

## 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

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：**新生児一過性肝内胆汁うっ滞を示す非症候性肝内胆管減少症（nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts、NS-PILBD）の肝組織および臨床像を検討し、病態について検討した。経験した NS-PILBD 15 例を対象としたが、11 例（73%）で周産期異常が認められ、周産期異常を有する 11 例中 7 例（64%）は「染色体異常や合併奇形」を伴っていた。NS-PILBD の小葉間胆管数対門脈域数比（BP 比）は、初回肝生検では 0.10～0.50（中央値 0.25）と正常以下であったが、追跡肝生検（日齢 237～397、n=5）では 0.64～1.00（中央値 0.82）と正常化していた。胆汁うっ滞は、生後 1 年までに全例で軽快し、新生児肝炎と同様に、血清  $\gamma$ -GTP のピーク値は血清直接ビリルビンのピーク値に遅れて認められた。NS-PILBD は一過性新生児肝内胆汁うっ滞の病態を示し、その病因には、周産期異常が関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

我々は、自験の新生児胆汁うっ滞 37 例では、胆道閉鎖症 13 例に対して新生児肝炎は 1 例のみであり、新生児肝炎の発生頻度が明らかに減少していることを報告した<sup>1)</sup>。その理由として、胎児あるいは新生児の環境変化、<sup>1)</sup> 種々の遺伝性・代謝性疾患が同定・解明された結果、新生児肝炎の割合が減少したためと考えた。

一方、自験例では、肝内胆汁うっ滞の成因の多くを非症候性肝内胆管減少症（nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts、NS-PILBD）が占めていた。そこで、NS-PILBD と診断された症例を肝組織および臨床像を検討し、その病態、さらに疾患概念そのものについて検討した。

### B. 研究方法

2003 年から 2011 年に精査・加療を要した新生児肝内胆汁うっ滞 26 例のうち、臨床症状と肝生検により NS-PILBD と診断した 15 例（全体の 58%）を対象とした。男児 12 例、女児 3 例で、入院時日齢 21～117（60 ± 30、中央値 53）、出生時体重 1157～3674g（2620 ± 648g、中央値 2542g）であった。男児 20 例、女児 21 例、入院時日齢 8～193（平均 74 ± 標準偏差 45、中央値 64）であった。

### C. 結果

#### 1. 周産期歴

15 例中 11 例（73%）で何らかの周産期異常を有していた（表 1）。さらに、NS-PILBD 15 例中 7 例（47%）、周産期異常を有する 11 例中 7 例（64%）において、染色体異常

や合併奇形などの先天異常を伴っていた（表2）。

## 2. 肝組織所見と経時的変化

肝組織所見では、小葉間胆管はわずかに散見されるものの、ほとんどは不明瞭であり、サイトケラチンによる免疫染色では、未熟な胆管成分が門脈域辺縁を縁取るような形で配列しているのが確認された。15例の初回肝生検（H-E染色）における小葉間胆管数対門脈域数比（BP比）は0.10～0.50（ $0.25 \pm 0.12$ 、中央値0.25）であった。巨細胞変性は15例中7例で認められたが、サイトメガロウイルス（CMV）免疫染色では全例陰性であった。

このうち5例において、日齢237～397（ $358 \pm 68$ 、中央値383）の時点で追跡肝生検を施行した。その結果、一部の門脈域で明瞭な管腔を有した小葉間胆管の出現を認め、BP比が0.64～1.00（ $0.86 \pm 0.16$ 、中央値0.82）と正常化していた。

## 3. 予後及び血清 $\gamma$ -GTP値

15例全例において、胆汁うっ滞性肝障害は生後1年までに軽快した。血清直接ビリルビンのピーク値は2.35～16.43 mg/dL（ $6.64 \pm 3.30$ 、中央値5.85）で、ピーク値日齢は22～177（ $70 \pm 43$ 、中央値53）であった。一方、血清 $\gamma$ -GTPのピーク値は177～3146 IU/L（ $698 \pm 756$ 、中央値381）で、ピーク値日齢は73～289（ $128 \pm 61$ 、中央値110）とD-Bilのピーク値日齢よりも遅れており、胆汁うっ滞の回復期に $\gamma$ -GTPの一過性上昇が認められた。

