明であった(図2-a). また, 抗核抗体80倍, 可溶性IL-2レセプター5,201

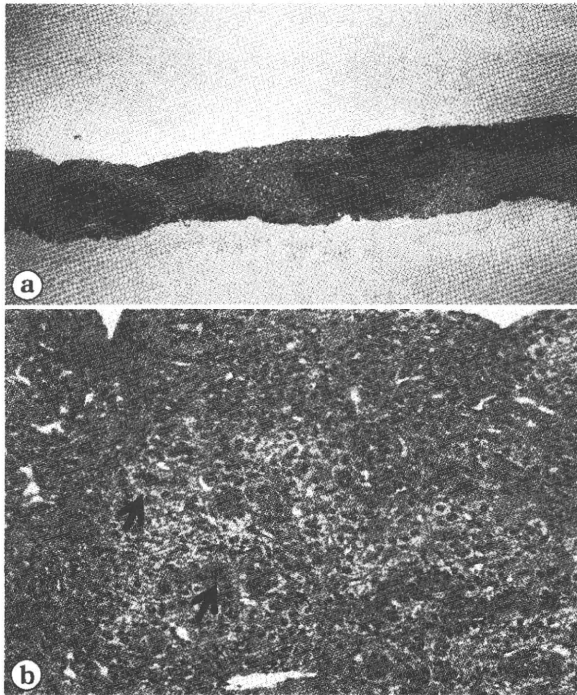


図1 症例1にみられた巨細胞性変化
a: PAS染色×40, b: HE染色×200. 巨細胞性変化(矢印)が散在する.

U/mL, フェリチン 1,907.5 ng/mL, 尿中 β -マイクログロブリン 3,571 μ g/g Crであったため, 高サイトカイン血症が関与し, 重症の自己免疫性肝炎も否定できなかったため, ステロイドパルス療法とシクロスポリンを併用し, 寛解期にはシクロスポリンをアザチオプリンに変更した. その後, 肝機能は正常化し発症後2.5カ月後の肝組織所見では, 巨細胞性変化をわずかに残すまでに改善した(図2-b). 1年後にステロイドとアザチオプリンを終了したが, 再発はない.

5. 治療と予後

前述したとおり, 巨細胞性肝炎の原因は多岐にわたるため, 治療法は一律ではなく原疾患の治療を優先させる.

ただし, 著者らの検討⁹⁾では, 小児期の急性型自己免疫性肝炎では, 病初期では自己抗体の

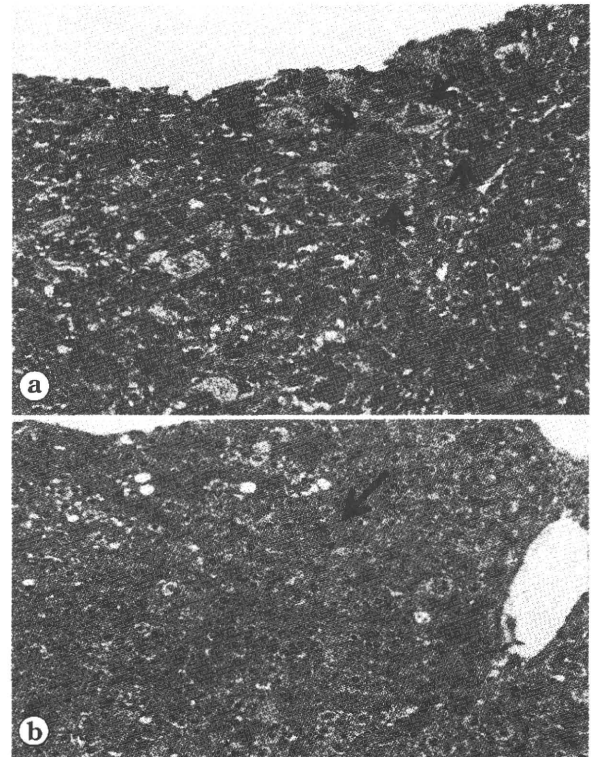


図2 症例2にみられた巨細胞性変化
a: 入院時: HE染色×400. 著明な肝細胞の変性と巨細胞性変化(矢印)を認める.
b: 退院時: HE染色×200. 肝細胞の変性は改善し, 巨細胞性変化(矢印)が極わずかに残存する.

出現率が低く, かつ血清IgG値も高値でないが, 肝組織における巨細胞性変化が約60%にみられた. この特徴は成人における急性型自己免疫性肝炎についても報告されている^{9,10)}. 原因不明の巨細胞性肝炎では, 急性型自己免疫性肝炎を考慮し, 高サイトカイン血症が認められれば, ステロイド, シクロスポリン, アザチオプリンを主体とした治療を考慮すべきである.

予後については繰り返しになるが, 原因が多岐にわたるため不明な点が多い. 原疾患の治療が奏効すれば巨細胞性肝炎も鎮静化することが多い. しかし, 海外からの成人の報告では, 急速に進行し肝移植後も再発する予後不良な一群があり¹¹⁾, 更なる病因の解明が必要である.

■ 文 献

- 1) Montgomery CK, Ruebner BH: Neonatal hepatocellular giant cell transformation: a review. *Perspect Pediatr Pathol* 3: 85-101, 1976.
- 2) Craig JM, Landing BH: A form of hepatitis in the neonatal period stimulating biliary atresia. *Arch Pathol* 54: 321-322, 1952.
- 3) Kasai M, et al: The liver in congenital biliary atresia and neonatal hepatitis: A histopathologic study. *Arch Pathol* 74: 152-162, 1962.
- 4) Kelly D: Neonatal liver disease. In: *Diseases of the Liver and Biliary System in Children*, p57-105, Wiley-Blackwell, West Sussex, 2008.
- 5) Gábor L, et al: Giant cell hepatitis in adults. *Pathol Oncol Res* 3: 215-218, 1997.
- 6) Oledzka-Slotwinska H, Desmet V: Morphologic and cytochemical study on neonatal liver giant cell transformation. *Exp Mol Pathol* 10: 162-175, 1969.
- 7) Thaler H: Post-infantile giant cell hepatitis. *Liver* 2: 393-403, 1982.
- 8) 十河 剛, 藤澤知雄: 小児期の自己免疫性肝炎における肝病理組織学的検討. *日小児会誌* 110: 1558-1564, 2006.
- 9) Devaney K, et al: Postinfantile giant-cell transformation in hepatitis. *Hepatology* 16: 327-333, 1992.
- 10) Iwai M, et al: Comparison of clinical features and liver histology in acute and chronic autoimmune hepatitis. *Hepatol Res* 38: 784-789, 2008.
- 11) Estradas J, et al: Autoimmune hepatitis with giant-cell transformation. *Ann Hepatol* 8: 68-70, 2009.

