

201128123A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 須磨崎 亮

平成 24(2012)年 3 月

目 次

I. 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 | 1 |
| 須磨崎 亮 | |

II. 分担研究報告書

| | |
|--|----|
| 1. 臨床データのマネジメントと解析 | 9 |
| 瀧本 哲也 | |
| 2. Alagille 症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の遺伝子診断に関する研究 | 15 |
| 小崎 健次郎 | |
| 3. 一過性新生児胆汁うっ滞「非症候性肝内胆管減少症」の病態 | 17 |
| 田澤 雄作 | |
| 4. 小児胆汁うっ滞症における肝細胞トランスポーターの免疫組織化学的検討 | 22 |
| 鹿毛 政義 | |
| 5. 遺伝性胆汁うっ滞疾患：シトリン欠損症における肝内シトリン蛋白検出 による診断の可能性 | 27 |
| 乾 あやの | |
| 6. 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（3） Oxysterol 7 α -hydroxylase の診断について | 31 |
| 木村 昭彦 | |
| 7. 呼吸鎖酵素解析を中心とした迅速かつ正確なミトコンドリア肝症の診断 および分子病理の解明 | 39 |
| 村山 圭 | |

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 43 |
|---------------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 47 |
|-----------------------|----|

I . 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 筑波大学医学医療系 小児科教授

研究要旨

Alagille 症候群の問題点を明らかにするために郵送による全国調査を行った。一次調査で Alagille 症候群ありとの報告を得た全国の 74 施設に詳細な二次調査用紙を送り、本症の合併症について情報を収集した。わが国の Alagille 症候群患者 92 例について詳細な臨床データが蓄積された。肝胆道系の異常が最も多く見られ、心疾患・骨格系の異常や成長障害がこれに次いだ。外科治療など侵襲的な治療を要した症例に注目したところ、24%の症例で肝移植が行われていた。心疾患例では 4%の症例で開心術が、9%で肺動脈狭窄に対してカテーテル治療が実施されていた。心疾患としては肺動脈狭窄が 74%を占めており、その他の心奇形は 15%以下と少数であった。また欧米で報告の多い脳血管系の異常や腎泌尿器形の合併症はわが国では稀であった。成長障害が 49%、発達遅延が 26%に認められ、長期に渡る包括的な診療を求められる例が多いと判明した。

本年度はさらに、侵襲的治療を要した肝移植例・心疾患例や重大な合併症である脳出血例について三次調査を行った。肝移植の適応には肝不全・搔痒とともに成長障害を挙げる例が多かった。乳児期早期に肝門部空腸吻合術（葛西手術）を受けた 7 例中 5 例(71%)が肝移植に至っており、胆道閉鎖症類似の Alagille 症候群に対する葛西手術の効果は乏しいと推測された。心疾患例では心不全がみられる症例の重症度は軽症から重症まで幅広く分布した。脳出血の誘因はビタミン K 欠乏である可能性が高かった。

乳児肝内胆汁うっ滞症の中には、Alagille 症候群以外にも多数の遺伝性胆汁うっ滞症が含まれるが、これらを鑑別するには詳細な臨床データの解析に加えて多種類の特殊な検査を効率的に用いる必要がある。また、胆道閉鎖症類似の Alagille 症候群に対して適切な診療を行うためにも、乳児胆汁うっ滞症の診断を支援する Web サイトは有用と思われる。そこで、本研究班の班員が中心となって、これらの診断ガイドラインを日本小児栄養消化器肝臓学会のホームページ上に公開した。現在この Web サイトは月間約 800 hit の利用があり、広く活用され始めている。今後、Alagille 症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の正確な診断法と効果的な診療がさらに普及する事が期待される。

研究分担者

| | | | |
|-------|----------------------------|------|----------------------------|
| 瀧本哲也 | 国立成育医療研究センター 臨床研究推進室 室長 | 田澤雄作 | 国立仙台医療センター 小児科 総合成育部長 |
| 小崎健次郎 | 慶應義塾大学医学部 臨床遺伝学センター 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 |
| | | 村山圭 | 千葉県こども病院代謝科 医長 |

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。もともと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記載された。その後、責任遺伝子として*JAG1*遺伝子や*NOTCH2*遺伝子の変異が同定され、従来の臨床像に由来していた疾患概念は変貌しつつある。また、近年、多数の遺伝性胆汁うっ滞性疾患が発見され、それらの疾患の正確な診断方法は必ずしも明確になっておらず、臨床的に大きな問題となっている。

一方、わが国においてはAlagille症候群の全国調査は今まで実施されておらず、遺伝子以前の臨床データの蓄積や全国の患者さんの抱える問題点に直接アプローチする研究も不十分である。

私共は平成21年度から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。

本年度は研究の三年目として、昨年度までの二次調査の追加として、全国の小児外科施設にも同様の調査を行った。さらに肝移植、心臓手術など大きな侵襲を伴う治療の必要性や頭蓋内出血など長期に渡る重大な合併症に焦点を絞って三次調査を行い、重篤な患者について詳細な臨床データの蓄積を行い、海外の既報と比較した。

B. 研究方法

1. Alagille症候群

1.1. 追加の二次調査および三次調査

平成21年度、22年度の全国調査では、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、74例のAlagille症候群患者のデータが蓄積された。本年度はこれらの追加調査として、わが国の主要な小児外科施設、121施設にはがきによる一次アンケートを実施し、62施設から回答を得た。この調査により、13施設から症例ありとの返事を得た。これらの13施設に二次調査表を送付し、重複例を除いて新たに18例の回答を得た。本年度の集計では、従来の74症例にこの18症例を加えた92症例のデータを用いた。