## D. 考案

肝内胆管減少症は小葉間胆管が減少もしくは欠如している病態であり、B/P比が0.5

以下（正常0.9～1.8）と定義されている。

このうち特徴的な肝外症状を伴わない（Alagille症候群ではない）疾患群をNS-PILBDと呼称してきた。NS-PILBDの原因・機序は不明とされ、基礎疾患として先天性疾患（先天代謝異常症、染色体異常など）、感染症（胎内感染など）に伴うことが多いが、原因の特定できない特発性が30～100%といわれてきた。予後も不定であり、Alagille症候群に比べて不良とされてきた<sup>2)</sup>。

Kahn<sup>3)</sup>（1991）は、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-PILBDであり、生後28日未満発症の非閉塞型直接型高ビリルビン血症の最も頻度の高い病態はNS-PILBD（33例中22例）であると述べている。Alagille<sup>4)</sup>も、PILBDの60%が症候性（Alagille症候群）、40%がNS-PILBDであったと述べている。Kahnら<sup>5)</sup>はNS-PILBD患児17例中16例がいわゆる未熟児であったと報告しているが、他の報告<sup>6) 7)</sup>では必ずしも低出生体重児、早産児、不当軽量児が多いということとはなかった。自験例のNS-PILBD 15例の多くでは「周産期異常や先天異常」を伴っていた。

また全例で生後1年までに胆汁うっ滞が軽快し、回復期に $\gamma$ -GTPの一過性上昇が認められた。これらの特徴は、Jacqueminら<sup>8-9)</sup>の「一過性新生児胆汁うっ滞」と極めて類似している。従って、NS-PILBDは独立した疾患概念ではなく、“特発性”新生児肝炎も含めて、すべて一過性新生児胆汁うっ滞と呼ぶべきなのかもしれない。

しかし、Jacqueminらの症例では、63例（90%）に肝細胞の巨細胞性変化、68例（97%）では明瞭な小葉間胆管を認めたと

述べている。この点で、新生児肝内胆汁うっ滞 26 例のうち 15 例(58%)において小葉間胆管減少を認めたわれわれの成績とは明らかに異なっている。<sup>1)</sup>

小葉間胆管減少の機序として、胆管の小葉間胆管の成熟過程の障害、虚血性傷害などが推測されている。また、回復期の $\gamma$ -GTPの一過性上昇の機序は、回復期の胆管上皮細胞の増生、あるいは胆汁排泄に伴う胆汁酸による胆管細胞障害などが推測される。

## E. 結論

我々の NS-PILBD 症例は、Jacquemin らの「一過性新生児胆汁うっ滞」とほぼ同様の臨床像を呈していた。NS-PILBD は、肝内胆汁うっ滞の成因として独立した疾患概念ではなく、“特発性”新生児肝炎も含めてすべて「一過性新生児胆汁うっ滞」の範疇にあるが、組織学的特徴(PILBD)を持つものと定義されるべきかもしれない。その病因としては、新生児肝炎と同様に、周産期異常が深く関与している可能性が示唆される。

## 【文献】

- 1) 田澤雄作、虻川大樹：新生児胆汁うっ滞の成因に関する検討。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，2010;28-31
- 2) 虻川大樹、田澤雄作：胆汁うっ滞。白木和夫，藤澤知雄，友政剛編著：小児消化器・肝臓病マニュアル，pp237-252，診断と治療社，東京，2003
- 3) Kahn E: Paucity of interlobular bile ducts. Arteriohepatic dysplasia and nonsyndromic duct paucity. *Perspect Pediatr Pathol* 1991;14:168-215.
- 4) Alagille D: Management of paucity of interlobular bile ducts. *J Hepatol* 1985;1:561-5.
- 5) Kahn E, Daum F, Markowitz J, et al: Nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts: light and electron microscopic evaluation of sequential liver biopsies in early childhood. *Hepatology* 1986;6:890-901.
- 6) Koçak N, Gürakan F, Yüce A, et al: Nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts: clinical and laboratory findings of 10 cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:44-8.
- 7) Yehezkel-Schildkraut V, Munichor M, Mandel H, et al: Nonsyndromic paucity of interlobular bile ducts: report of 10 patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37:546-9.
- 8) Jacquemin E, Lykavieris P, Chaoui N, et al: Transient neonatal cholestasis: origin and outcome. *J Pediatr* 1998;133:563-567.
- 9) Vajro P, Amelio A, Stagni A, et al: Cholestasis in newborn infants with perinatal asphyxia. *Acta Paediatr* 1997;86:895-898.
- 10) Wang JS, et al: Significance of low or normal serum gamma glutamyl transferase level in infants with idiopathic neonatal hepatitis. *Eur J Pediatr* 2006;165:795-801.
- 11) 田澤雄作. 新生児胆汁うっ滞-新生児肝炎およびシトリン欠損症による新生児肝内胆汁うっ滞(NICCD)を中心として. 小