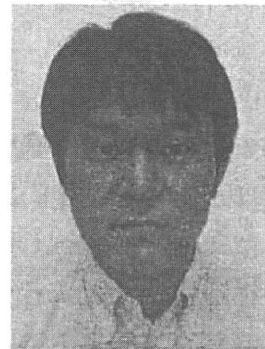
3. 胆汁酸代謝異常症

—診断へのアプローチと1次胆汁酸療法—

久留米大学医学部 小児科 みずおちたつき 水落建輝, きむらあきひこ 木村昭彦



KEY WORDS 胆汁うっ滞
 γ -GTP
 血清総胆汁酸
 胆汁酸分析
 1次胆汁酸療法



Tatsuki Mizuochi

はじめに

胆汁酸は肝臓においてコレステロールより生合成されるステロイドの1群である。胆汁酸代謝異常症は、胆汁酸生合成経路の遺伝性酵素欠損を1次性の病因とするもので、常染色体劣性遺伝形式を示す遺伝性疾患である。中間代謝産物の異常胆汁酸もしくは胆汁アルコールが蓄積する。適切な治療を行わなければ、肝不全へ移行し死亡する。症状は生下時から続く黄疸、肝腫大、灰白色便などで、胆汁うっ滞 (ALT と D.Bil の上昇) を認めるにもかかわらず、血清 γ -GTP と総胆汁酸値が正常な点が特徴である。新生児肝炎や原因不明の乳幼児胆汁うっ滞症と診断されたなかに本疾患が隠れている可能性がある。治療は1次胆汁酸療法か肝移植が行われる。近年、

責任遺伝子が次々と同定され、その異常症は8疾患報告されている¹⁾²⁾。本稿では、乳幼児胆汁うっ滞症の鑑別から本症診断へのアプローチと治療について述べる。

I. 病態と診断

胆汁酸代謝異常症は胆汁酸生合成経路の酵素欠損により、異常胆汁酸もしくは胆汁アルコールが蓄積する。異常胆汁酸は細胞毒性が強く、肝臓を中心とした様々な臓器の障害を引き起こす。異常胆汁酸の蓄積により肝細胞が障害を受け、胆汁うっ滞型肝障害を引き起こし、黄疸、肝腫大、灰白色便 (脂肪便) などの症状が出現し、進行すれば肝不全へ移行する。一方、異常胆汁酸は胆管へ排泄されに

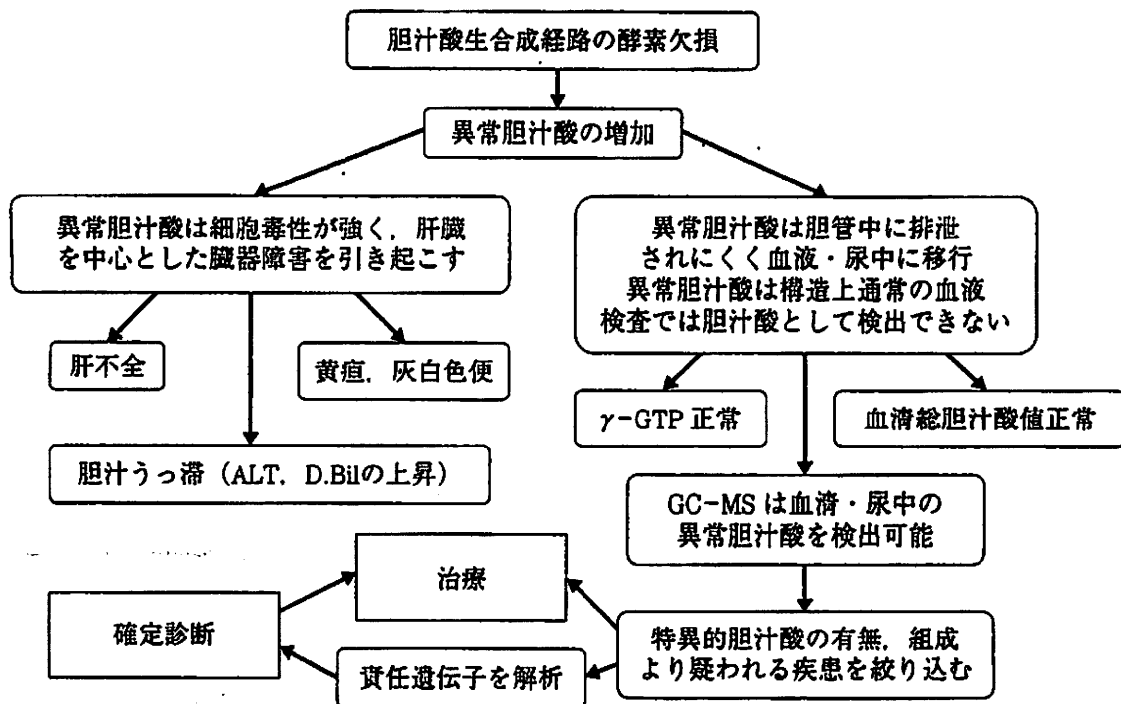


図1 病態・診断のアルゴリズム

くい性質があるため、胆管の逸脱酵素である血清 γ -GTP は正常値を示す。胆管へ排泄されない代わりに血中・尿中へと移行する。また、水酸基の構造変化が起こるため、現在行われている血液検査（測定方法）では胆汁酸として認識されない。よって、血清総胆汁酸値は正常もしくは低値となる。異常胆汁酸の測定には、ガスクロマトグラフィー質量分析法（以下、GC-MS）を用いる。GC-MS は異常胆汁酸とその組成まで識別できる。その結果、胆汁酸代謝異常症の予測が可能である。なお、GC-MS による胆汁酸分析は、血清・尿・胆汁などの検体を用いるが、採取の容易さと異常胆汁酸の排泄量から最も適切なものは尿検体である。胆汁酸分析で各疾患に特異的な異常胆汁酸が検出された場合、疑われる疾患の責任遺伝子を解析し確定診断へ繋げる。以上の病態と診断のアルゴリズムを図1に示す。

II. 胆汁酸代謝異常症

現在、広義の胆汁酸代謝異常症は8疾患報告されている。胆汁酸代謝は細胞内小器官で

あるミトコンドリアやペルオキシゾームも関与しており、その異常症（Zellweger 症候群など）も含まれているため、今回はステロイド骨格の水酸化や酸化還元に関与する酵素欠損により特異的な異常胆汁酸が蓄積する3疾患について述べる。

III. 3β -HSD 欠損症

3β -Hydroxy- Δ^5 - C_{27} -steroid dehydrogenase/isomerase deficiency（以下、 3β -HSD 欠損症）は最も頻度の高い胆汁酸代謝異常症である³⁾。肝不全の進行は比較的緩徐なため、幼児期以降や稀に成人で診断された報告もある⁴⁾。胆汁酸分析で、異常胆汁酸である 3β -hydroxy- Δ^5 -bile acids を多量に検出する。責任遺伝子は *HSD3B7* で⁵⁾、遺伝子診断された報告は本邦では3例（1例は入野らが投稿中）のみである⁶⁾。治療は1次胆汁酸療法が有効であるため、肝移植回避には早期診断・治療が重要である。初期の肝組織像は巨細胞性肝炎像を呈する。したがって、新生児肝炎に類似しているため、新生児肝炎と診断されたなかに本疾患が隠れている