さらに本年度の三次アンケートでは、上述の92例のうち脳出血例4例、心疾患例12例、肝移植例19例について、さらに詳細な臨床情報を得るための質問用紙を各施設に送付した。

(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症候群についての全国調査

追加二次調査で症例は増加し、平成24年8月31日までに回収された92症例について、各合併症の頻度を図1に示した。

古典的な臨床的診断根拠となる肝胆道系異常は95% (84例)、心疾患は89% (82例) にみられたが、椎体を含めた骨格系異常は52% (48例) にとどまっていた。また合併症として成長障害を挙げたものが49% (45例)、発達遅滞を挙げたものが26% (24例) あった。

肝胆道系異常としては、黄疸、高コレステロー

ル血症、搔痒感、ビタミン K 欠乏、多発性黄色腫など胆汁うっ滞による異常が多かった。心奇形では肺動脈狭窄が 74%と最多であった。

成長障害のデータを図 2 に示す。身長は 45%が、体重は 21%が -2 SD 未満であった。男児で女児よりも -3 SD 以下の低身長が多い傾向にあった。

侵襲的治療としては、図 3 に示すように、肝移植が 24% (22 例)、心臓手術が 4% (4 例)、カテーテル治療が 9% (8 例)、脳外科手術が 2% (2 例)で行われていた。また、胆道閉鎖症に準じた葛西手術が 8% (7 例)で行われていた。さらに葛西手術後には、71% (7 例中 5 例)で肝移植が必要になった。

二次調査の結果としては侵襲的治療を必要とした肝移植例・心疾患例・脳出血例について臨床的課題が多いと考えられたため、これらを対象にさらに三次調査を行い、臨床的問題点の抽出を試みた。

＜肝移植例の特徴と問題点＞

三次調査に対し 9 施設から 13 例について回答があった。移植適応 (重複あり) は、肝不全 9 例、成長障害 10 例、搔痒 10 例、高コレステロール血症 6 例だった。肝移植実施時の Child-Pugh 分類は、A 3 例、B 5 例、C 7 例、不明 7 例でドナーは母親 7 例、父親 5 例、祖母 1 例であった。肝移植実施時の身長は -0.3 ～ -6.9 SD (中央値 -3 SD)であった。術前に父親が Alagille 症候群と判明していた 1 例では母親をドナーとしていた。

移植時年齢は生後 9 か月～17 歳 4 か月 (中央値 1 歳 6 か月)であった。ただし 17 歳 4 か月の 1 例、5 歳 4 か月の 1 例を除いた 11 例はいずれも 3 歳未満であり、うち 9 例はいずれも 2 歳未満であった。三次調査で確認された葛西術の既

往のある肝移植例は 4 例で、この全例が 11 か月から 1 歳 7 か月と早期に移植手術を受けていた。

このように肝移植は肝不全・搔痒に加えて成長障害を適応とする回答が多く見られ、移植年齢はほとんどが幼児例であった。

＜心疾患合併例の特徴と問題点＞

二次調査では開心術を行ったもの 4 例、カテーテル治療を行ったもの 8 例が把握されていた。三次調査に対し 5 施設から 7 例について回答があった。カテーテル治療は 6 例、開心術は 1 例、両方行われたものが 1 例であった。この 1 例は 5 度のバルーン拡張術、3 回の開心術を施行されていた。これら 7 例の治療後の NYHA 機能分類は I 度 2 例、II 度 2 例、III 度 1 例、不明 2 例だった。

重症度には軽症から重症まで幅がある結果であった。

＜脳出血例の特徴と問題点＞

脳出血の既往あるものは 4 例でビタミン K 欠乏が疑われた。1 例ではビタミン K2 の内服が行われていたが生後 2 か月に脳実質内出血をきたし、血腫除去術を受けた。左片麻痺・知的障害を残していた。残る 3 例のうち 2 例は硬膜下出血をきたし、うち 1 例は VP シヤント術を要した。残る 1 例は生後 11 か月に頭部外傷に伴う急性硬膜外血腫をきたしたが、後遺症は残さなかった。

Alagille 症候群に伴うとされる脳血管異常は、もやもや病・中脳動脈瘤など 4 例が報告されたが、これらの症例には脳出血・脳梗塞は伴わなかった。

2. 乳児胆汁うっ滞症の診断ガイドライン

本研究班の 3 年間の研究成果をまとめて診断ガイドラインを作成し、班員が中心となって乳児胆汁うっ滞症の診断支援のための Web サイトとしてこれらを公開した。この Web サイトは、学会運営

委員会の承認を得て、日本小児栄養消化器肝臓学会のホームページに掲載されている。このサイトの使用頻度は、月間約 800 回に達している。また、検索エンジンを使い、「乳児」、「胆汁うっ滞」などの語を用いて Web サイトを検索すると上位に表示されている。

D. 考察

1. Alagille症候群についての全国調査

1.1. Alagille症候群の患者数

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 ALGS 患者が集積された。回答率が各施設の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 名と推定された。一方、日本肝移植研究会の肝移植症例登録数 (20 年間に 67 例) と今回の二次調査による肝移植率 24%からは、過去 20 年間の ALGS 患者総数は 279 例と推計された。異なる患者数の推計方法はよく一致しているため、わが国の本症患者数は 200~300 名程度と推定される。