可能性がある。

IV. 5 β -Reductase 欠損症

3-Oxo- Δ^4 -steroid 5 β -reductase deficiency (以下, 5 β -reductase 欠損症) は, 3 β -HSD 欠損症に比べ肝不全への進行は早い。胆汁酸分析で, 異常胆汁酸である 3-oxo- Δ^4 -bile acids を多量に検出する⁷⁾。注意する点は, 3-oxo- Δ^4 -bile acids は他の肝疾患 (肝硬変, 劇症肝炎など) でも検出されることがあるため⁸⁾, 1 次性 (遺伝性) か 2 次性かの鑑別が必要である。特に, 新生児へモクロマトーシスとの鑑別は重要であるが, 異常胆汁酸の程度と遺伝子解析により鑑別は可能である⁹⁾。責任遺伝子は *SRD5B1* である¹⁰⁾。本邦で過去に報告された症例はほとんどが 2 次性であった¹¹⁾。本邦で遺伝子診断された 1 次性の 5 β -reductase 欠損症は, 我々が診断した 4 例 (2 例は論文未発表) のみである⁹⁾。治療は, 1 次胆汁酸療法が有効な例と無効な例がある。無効な際は肝移植が必要である。

V. Oxysterol 7 α 欠損症

Oxysterol 7 α -hydroxylase deficiency (以下, oxysterol 7 α 欠損症) は世界で 2

例の報告しかない。症状は急速に肝不全へと進行する最も重症な胆汁酸代謝異常症である。1 例は我々が報告した台湾人の症例であるが, 肝移植待機中に死亡した¹²⁾。胆汁酸分析で, 異常胆汁酸である 3 β -monohydroxy- Δ^5 -bile acids を多量に検出する。責任遺伝子は *CYP7B1* である¹³⁾。治療は, 1 次胆汁酸療法は無効で, 肝移植のみと考えられている¹³⁾。

VI. 1 次胆汁酸療法

3 β -HSD 欠損症と 5 β -reductase 欠損症に対する経口 1 次胆汁酸療法の有効性が報告されている^{14)~16)}。1 次胆汁酸とはコール酸 (以下, CA) とケノデオキシコール酸 (以下, CDCA) の 2 つである。治療のメカニズムは, 1 次胆汁酸置換により, 胆汁酸生合成を調節する核内受容体である, Farnesoid X Receptor に feed back がかかり, cholesterol 7 α -hydroxylase の活性が抑制され, 結果として異常胆汁酸が減少するためである (図 2-a, b)¹⁶⁾。小児の肝疾患に対しても使用頻度が高い, 3 次胆汁酸であるウルソデオキシコール酸 (以下, UDCA) にはこの作用がない。UDCA は肝細胞への抗炎症および利胆作用があるため一部有効であるが,

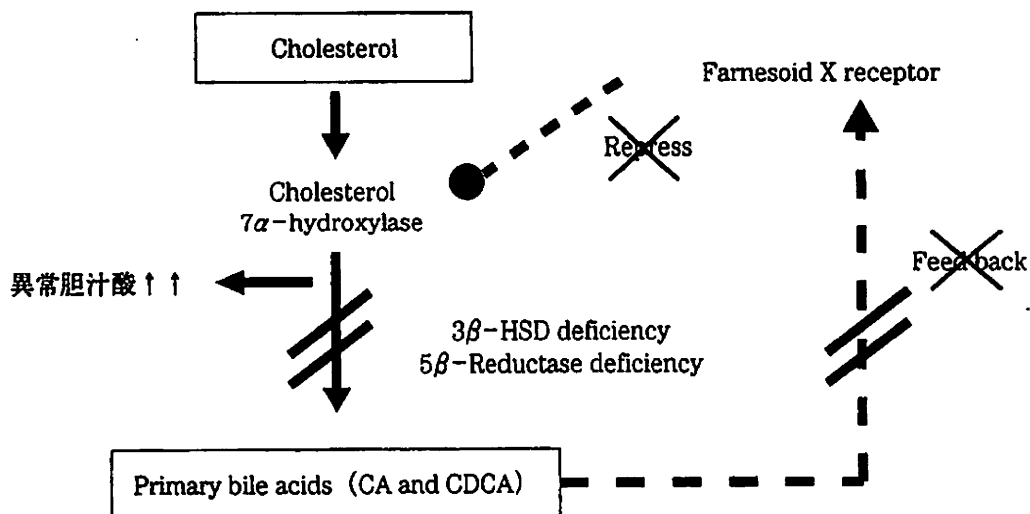


図 2-a 1 次胆汁酸療法のメカニズム (治療前)

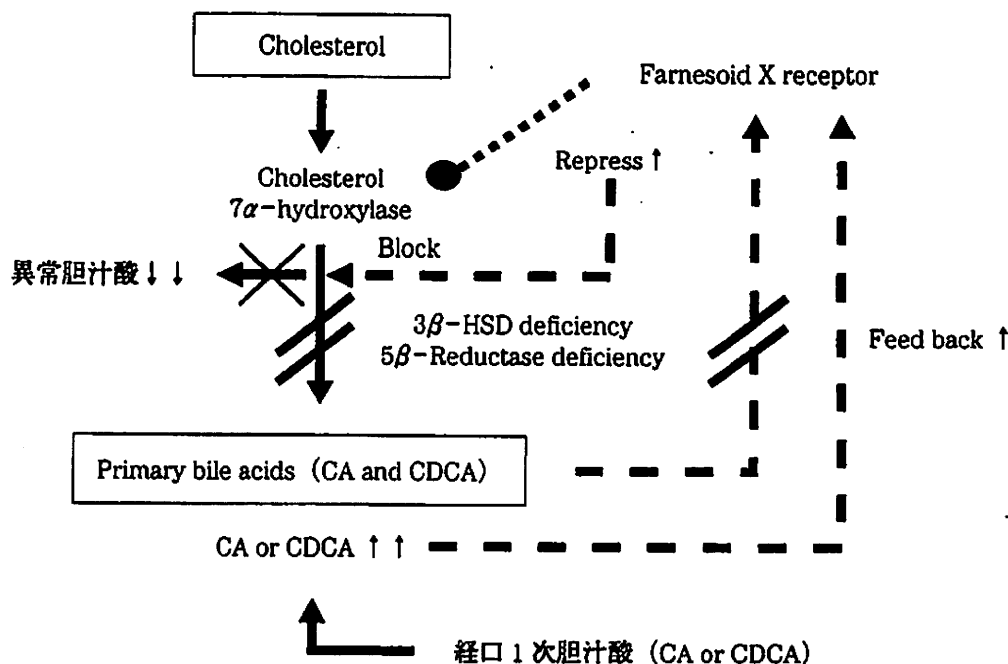


図2-b 1次胆汁酸療法のメカニズム (治療後)

1次胆汁酸置換作用がないため徐々に肝硬変へ進行する¹⁵⁾。欧米ではCA療法が主流であるが¹⁶⁾、日本で現在市販されているのはCDCA製剤のみである。よって、本邦における胆汁酸代謝異常症の治療は、まずは経口CDCA療法を行い、無効ならば肝移植を行う方針となる。我々は、3β-HSD欠損症2例に対し経口CDCA療法を行い、長期的に良好な経過をえている⁶⁾。また、1次性5β-reductase欠損症1例に対しても、短期間であるが現時点で良好な経過をえている(論文未発表)。

VII. 症例

3β-HSD欠損症の1例を示す⁶⁾。

患者：6カ月，男児

主訴：生下時より続く黄疸

家族歴・既往歴：特記すべき所見なし

現病歴：1カ月，3カ月健診時に黄疸の指摘を受けるも，軽度であるため経過観察されていた。6カ月時に遷延性黄疸，肝機能異常の指摘を受け入院。

入院時血液検査：AST/ALT 362/384U/L，

T.Bil/D.Bil 5.2/3.1mg/dL， γ -GTP 33U/L (<58)，総胆汁酸0.7 μ mol/L (<10)，HPT 9% (>70)。

経過(図3)：胆汁うっ滞型肝障害の精査を行うも原因不明。本児を担当した小児肝臓病の専門医が，血液検査の特徴的な所見から胆汁酸代謝異常症を鑑別に挙げ，尿中胆汁酸分析を依頼しUDCAで治療を開始した。尿中胆汁酸分析で3β-hydroxy- Δ^5 -bile acidsを多量に検出し，3β-HSD欠損症が疑われたためHSD3B7遺伝子解析を行った。複合ヘテロ変異を認め，3β-HSD欠損症の確定診断となった。UDCAで肝機能はある程度改善したが完全に正常化せず，また，尿中異常胆汁酸(3β-hydroxy- Δ^5 -bile acids)の低下も十分でなかった。確定診断後，治療をCDCAに変更したところ，肝機能の正常化と尿中異常胆汁酸(3β-hydroxy- Δ^5 -bile acids)のさらなる低下を認めた。患児は現在2歳でCDCA開始後1年以上経過したが，肝機能および成長・発達に異常なく元気に過ごしている。

本症例のポイント：原因不明の乳児胆汁う

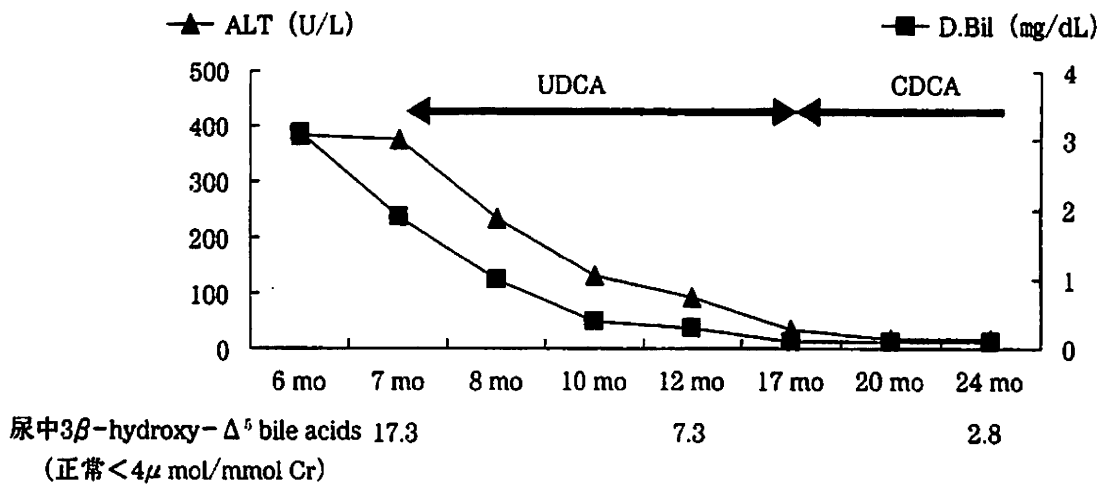


図3 経過

つ滞型肝障害で紹介になった病院で、担当した医師が小児肝臓病を専門としており、血液検査から胆汁酸代謝異常症を早期に疑った点である。このように、本疾患を知っていれば血液検査でかなり疑うことができるが、知らなければ、胆汁酸分析や1次胆汁酸療法を行わず、徐々に肝硬変へ進行した可能性が高い。GC-MSによる胆汁酸分析という、特殊な検査を行わなければ診断へたどり着けない疾患であるが、臨床症状と一般的な血液検査で強く疑うことはできるため、胆汁うっ滞を認める小児を診た際は、必ず血清γ-GTPと総胆汁酸値を確認すべきである。

VIII. まとめ

乳幼児期の胆汁うっ滞症を診る機会は、小児科医にとって決して稀ではない。乳児早期であれば、胆道閉鎖症、新生児肝炎、ウイルス性肝炎、代謝性疾患などを鑑別し検査を進めていく¹⁷⁾。血液検査で胆汁うっ滞を認めた際は必ず、血清γ-GTPと総胆汁酸値を確認することを薦める。γ-GTPと総胆汁酸値はともに上昇していることが多い。γ-GTPが正常で総胆汁酸値が上昇していれば、肝細胞胆管側の胆汁酸トランスポーター異常症である進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(PFIC)などが鑑別に挙がる¹⁷⁾。γ-GTPと総胆汁酸

値がともに正常ならば、胆汁酸代謝異常症を強く疑う。胆汁うっ滞を認めるにもかかわらず、血清総胆汁酸値が正常を示す疾患は、胆汁酸代謝異常症以外まずあり得ない。疑った際は速やかにGC-MSによる胆汁酸分析を行う。現在、GC-MSによる胆汁酸分析を行っている施設は、順伸クリニック胆汁酸研究所である¹⁸⁾。検査の申し込み方法、胆汁酸分析、胆汁酸代謝異常症に関する情報がホームページ上で詳しく解説されているため参照いただきたい(HPアドレス：<http://www8.ocn.ne.jp/~bile-res/index.html>)。胆汁酸分析で特異的な異常胆汁酸が検出され、胆汁酸代謝異常症が疑われた際は、我々の施設(Tel: 0942-31-7565)で遺伝子解析を行っている。胆汁酸代謝異常症は原因不明の乳幼児胆汁うっ滞症の約6%を占める稀な疾患である¹⁸⁾。事実、英文検索しても、遺伝子診断された前述の3疾患は合わせて20例程しかない。しかし、我々は2008年から現在まで2年間で7例(2例は論文未発表)を遺伝子診断した⁶⁾⁹⁾¹²⁾。原因不明の肝硬変(肝不全)で肝移植が行われたり、新生児肝炎としてUDCAで治療されている患者の中に、本疾患が隠れている可能性がある。診断にはGC-MSによる胆汁酸分析が必要なため、血清γ-GTPと総胆汁酸値が正常な胆汁うっ滞症

を診た際は、胆汁酸代謝異常症を疑い一度胆汁酸分析を行うことを薦める。胆汁酸代謝異常症は、そのほとんどが早期診断・治療を行えば経口1次胆汁酸療法による内科的治療が可能な疾患である。診断が遅れたり、無治療であれば、肝硬変・肝不全へ移行し肝移植以外に救命の手段はない。