1.2. Alagille症候群患者が抱える問題点

全体を俯瞰すると、Alagille 症候群患者の長期予後は、約半数で重大な障害を伴うと判明した。すなわち図 1 にみるように最も多い合併症は肝胆道系の異常であったが、肝機能低下は肝不全に至ることがあり、肝移植の対象であった。また、成長障害とともに発達遅延がしばしばみられていた。

以下、侵襲的治療を要し臨床的課題が多いと考えられた 3 つの場合について考察する。

<肝移植例>

欧米の大規模研究では Alagille 症候群患者の約 1/3 で肝移植が必要と報告されていたが、今回の全国調査によれば、肝移植率は 24%であり、欧米よりは低い数字であった。

肝移植適応として肝不全とともに、強い搔痒感や成長障害を挙げた例が多かった。Alagille 症候群はもともと強い肝障害がなくとも、高率に成長障害をきたすため、肝移植によって最終的な成長障害が改善するかどうかには議論がある。今後はわが国の肝移植例を追跡して成長障害がどの程度改善したかを確認することは重要である。Alagille 症候群の肝障害で、胆道閉鎖など他の重篤な肝疾患と同様に、成長障害を移植適応の一つとするかどうか、再検討が必要である。

次に、葛西手術 (肝門部空腸吻合術) を受けた例の実に 71% (7 例中 5 例) が肝移植に移行していたことは特筆すべきと思われる。わが国の胆道閉鎖症研究会の登録によれば、胆道閉鎖症に対する葛西手術後の移植率は 30%台と推定されている。すなわち今回のデータから、胆道閉鎖症類似の Alagille 症候群に対する葛西手術は無効、ないし効果が乏しいと評価された。三次調査における葛西手術後の肝移植例における移植年齢の低さもこれを裏付けられると思われた。

Alagille 症候群では、肝内胆管減少症のみならず、しばしば肝外胆管閉鎖を伴い、胆道閉鎖症と類似の所見を呈することが知られている。すでに古くから欧米ではこのような肝外胆管閉鎖を伴う Alagille 症候群に肝門部空腸吻合術を行うと肝機能の予後が悪くなり、高率に肝移植が必要となる、とする報告がみられる。

今回の検討は後方視的検討であるので、(1) 葛西手術の適応と判断された肝外胆管病変を伴う症例は肝機能の予後がもともと悪い、(2) 肝外胆管病変の形に関係なく葛西手術によって肝機能の予後が悪化する、のいずれが正しいかをこのデータだけで判断することは難しい。しかし仮に(1)の仮説が正しいとしても、今回のデータから葛西手術例はいずれ肝移植へ移行すると予想されるならば、振り返ってみると無駄な手術を行ったことになりやすいため、最初から Alagille 症候群と判明していた症例については、胆道造影などで胆道閉鎖症類似の病態があっても葛西手術という余分な侵襲を加えるべきでないと思われた。

実際の臨床現場では、乳幼児期には本症に特徴的な顔貌も明確にならないなど、胆道閉鎖症との鑑別は容易でない。したがって Alagille 症候群で肝門部空腸吻合術を避けるためには、胆道閉鎖症の鑑別診断を手術前に行う際に、注意深い心雑音の聴取、心臓超音波検査、後部胎生冠などを探す眼科検査、椎体の X 線検査を含めることの大切さを広めていく必要があると思われた。また病理組織像を持ってしても、乳児期早期には Alagille 症候群に特徴的な肝内胆管減少は明らかでないことが多く、本症診断のための肝生検は生後 6 か月に実施することが望ましい。

Alagille 症候群の診断のきっかけとして、今回の調査で、肝移植ドナー検索のときに初めて診断された症例が報告された。本症は常染色体優性の遺伝形式をとり、臨床症状や重症度が同一家系内でも大きく異なることが知られている。したがって、平成 21 年度に本研究班で策定した Alagille 症候群の診断基準では、変異アレルを有

するが症状の乏しい不完全浸透例の診断方法を提示した。このような症状の乏しい症例の診断の必要性について慎重に考える必要があるが、少なくとも肝移植ドナーとしては、除外されなければならない。わが国では特に、Alagille 症候群患者に肝移植を行う場合、両親のどちらかがドナーとなる生体部分肝移植がほとんどであることから、両親のどちらかが症状の乏しい不完全浸透例である確率が高いので、とくに注意する必要がある。

<心疾患例>

肺動脈系の異常が多く見られ、これに対してカテーテル治療が多用されていた。しかし中には開心術に至る例もあり、NYHA 分類で見ると限り治療後にも心不全を残す例があるなど重症度は多様であった。

病因論的には Alagille 症候群の遺伝子異常を伴わない肺動脈病変との重症度比較などが今後の課題と思われた。

<脳出血例>

今回の検討では、脳血管障害は脳出血の原因としてビタミン K 欠乏が疑われる例が目立った。閉塞性黄疸の管理には PIVKA-II を指標にしたビタミン K 投与が望ましいが、これが必ずしも普及していない。一因としてビタミン K 欠乏検査としての保険適応がなく、また保険では腫瘍マーカーとして測定することへの制限がかけられていることも関連しうると考えられる。

近年、米国における Alagille 症候群の大規模研究では、肝移植や心臓手術の進歩によって頭蓋内出血が最も頻度の高い死因となっている。

今回の調査では、そのような頭蓋内出血の症例は少なく、この点でわが国の Alagille 症候群患者

の予後は比較的良好という可能性が考えられる。しかし、今回の調査でも肝移植前の頭部 MRI スクリーニング検査で無症候性の脳動脈瘤が発見された症例があり、今後は頻度の低い合併症として注意深い検索は必要である。