〰️ おわりに

胆汁うっ滞症の小児を診た際、必ず血清 γ -GTPと総胆汁酸値を検査する。 γ -GTPと総胆汁酸値が正常であった場合、胆汁酸代謝異常症を鑑別に挙げ、GC-MSによる尿中胆汁酸分析を行う。以上2点に留意し、胆汁うっ滞症を診ていただきたい。

本稿を終えるにあたり、胆汁酸代謝異常症の診断・治療にご協力いただいた、東邦大学医療センター大森病院小児科橋本卓史先生、岐阜市民病院小児科鷹尾明先生、埼玉医科大学小児科大竹明先生、国際台湾大学小児科 Huey-Ling Chen 先生、順伸クリニック胆汁酸研究所武井一先生、入戸野博先生、北海道医療大学薬学部黒沢隆夫先生にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Sundaram SS, Bove KE et al : Mechanisms of Disease : inborn errors of bile acid synthesis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5 : 456~468, 2008
- 2) Pullinger CR, Eng C et al : Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest* 110 : 109~117, 2002
- 3) Clayton PT, Leonard JV et al : Familial giant cell hepatitis associated with synthesis of 3 β , 7 α -dihydroxy- and 3 β , 7 α , 12 α -trihydroxy-5-cholenoic acids. *J Clin Invest* 79 : 1031~1038, 1987
- 4) Fischler B, Bodin K et al : Cholestatic liver disease in adults may be due to an inherited defect in bile acid biosynthesis. *J Intern Med* 262 : 254~262, 2007
- 5) Schwarz M, Wright AC et al : Expression cloning of 3 β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇-steroid oxidoreductase gene of bile acid synthesis and its mutation in progressive intrahepatic cholestasis. *J Clin Invest* 106 : 1175~1184, 2000

- 6) Mizuochi T, Kimura A et al : Molecular genetic and bile acid profiles in two Japanese patients with 3 β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇-steroid dehydrogenase/isomerase deficiency. *Pediatr Res* 68 : 258~263, 2010
- 7) Setchell KDR, Suchy FJ et al : Δ^4 -3-Oxosteroid 5 β -reductase deficiency described in identical twin with neonatal hepatitis : a new inborn error in bile acid synthesis. *J Clin Invest* 82 : 2148~2157, 1988
- 8) Kimura A, Suzuki M et al : Urinary 7 α -hydroxy-3-oxochol-4-en-24-oic and 3-oxochol-4,6-dien-24-oic acids in infants with cholestasis. *J Hepatol* 28 : 270~279, 1998
- 9) Ueki I, Kimura A et al : SRD5B1 gene analysis needed for the accurate diagnosis of primary 3-oxo- Δ^4 -steroid 5 β -reductase deficiency. *J Gastroenterol Hepatol* 24 : 776~785, 2009
- 10) Lemonde HA, Custard EJ et al : Mutations in SRD5B1 (AKR1D1), the gene encoding Δ^4 -3-oxosteroid 5 β -reductase, in hepatitis and liver failure in infancy. *Gut* 52 : 1494~1499, 2003
- 11) Sumazaki R, Nakamura N et al : Gene analysis in Δ^4 -3-oxosteroid 5 β -reductase deficiency. *Lancet* 349 : 329, 1997
- 12) Ueki I, Kimura A et al : Neonatal cholestatic liver disease in an Asian patient with a homozygous mutation in the oxysterol 7 α -hydroxylase gene. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46 : 465~469, 2008
- 13) Setchell KDR, Schwarz M et al : Identification of a new inborn error in bile acid synthesis : mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin Invest* 102 : 1690~1703, 1998
- 14) Ichimiya H, Egestad B et al : Bile acids and bile alcohols in a child with hepatic 3 β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇-steroid dehydrogenase deficiency : effects of chenodeoxycholic acid treatment. *J Lipid Res* 32 : 829~841, 1991
- 15) Clayton PT, Wills KA et al : Δ^4 -3-Oxosteroid 5 β -reductase deficiency : failure of ursodeoxycholic acid treatment and response to chenodeoxycholic acid plus cholic acid. *Gut* 38 : 623~628, 1996
- 16) Gonzales E, Gerhardt MF et al : Oral cholic acid for hereditary defects of primary bile acid synthesis : A safe and effective long-term therapy. *Gastroenterology* 137 : 1310~1320, 2009
- 17) 木村昭彦, 水落建輝他 : 乳児胆汁うっ滞症の診断アプローチ : 胆道閉鎖症の早期発見. *日児業消肝誌* 23 : 1~7, 2009

18) Nittono H, Takei H et al : Diagnostic determination system for high-risk screening for inborn errors of bile acid metabolism based on an analysis of urinary bile acids using gas

chromatography-mass spectrometry : Results for 10 years in Japan. *Pediatr Int* 51 : 535~543, 2009

学会案内

第20回 日本描画テスト・描画療法学会のご案内

会 期：2010年10月23日（土）～24日（日）

会 場：香川県民ホール（アルファあなぶきホール）（JR高松駅より徒歩7分）

会 長：石川 元（香川大学医学部附属病院 子どもと家族・こころの診療部教授）

〈ワークショップ〉 10月23日（土）

「描画テストを描画療法に転換する着眼点」 石川 元

「発達障害のパウムテスト」 中島ナオミ

「不登校／発達障害／動的学校画」 加藤孝正・松尾久枝

「ワールテグテストと発達障害／パーソナリティ障害」 入江是清

「描画による解決志向アプローチ」 桐田弘江・浜田友美

「HTPP 入門」 高橋依子

「コラージュ療法に必要な知見と技法」 田中みどり

「家族画による査定と治療を始めるには」 山崎一馬

「失語症と描画テスト・描画療法」 手束邦洋

「PTSD／児童虐待・性虐待への描画によるアプローチ」 田中勝博・白川美也子

軽食セミナー：ADHD の中間表現型としての描画テスト

○20世紀前半からの MBD への中枢刺激薬投与と描画-研究の展望

○ADHD に対する2薬剤使用前後の描画テストと WISC

〈特別講演〉 10月24日（日）

Emmy van Deuzen

ロゴセラピーへの描画などの非言語利用 （通訳：重松加代子）

〈シンポジウム：描画／アートは中間表現型になりうるか〉

Maria Asperger Feder 父ハンスアスペルガーによる治療教育と非言語（予定）

加藤 敏 アスペルガー障害におけるコモンセンスと創造性

石川義博 思春期非行少年の研究と治療

高橋紗都・高橋尚美 アスペルガー症候群とうわわ手帳における非言語体験

横田正夫 精神病における特異性と非特異性：描画は病態の何を反映しているのか

小森康永 緩和治療とアートセラピー

〈特別企画：招聘講演〉 10月23日（土）18時～

綾屋妙月・熊谷晋一郎 アスペルガー症候群当事者と非言語

芳田コウヨウ・芳田葛子 アスペルガー症候群を抱えた画家として

Digby Tantam アスペルガー症候群における非言語の重要性（通訳：重松加代子）

詳細は大会ブログ (<http://blogs.yahoo.co.jp/byouga20th>) をご覧ください。

問い合わせ先：e-mail : byouga20th@ohnishi-hp.or.jp または FAX : 087-843-7195

Original Article

Developmental pattern of urinary bile acid profile in preterm infants

Hiroshi Nishiura,¹ Akihiko Kimura,¹ Yasuhiko Yamato,¹ Kumiko Aoki,² Takahiro Inokuchi,² Takao Kurosawa³ and Toyojiro Matsuishi¹

¹Department of Pediatrics and Child Health and ²Research Institute of Medical Mass Spectrometry, Kurume University School of Medicine, Kurume, Fukuoka and ³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido, Japan

Abstract **Background:** Bile acid metabolism in preterm infants is yet to be fully characterized. We compared the developmental pattern of urinary bile acid profiles in ten infants born at gestational ages from 25 to 33 weeks with previous data from full-term infants from birth to about 7 months of age.

Methods: Gas chromatography–mass spectrometry was performed on serial samples.

Results: Total urinary bile acid concentrations gradually increased until 1 to 2 months of age. After this peak of excretion (30 to 60 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine), total urinary bile acid concentrations gradually decreased to less than 20 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinine. The percentage of usual bile acids (mainly cholic acid) relative to total urinary total bile acids gradually decreased from approximately 30% at birth to less than 15% at 7 months of age. On the other hand, 1 β -hydroxylated bile acids (mainly 1 β ,3 α ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid) relative to total urinary bile acids were increased gradually from 60% at birth to reach 70% to 80% at 1 month of age. The percentage of 1 β -hydroxylated bile acids relative to total urinary bile acids then remained stable at a high percentage (70% to 90%) until the age of 7 months.

Conclusion: Physiological cholestasis in preterm infants persists longer than in full-term infants. Moreover, as large amounts of cholic and 1 β ,3 α ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acids were detected in urine from preterm infants during this study, the 25-hydroxylation pathway may be particularly important for bile acid synthesis in early preterm infants.

Key words bile acid metabolism, developmental pattern, preterm infants.

Details of bile acid metabolism in preterm infants are not fully established. According to the few previous reports concerning fetal bile acid metabolism, the most likely main pathway of bile acid synthesis is the acidic pathway.¹ Bile collected from fetuses during early gestation (weeks 16 to 19) contains 4 β -hydroxylated bile acids.² During the perinatal period 1 β -, 6 α -hydroxylated and/or 3 β -hydroxy- Δ^5 bile acids, which can be detected in adults with liver dysfunction such as cholestasis, are commonly detected in the urine of neonates.^{3,4} Finally, ketonic bile acids are abundant in amniotic fluid late in gestation.⁵

We previously reported bile acid profiles in meconium, feces, amniotic fluid, and urine from preterm and full-term infants,^{6–12} focusing particularly on developmental patterns of urinary 1 β -, 6 α -, and 7 β -hydroxylated and ketonic bile acids in full-term

infants.^{6,7,11} Preterm infants weighing about 1000 g at birth most often have a complication manifesting after birth, such as respiratory distress or congenital heart disease with cyanosis; they then develop prolonged jaundice. Accordingly, we need to understand the details of bile acid metabolism early in the life of preterm infants. Presently we compared the developmental pattern of the urinary bile acids profile between preterm and full-term infants, using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) including monitoring of selected ions.

Methods

Study design

We investigated the urinary bile acid composition in ten preterm infants born at gestational ages between 25 and 33 weeks (Table 1), comparing the results with our previously reported data from full-term infants.^{6,7,11} All subjects were characterized in terms of gender, gestational age, birth weight, APGAR score, mode of nutrition, age when milk intake began, serum total bilirubin concentration at 6 days of age, and diagnosis. No subject had a history or clinical signs of hepatobiliary or gastrointestinal disease. However, all preterm infants had physiological jaundice. They were fed milk via a nasogastric tube, supplemented with parenteral nutrition, during the first few

Correspondence: Akihiko Kimura, MD, Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, 67 Asahimachi, Kurume-shi 830-0011, Japan. Email: hirof@med.kurume-u.ac.jp

Abbreviations: GC–MS, gas chromatography–mass spectrometry; Me–TMS, methyl ester-trimethylsilyl ether; BSEP, bile salt export pump; OATP, organic anion transporting polypeptide; NTCP, Na⁺ taurocholate cotransporting polypeptide; RDS, respiratory distress syndrome; PDA, patent ductus arteriosus; PS, pulmonary stenosis.

Received 9 July 2008; revised 15 April 2009; accepted 7 May 2009.

Table 1 Characteristics of preterm infants studied

Patient	Gender	Gestational age (weeks)	Birth weight (g)	Apgar score (1 min/5 min)	Nutrition*	Milk intake initiation (days after birth)	Total bilirubin at 6 days (mg/dl)	Diagnosis at birth
1	F	25.0	714	5/7	Breast milk or formula	7	7.9	RDS, PDA
2	M	26.8	996	6/8	Breast milk	5	7.6	RDS, PDA
3	F	27.0	912	2/6	Breast milk	3	7.8	RDS, PDA
4	F	28.7	948	5/7	Breast milk or formula	4	4.9	Hypoglycemia with apnea
5	M	28.7	1026	7/8	Breast milk or formula	1	10.0	RDS, PDA
6	F	30.4	928	7/8	Breast milk or formula	2	6.1	Hypoglycemia with apnea, PS
7	F	31.5	1126	4/8	Breast milk or formula	1	6.1	RDS, PDA
8	F	31.5	1206	8/9	Breast milk or formula	1	5.5	RDS, PDA
9	M	31.2	1360	7/8	Breast milk or formula	9	8.3	RDS
10	M	33.0	1336	7/8	Breast milk or formula	2	7.6	Hypoglycemia with apnea

*By nasogastric tube.

PDA, patent ductus arteriosus; PS, pulmonary stenosis; RDS, respiratory distress syndrome.

weeks after birth. Informed consent for observations and analysis in this study was obtained from the parents of the infants.

We divided 119 urine samples into six groups: those from infants less than 30 weeks old by corrected age ($n = 13$); 31 to 35 weeks corrected age ($n = 39$); 36 to 40 weeks corrected age ($n = 42$); 41 to 45 weeks corrected age ($n = 15$); 46 to 50 weeks corrected age ($n = 5$); and more than 51 weeks corrected age ($n = 5$). We compared urinary concentrations of each bile acid, such as 1β -hydroxylated bile acids or ketonic bile acids, between the corrected-age groups, and also determined changes in the concentration of each bile acid over time.

Sample collection

Urine samples were collected at various times from each preterm infant and stored at -25°C until assay. Urine samples were kept for no more than 2 years. We performed bile acid analysis on a total of 119 urine samples obtained from the ten preterm infants. Concentrations of individual bile acids in the urine from each subject were corrected for creatinine (Cr) concentration and expressed as $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ of Cr. We analyzed each sample only once. However, when we made calibration curves for determination of bile acid, we analyzed each sample 4 times.