欧米で報告の多い腎不全は 1 例のみであった。Alagille 症候群の原因遺伝子として、*JAG1* と *NOTCH2* の二つがあげられており、*NOTCH2* の変異の場合、腎障害が前景に立つことが知られている。今回の調査では、このような臨床病型に合致する症例は見いだされなかった。これらは人種差によることが考えやすいが、Alagille 症候群に関する新たな臨床情報が十分に浸透していないために合併症として認識されていない恐れもあり、今後の広報と再検討が必要と思われた。

また、本症患者の抱える問題点やその長期予後を中心に明らかにするためにも、海外に頼らないわが国での前方視的な研究が望まれる。

2. 乳児胆汁うっ滞症の診断支援サイト

昨年度に引き続き本年度の本研究班の研究により、乳児胆汁うっ滞症には、Alagille 症候群の他に多様な疾患が含まれることが判明した。とくに、新生児肝炎として一括されてきた乳児肝内胆汁うっ滞症の中に特異的な治療や重篤な予後を呈する疾患が多数含まれていることから、これらの疾患の正確な診断が重要である。このためには、詳細な臨床像の分析に加えて、肝病理検査、尿中胆汁酸分析、ミトコンドリア蛋白の解析、遺伝子検査など各種の特殊検査が適切に行われる必要がある。これらの疾患の患者数は最も多い Alagille 症候群でも日本全国で 200~300 名であり、その他の疾患はさらに少ないものと推測される。本研究班の成果の一つとして、これらの稀少疾患の診

断を支援する Web サイトを公開した。本年度の追跡調査では、インターネットによる検索結果や使用回数の分析から、このツールが広く活用されていることが確認された。今後、この診断を支援する Web サイトなどが活用されて、正しい診断に基づいた適切な診療が全国的に普及し、これらの疾患の長期予後がさらに改善されることが強く期待される。

E. 結論

本年度の研究によって、Alagille 症候群の患者の詳細な臨床データの集積と新たな合併症の発見が行われた。全体を俯瞰すると、Alagille 症候群患者の長期予後は、約半数で重大な障害を伴うと判明した。さらに、本症に類縁の進行性家族性肝内胆汁うっ滞症や良性反復性肝内胆汁うっ滞症、先天性胆汁酸代謝異常症、ミトコンドリア肝症について、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

1. 論文発表

- (1) 須磨崎 亮、和田 宏樹、工藤 豊一郎：
Alagille 症候群 腎臓症候群（第 2 版）その他の腎臓疾患を含めて。別冊日本臨床 新領域別症候群 No.17 399-402 2012
- (2) 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】発生の観点から 胆・肝・膵 62 (1) 7-15 頁 2011

- (3) 須磨崎 亮：胆道系の発生と Notch シグナル(解説/特集) 小児内科 43(6) 981-986、2011
- (4) 和田 宏来、工藤 豊一郎、須磨崎 亮：症候からみる臨床検査の進めかた 肝機能障害(解説/特集) 小児科診療 74 巻増刊号 119-125 2011

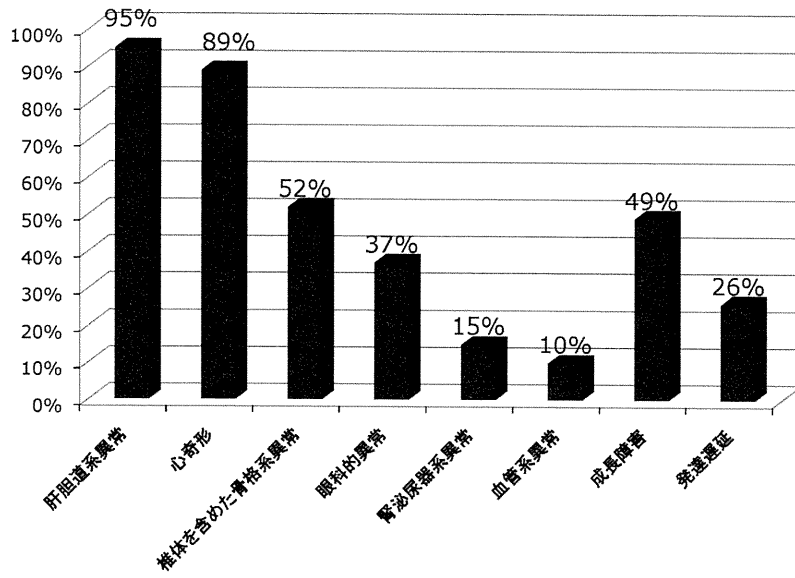
2.学会発表

- (1) 和田 宏来、工藤 豊一郎、瀧本 哲也、藤本 純一郎、田中 久子、須磨崎 亮：Alagille 症候群の全国疫学調査と今後の課題 第 38 回日本小児栄養消化器肝臓学会 (2011 10/8-9 盛岡)
- (2) 須磨崎 亮：乳児の胆汁っ滞をどのように診療するのか？希少疾患の診断ツールを求めて 第 211 回日本小児科学会宮城地方会特別講演 (2011 6/18 宮城)
- (3) 須磨崎 亮：胆管形の病理 最近の展開 発生過程における肝外胆管系と膵臓の器官分化は、転写因子 Hes1 によって制御されている 第 100 回日本病理学会 特別講演 (2011 年 4/28-30 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. Alagille症候群の症状と頻度



○ 肝移植未施行例
● 肝移植例

図2. Alagille症候群患児の身長分布

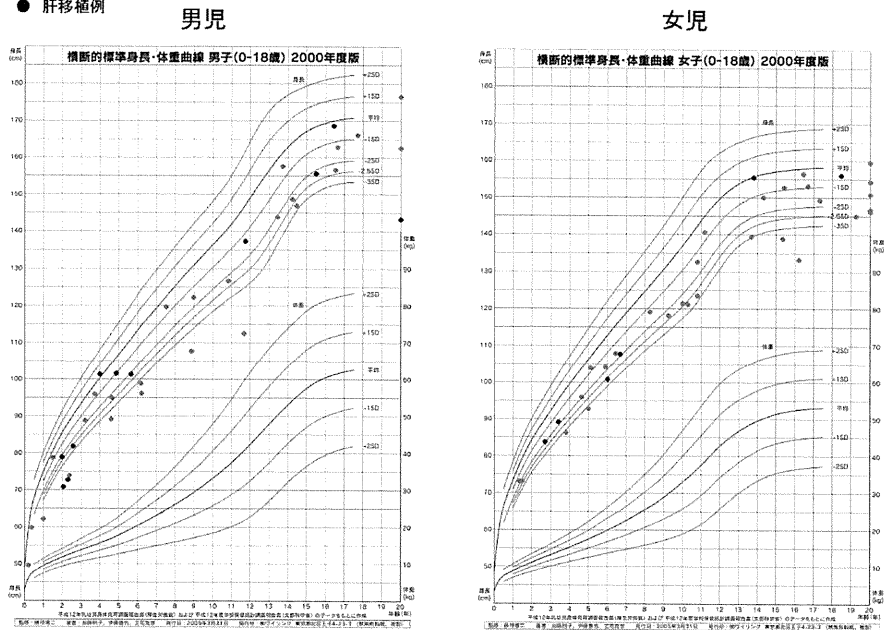
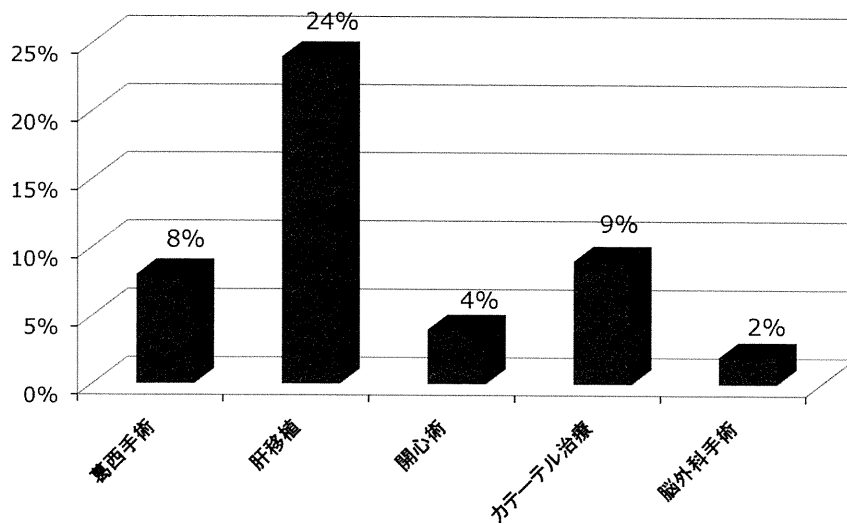


図3. 大きな侵襲を伴う治療



Ⅱ. 分担研究報告書

臨床データのマネジメントと解析

| | | |
|-------|---------------|---|
| 研究分担者 | 瀧本哲也 | 国立成育医療研究センター臨床研究センター 臨床研究推進室長 |
| 研究協力者 | 藤本純一郎 田中久子 | 国立成育医療研究センター臨床研究センター長 国立成育医療研究センター臨床研究センターフェロー |

研究要旨

本研究班が目指している、肝疾患の領域における生体資料集積および他の研究者が利用できる体制の整備に資する目的で、小児がん領域で現在実施されている中央診断後の余剰検体保存と利用システムの実情について、国立成育医療研究センターの経験を紹介し、その問題点をふまえて、検体提供者/代諾者の同意の確認、検体の保存および臨床情報収集・管理等を行う部署およびそれに要する費用負担、保存検体の分譲、長期のフォローアップ情報収集と検体提供者本人からの再同意取得等の点について、望ましい生体資料の管理のあり方について提言を行った。ただし、がん細胞に生じる体細胞変異の検査が主体となる小児がん領域と異なり、胚細胞変異の検査が必須の疾患領域では、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」等の規制をふまえたより詳細な方針が必要な可能性もある。今後、研究グループや疾患分野の枠を超えた議論を行っていくことが望ましいと考えられる。

A. 研究目的

国立成育医療研究センターでは、小児領域のさまざまな疾患分野の臨床研究支援を行う体制を構築している。このような活動の一環として、昨年度は本研究班の主要な対象疾患である Alagille 症候群（およびその類縁疾患）を対象としたアンケート調査の集計を行った。一方、本研究班では患者の生体資料を集積し、それが他の研究者にも利用できる体制の整備を目指している。国立成育医療研究センターは現在、小児がん領域において検体保存施設としても機能しており、臨床データとの連結作

業等も行っている。昨年度にも議論された、肝疾患の領域における生体資料の管理のあり方について、このような経験を活かし提言することを本年度の目的とする。

B. 研究方法

小児がん領域で現在実施されている、中央診断終了後の余剰検体の保存と利用のシステムの実情を紹介し、その経験や問題点をふまえて、小児領域における望ましい生体資料の管理体制について考察する。