Materials and reagents

The following bile acids were synthesized as described previously¹³⁻¹⁵: $1\beta,3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -tetrahydroxy- 5β -cholan-24-oic acid; $1\beta,3\alpha,7\alpha$ -trihydroxy- 5β -cholan-24-oic acid; $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxy- 5 -cholen-24-oic acid; $3\beta,7\alpha$ -dihydroxy- 5 -cholen-24-oic acid; $7\alpha,12\alpha$ -dihydroxy- 3 -oxo- 4 -cholen-24-oic acid; and 7α -hydroxy- 3 -oxo- 4 -cholen-24-oic acid. Other bile acids were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO).

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

GC-MS was performed with a Hewlett-Packard 5972A instrument (Hewlett-Packard Japan, Tokyo) using an HP-5MS gas chromatographic column (30 m \times 0.25 mm inside diameter; film thickness, 0.25 μm); and a fused silica capillary column bound with methylsilicon (J & W Scientific, Folsom, CA). Figure 1 shows a chromatogram obtained by selected ion monitoring of the characteristic fragments of the methyl ester-trimethylsilyl ether (Me-TMS) derivatives of a mixture of reference bile acids.

Analysis of bile acids in urine

In the standard procedure, samples of human biological fluids were prepared routinely for GC-MS analysis as described in our previous reports.⁸⁻¹² Calibration curves for determination of bile acids were obtained by plotting the peak area ratio that corresponded to the monitored ion for each bile acid and the corresponding internal standard versus the amount of each bile acid. A linear relationship ($r > 0.976$) was obtained over a range of 1.5 to 10 ng for each bile acid.

Identification and quantitation of individual bile acids

GC-MS data for individual bile acids are summarized in Table 2, including their characteristic fragment ions and relative abundance.

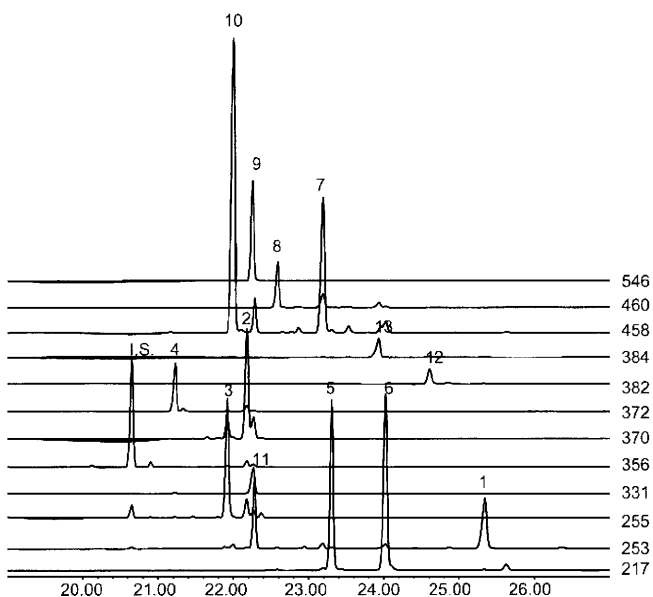


Fig. 1 Selected ion gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) chromatogram of methyl ester–trimethylsilyl ether (Me–TMS) derivatives of reference bile acids. Peak numbers and compounds are the same as in Table 2.

Statistical analysis

Data are reported as the mean \pm SD. ANOVA was used to determine the significance of differences between groups. Comparisons of categorical data between groups were made with the Aspin–Welch *t*-test. A *P*-value of less than 0.05 was accepted as indicating statistical significance.

Table 2 Gas chromatography–mass spectrometric data for methyl ester–trimethylsilyl ether derivatives of bile acids

No.	Bile acid	Base peak (m/z)	Fragment ions (m/z)
Common bile acids			
1.	Cholic acid	253 [†]	343, 368
2.	Chenodeoxycholic acid	370 [†]	255, 355
3.	Deoxycholic acid	255 [†]	370, 460
4.	Lithocholic acid	215 [†]	257, 372
1β- and 6α-hydroxylated bile acids			
5.	1 β ,3 α ,7 α ,12 α -Tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid	217 [†]	251, 366
6.	1 β ,3 α ,7 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid	217 [†]	368, 458
7.	Hyochoolic acid	458 [†]	147, 369
Isomerized 7β-hydroxylated bile acid			
8.	Ursodeoxycholic acid	460 [†]	255, 370
3β-Hydroxy-Δ^5-bile acids			
9.	3 β ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5-cholen-24-oic acid	546 [†]	209
10.	3 β ,7 α -Dihydroxy-5-cholen-24-oic acid	458 [†]	209
11.	3 β -Hydroxy-5-cholen-24-oic acid	129 [†]	249, 370
Unsaturated ketonic bile acids			
12.	7 α ,12 α -Dihydroxy-3-oxo-4-cholen-24-oic acid	382 [†]	267, 472
13.	7 α -Hydroxy-3-oxo-4-cholen-24-oic acid	384 [†]	459, 474
I.S.	3 α ,7 α -Dihydroxy-24-nor-5 β -cholan-23-oic acid	431 [†]	

[†]Fragment ions used for selected ion monitoring.

I.S., internal standard.

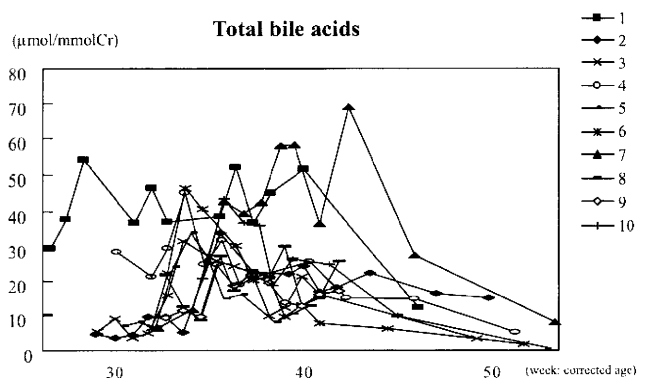


Fig. 2 Developmental pattern of urinary excretion of total bile acids ($\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$) in 10 preterm infants. Numbers correspond to patient numbers in Table 1.

Results

Clinical diagnoses in ten preterm infants (Table 1)

The main diagnosis in seven preterm infants (patients 1, 2, 3, 5, 7, 8, and 9) was respiratory distress syndrome (RDS), while the other three (patients 4, 6, and 10) had severe hypoglycemia with apnea after delivery. Additionally, seven of the preterm infants (patients 1, 2, 3, 5, 6, 7, and 8) had congenital heart disease such as patent ductus arteriosus (PDA) or pulmonary stenosis (PS).

Total bile acids (Fig. 2, Table 3)

Total urinary bile acid concentrations showed low excretion during 2 or 3 weeks after birth. Concentrations of total urinary bile acids then gradually increased over 1 or 2 months, peaking at 30 to 60 $\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$ and ultimately decreasing gradually to less than 20 $\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$.