（倫理面への配慮）

現在、国立成育医療研究センターで実施

している生体試料の保存、および臨床データの管理は、「疫学研究に関する倫理指針」、あるいは「臨床研究に関する倫理指針」に準拠している。すなわち、患者や検体提供者の個人情報を保護し、生体試料の研究利用に際しては提供者の同意の確認を徹底している。また、データ管理業務を担当する者は個人情報の保護にかかわる教育を受けており、収集した臨床データは外部のネットワークに接続しないイントラネットで管理している。

C. 研究結果

1. 小児がん領域での余剰検体保存の実情

小児がんの領域では、診断に必要な各種の検査を中央診断として一括して実施し、その結果に基づいて臨床試験に登録するとともに、提供者の同意が得られた場合には、中央診断後の余剰検体を保存する全国的な体制の構築が進んでいる。国立成育医療研究センターの病理診断部および研究所は、公的助成を受けた複数の小児がん研究グループと共同して、白血病細胞の表面マーカー検査、がん細胞遺伝子変異の生化学的検査、あるいは病理組織学的検査等を実施するとともに、中央診断後の余剰検体を集積して保存する検体保存センターのひとつとして機能している。また、臨床研究センターの臨床研究推進室は、いくつかの固形腫瘍について臨床試験や全ての小児固形腫瘍を対象とする観察研究のデータ管理を行っている。

小児がん領域での検体保存の流れの一例を図に示す。研究グループによって手順に若干の違いはあるが、基本的には中央診断前に一次登録を行って匿名化し、この際

に研究利用を目的とした余剰検体保存の同意について確認する。同意の有無はデータセンターから中央診断施設に知らされ、保存の同意が得られた検体は保存番号を付して中央診断施設に一時保管される。その後所定の時期に最終検体保存施設である国立成育医療研究センターに移送され、長期保存される。なお検体保存の同意のない検体や、保存の同意が撤回された検体は廃棄される。一方、検体提供者に関する臨床情報はデータセンターが管理している。保存検体への臨床情報の付与は、検体の分譲が決定した時点で、検体保存施設から分譲を行う検体に対応する一次登録番号がデータセンターに知らされ、該当する臨床情報が検体保存施設に送付されることによってなされる。一次登録番号と検体保存番号との対照表は、検体保存施設にのみ存在することになる。なお、データセンターが所有する臨床情報は臨床試験終了後、規定により廃棄される。この場合には、廃棄前に最終的な臨床情報を検体保存施設に送付する（ただし、現時点でここまで至った事例はない）。

2. 小児がん分野で経験された問題点

小児がん領域における余剰検体保存のシステムは一種類ではないので、すべてに該当するわけでは決していないが、一般的に問題となることが多いのは以下のような事柄である。

①検体提供者/代諾者の同意の確認

余剰検体の保存と研究利用に関する同意が確認されていない検体が中央診断後にそのまま保存されている場合が少なくない。診断後、時間が経過してから検体提

供者から研究利用の意思を確認するのは、患者のフォローアップ状況や診療施設の体制変化など多くの理由により、困難なことが多く、検体を廃棄せざるを得ないこともある。

②検体の保存場所

中央診断には特殊な技術を要するものが多いため、施行可能な施設は限られてくる。これらの施設に検査用の検体が送付された場合、余剰検体はそのままその施設で保存されることが多い。このような検体をあらためて転送して中央で一括保存することは、実際には困難ことが多い。

③検体の保存処理と管理および費用

検査後の余剰検体の保存処理を行い、管理するためには人員が必要である。また、保存検体の提供者が特定されることはもちろん許されない。臨床試験参加症例などでは通常、登録番号が付与されているが、これは患者が診療を受けている施設において連結可能であるため、この番号を検体保存のために使用することは望ましくない。検体を連結不能匿名化して保存すれば、個人情報の漏洩等のリスクは最小化できる一方で、保存検体にフォローアップデータを含む最新の臨床情報を付与することは不可能となる。もちろん、いったん冷凍庫で凍結した検体のラベルの記載内容を途中で変更することは困難である。

以上のことから、検体保存の実務だけではなく、臨床試験登録番号と検体保存番号との対照表などを系統的に管理するための部署が必要となる。このような部署の人員費も含めた保存費用が継続的に確保されなければならない。

④保存検体の分譲

先述のように、検体保存や管理には多大の負担が必要であることを考慮すれば、公的バンクのように広く一般の研究者が利用できる形が研究ベースで常にとれるとは限らない。したがって、保存された検体をどのような範囲の研究者に対して分譲するかが問題になる。

また、保存検体の分量には限りがある。複数の研究プロジェクトが提案された場合などには、どの研究に優先的に検体を分譲するかについてのルール作りが必要になる。また、研究に必要な検体の量の妥当性などについても、個別に判断して公平性を保たなければならない。

⑤長期のフォローアップ情報収集と検体提供者本人からの再同意取得

臨床試験のデータセンターが臨床試験終了後も継続して臨床情報を収集することは、マンパワーなどの理由により困難である。一方、検体は長期にわたって保存されるため、これに対応した長期フォローアップデータを付与できることが望ましい。したがって、臨床試験終了後のフォローアップ情報を収集するための長期フォローアップセンターが必要と考えられている。また、検体の提供者が16歳に達した場合には、提供者本人からのインフォームド・コンセントを受ける必要があるが、病名告知などの問題もあり、明確なルールは定められていないのが実情である。

D. 考察

小児がん領域では、ある程度頻度が高い疾患については全国規模の研究グループがかなり以前から活動している。これらのグループが共同することによって、臨床試

験や観察研究などを実施する際に必須となる中央診断やデータセンター等に要する人的・経済的資源を確保する形で、臨床研究が進んでいる。中央診断後の余剰検体保存もそのような研究活動の一環であり、かなり体制が整ってきたとはいえ、本稿で述べたようなお課題は多い。がん領域の経験から提言できる望ましい生体資料の保存や利用のあり方を以下に示す。

- 1) 検査施設に検体が送付される前に、検査後の余剰検体の保存と研究利用についての同意の有無を必ず確認する。特に、バンク化や iPS 細胞化して利用する場合には、その旨を明確に説明して同意を確認しておく必要がある。
- 2) 実際の検体保存を行う場所の確保だけでなく、臨床情報や保存検体に関する情報を管理する部署を定め、それに要する人的、経済的資源の負担について研究グループで決定しておく。
- 3) 検査後の余剰検体は可能であれば一ヶ所に集積して保存することが望ましいが、これは検体の保存や利用のルールを明確に定めておけば、必須ではないと考えられる。
- 4) 検体を利用する権利をどの範囲の研究者に付与するか、どのような手順で利用を申請し、申請された研究内容をどのように審査し、検体使用を許可するのか等についてのルールを未然に定めておく。
- 5) 検体分譲の手順、臨床データの付与の方法、時期、あるいは検体提供者からの同意撤回時の手順などについてもあらかじめ定め、検体保存施設、臨床情報や保存検体に関する情報を管理する部署等が研

究グループとうまく連携して機能できるシステムを構築する。可能であれば、長期のフォローアップ情報収集と検体提供者本人からの再同意取得の方法についても明確化しておくべきである。

言うまでもなく、がんと他の疾患領域では異なる点もあり、以上に述べたことがそのままあてはまるとは限らないが、生体試料の保存と研究利用という点では共通する点も多いと考えられる。ただし、小児がん領域では現在のところ、がん細胞に生じる体細胞変異の検査が主体であるが、肝疾患をはじめとする他の疾患領域では胚細胞変異の検査が必須となり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」等の規制をふまえたより詳細な方針（インフォームド・コンセントの手続及び方法、研究により予測される結果の開示に関する考え方、遺伝カウンセリングの必要性及びその体制などについて）が必要な可能性もある。今後、研究グループや疾患分野の枠を超えた議論を行っていくことが望ましいと考えられる。

E. 結論

小児がん領域で現在実施されている中央診断後の余剰検体保存と利用システムの実情について、国立成育医療研究センターの経験をふまえて紹介し、その経験や問題点をふまえて、肝疾患の領域における望ましい生体資料の管理のあり方について提言を行った。

F. 健康危険情報

なし

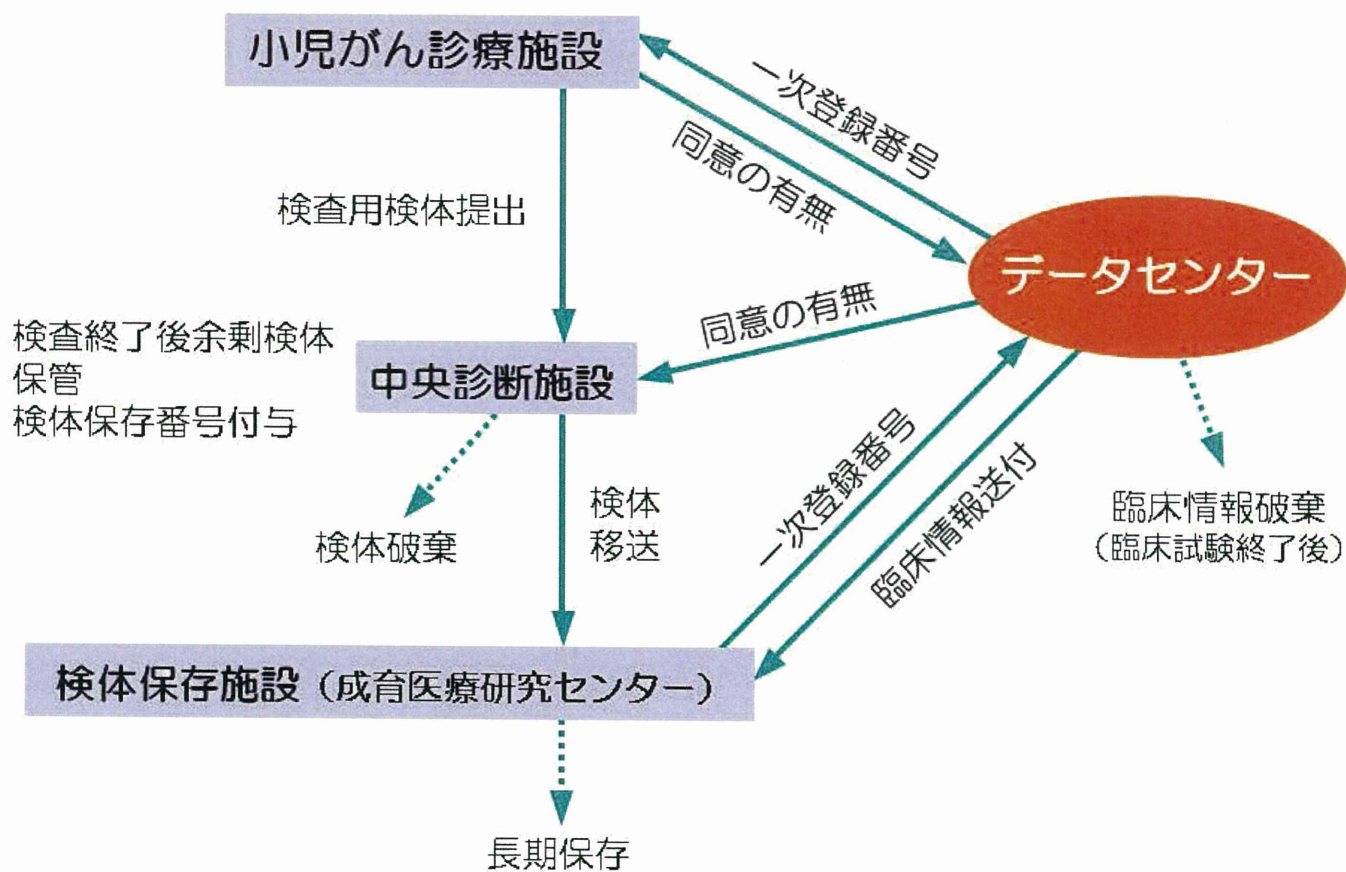
G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表等
なし