Table 3 Urinary excretion of bile acids in preterm infants

Groups	1	2	3	4	5	6
Corrected age (weeks)	<30	31–35	36–40	41–45	46–50	51<
Number	13	39	42	15	5	5
Total bile acids ($\mu\text{mol}/\text{mmol Cr}$)	17.9 ± 17.1^a	23.3 ± 13.1^b	25.2 ± 13.3^c	21.1 ± 15.2^d	14.8 ± 8.7	6.1 ± 5.8
Usual bile acids (%)	21.6 ± 13.5^e	15.0 ± 9.0^f	11.1 ± 6.2^g	10.0 ± 6.6^h	4.5 ± 1.8	7.0 ± 4.1
1 β -Hydroxylated bile acids (%)	65.1 ± 13.8^i	78.2 ± 9.5^j	83.3 ± 7.7	82.3 ± 6.9	86.1 ± 6.6^k	76.3 ± 7.6
Unsaturated ketonic bile acids (%)	7.3 ± 5.8^l	2.9 ± 3.6^m	0.9 ± 0.5^n	1.5 ± 0.9^o	1.6 ± 1.0^p	4.4 ± 3.4

Usual bile acids, cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic, and lithocholic acids; 1 β -hydroxylated bile acids, 1 β ,3 α ,7 α ,12 α -Tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic and 1 β ,3 α ,7 α -Trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acids; Unsaturated ketonic bile acids, 7 α ,12 α -Dihydroxy-3-oxo-4-cholen-24-oic and 7 α -Hydroxy-3-oxo-4-cholen-24-oic acids; ^a $P < 0.05$ vs 36 to 40 weeks; ^b $P < 0.05$ vs >51 weeks; ^c $P < 0.01$ vs >51 weeks; ^d $P < 0.01$ vs >51 weeks; ^e $P < 0.01$ vs 36 to 40 weeks, 41 to 45 weeks, 46 to 50 weeks; ^f $P < 0.05$ vs 51< weeks; ^g $P < 0.001$ vs 46 to 50 weeks; ^h $P < 0.05$ vs <51 weeks; ⁱ $P < 0.05$ vs 46 to 50 weeks; ^j $P < 0.05$ vs 46 to 50 weeks; ^k $P < 0.01$ vs 31 to 35 weeks; ^l $P < 0.0001$ vs 36 to 40 weeks; ^m $P < 0.001$ vs 41 to 45 weeks; ⁿ $P < 0.01$ vs 51< weeks; ^o $P < 0.05$ vs 36 to 40 weeks, 46 to 50 weeks; ^p $P < 0.05$ vs 51< weeks; ^q $P < 0.05$ vs 31 to 35 weeks, $P < 0.001$ vs 36 to 40 weeks, $P < 0.01$ vs 41 to 45 weeks; ^r $P < 0.05$ vs 36 to 40 weeks; ^s $P < 0.05$ vs 46 to 50 weeks, $P < 0.001$ vs >51 weeks; ^t $P < 0.05$ vs >51 weeks; ^u $P < 0.05$ vs >51 weeks. Cr, creatinine.

Usual bile acids (Fig. 3, Table 3)

Relative to total urinary bile acids, usual bile acids (cholic, chenodeoxycholic, deoxycholic, and lithocholic acids) gradually decreased after birth from a high percentage (20% to 40%), to become stable at a low percentage (less than 15%), by about 40 weeks corrected age. Among the usual bile acids, cholic acid was most abundant (approximately 90% of usual bile acids; data not shown). Trace amounts of secondary bile acids (deoxycholic and lithocholic acids) were detected.

1 β -Hydroxylated bile acids (Fig. 4, Table 3)

This study determined that the percentage of 1 β -hydroxylated bile acids (1 β ,3 α ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic and 1 β ,3 α ,7 α -trihydroxy-5 β -cholan-24-oic acids) relative to total urinary bile acids gradually increased from birth to 3 or 4 weeks of age (from about 60% to 70% or 90%). This high percentage was then maintained until sampling ended at about 7 months of age. The principal 1 β -hydroxylated bile acid was 1 β ,3 α ,7 α ,12 α -tetrahydroxy-5 β -cholan-24-oic acid (approximately 80% of 1 β -hydroxylated bile acids; data not shown).

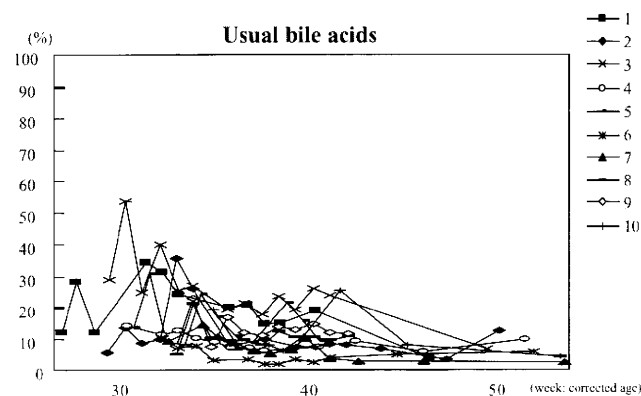


Fig. 3 Developmental pattern of that percentage of usual bile acids in 10 preterm infants, as a percentage in relative to total bile acids.

Unsaturated ketonic bile acids (Fig. 5, Table 3)

Relative to total urinary bile acids, the percentage of unsaturated ketonic bile acids (7 α ,12 α -dihydroxy-3-oxo-4-cholen-24-oic and 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholen-24-oic acids) decreased rapidly

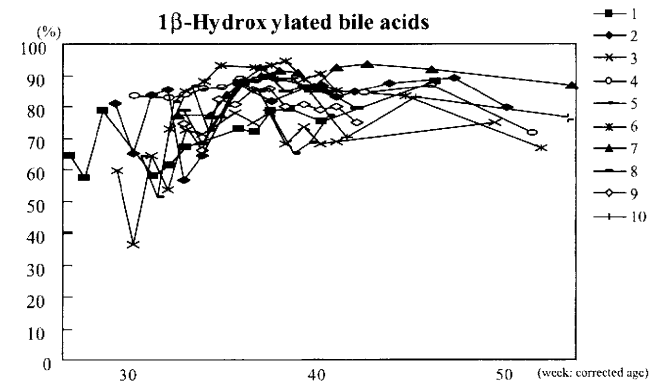


Fig. 4 Developmental pattern of the percentage of 1 β -hydroxylated bile acids in 10 preterm infants, as a percentage relative to total bile acids.

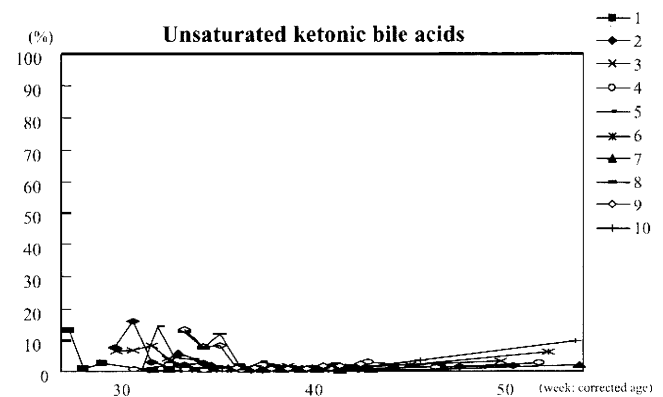


Fig. 5 Developmental pattern of the percentage of unsaturated ketonic bile acids in 10 preterm infants, as a percentage relative to total bile acids.