H. 知的所有権の出願・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

検体保存の手順（小児がん領域）



Alagille 症候群など遺伝性胆汁うっ滞性疾患の遺伝子診断に関する研究

研究分担者 小崎 健次郎 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター 教授

研究要旨

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、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。本研究では、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、全国からの診断依頼に応じてきた。

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、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。本研究では、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、検査の普及を図った。

B. 研究方法

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、Alagille 症候群原因遺伝子および PFIC の遺伝子を複数領域に分けて PCR 法で増幅、DHPLC（熱変性高速液体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。

（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。

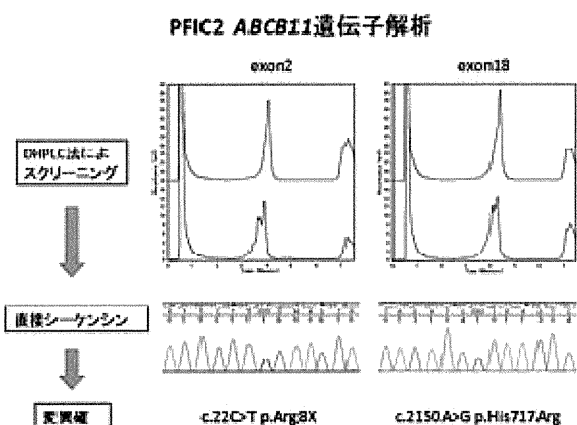
C. 研究結果及び考察

DHPLC-シーケンシング法解析

臨床的に Alagille 症候群と考えられた症例について、DHPLC 解析を行い、変異の存在が示唆された症例に対しては、サンガー法により直接シーケンシングを行い、変異を検出した。全国 19 施設から計 36 例を解析し、19 例に変異を同定した。

1) 達成度

DHPLC 法を用いて、Alagille 症候群の遺伝子診断を継続的に全国に提供することができた。当施設単独でこれまで 91 例の Alagille 症候群の臨床診断を受けた患者の解析を行い、48 例に変異を同定したことになる。内訳は、フレームシフト変異が 15 例、ナンセンス変異が 16 例、ミスセンス変異が 11 例、スプライシング変異が 5 例、遺伝子全体の変異が 1 例であった。中央遺伝子診断施設の設置により、全国からの診断依頼に応じることが十分に可能であることを示した。同様に PFIC の遺伝子診断法を確立した。（図例）



2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義

Alagille 症候群患者の一部は生体肝移植を受けることになる。大きな手術であるために、術前に遺伝子診断により確定診断を付けることが望ましい。また、血縁者間生体移植が行われる場合が多い。変異を有する患者をドナーとすることを避けるため、ドナー候補者の遺伝子診断を行うことが時に有意義である。

Alagille 症候群と類似する疾患に PFIC が挙げられる。JAG1,NOTCH2,PFIC の原因遺伝子群と順に検査を行うことにより分析に要する時間とコストが積算されることになる。

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。今般、DHPLC シーケンシング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。

3) 今後の展望

今後は、検査の低価格化・自動化が課題となる。海外ではここ1～2年の間に次世代シーケンサー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。次世代シーケンサー等の新技術を用いることにより上記の課題を克服できると期待される。自動化を行う場合には、多検体を同時に解析することにより検体あたりの分析コストの低減が期待できる。ここで Alagille 症候群は稀少疾患であり、全国の検体を限られた施設 (今回の研究では1施設)

に集積することは、効率化のための有用な戦略と考えられる。

今後にむけて2つの課題が残されている。まず、変異陽性例の病理所見を整理することである。遺伝子診断実施例の大部分において肝生検が行われている。これらの標本を用いて、組織化学的解析を行うことにより、疾患の本態の解明に近づくことができると期待される。もう一つの課題は、既知の疾患原因遺伝子に変異のない症例の解析である。全遺伝子の同時解析 (エクソーム解析研究) により、未知の疾患原因遺伝子が同定できると期待される。

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係わり、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、研究班の中で蓄積することができた。インフォームド・コンセントの内容に従い検体を保存し、研究協力者の再同意を経て、3)に示す展望に沿った効率的な研究展開が期待できる。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 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