児科診療 2011;74:638-644.

## **F.研究発表**

### 1. 論文発表

- 1) 田澤雄作:新生児胆汁うっ滞-新生児肝炎  
およびシトリン欠損症による新生児肝内  
胆汁うっ滞(NICCD)を中心として. 小児  
科診療. 74 638-644 2011
- 2) 入野博ほか: PFIC 1型および2型に  
おける肝機能検査値と尿中胆汁酸分析.  
日本小児栄養消化器肝臓学会雑誌 25  
6-12 2011
- 3) 虻川大樹: 新生児肝炎は今どこへ?. 小  
児内科 43 1018-1021 2011
- 4) 虻川大樹: 新生児肝炎. 小児科 52 3-9  
2011

## **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

表1 NS-PILBD 15例の周産期歴(1)

周産期異常 11例(73%)

内訳	早産児	5例	新生児仮死	1例
	低出生体重児	6例	低酸素性虚血性脳症	1例
	極低出生体重児	1例	低体温	1例
	低血糖症	4例	高リン血症	1例
	低血糖性脳症	1例	胎便栓症候群	1例
	完全静脈栄養	3例	呼吸窮迫症候群	1例
	胎児徐脈	2例	動脈管開存症	1例
	無呼吸発作	2例	播種性血管内凝固	1例
	乳び胸水・腹水	2例		

表2 NS-PILBD 15例の周産期歴(2)

先天異常 7例(47%)

症例1 染色体異常(21 trisomy)、先天性十二指腸狭窄、甲状腺機能低下症

症例2 染色体異常(21 trisomy)

症例3 染色体異常(2q部分欠失)、脳室拡大、両側上衣下嚢胞、外表奇形

症例4 多発奇形、膀胱尿管逆流

症例5 先天性眼振

症例6 門脈体循環シャント、末梢性肺動脈狭窄

症例7 心房中隔欠損症、肺動脈狭窄

## 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

研究分担者	鹿毛 政義	久留米大学病院 病理部 教授
共同研究者	谷川 健	久留米大学 病理学講座
共同研究者	水落 建輝	久留米大学 小児科学講座
共同研究者	関 祥孝	久留米大学 小児科学講座
共同研究者	柳 忠宏	久留米大学 小児科学講座
共同研究者	木村 昭彦	久留米大学 小児科学講座

**研究要旨** 様々な小児胆汁うっ滞症の肝組織に対して、肝細胞トランスポーター(ATP8B1、BSEP、MDR3、MRP2)の免疫組織化学的検討を行った。それぞれのトランスポーターの発現は疾患によっても、あるいは同一疾患でも、症例によって様々であった。組織学的に、再生小型肝細胞あるいは巨細胞性変化を示す肝細胞に BSEP 発現が減弱あるいは消失する傾向がみられた。小児胆汁うっ滞症においては、遺伝的なトランスポーター障害だけでなく、低酸素血症などによる合併症によっても、トランスポーターが傷害され、胆汁うっ滞の一因となる可能性が示唆された。また、トランスポーター強発現は、胆汁うっ滞に対する二次的な反応や他のトランスポーター障害に対する代償性変化である可能性が推察された。

### A. 研究目的

小児胆汁うっ滞症は様々な原因で起こる。肝細胞から毛細胆管へ胆汁成分排泄を担うのは肝細胞のトランスポーターである。肝臓には、種々のトランスポーターが存在するが、小児胆汁うっ滞症において、これらがどのように関連し、病態に関与するのか、詳細な検討はなされていない。本研究は、様々な小児の胆汁うっ滞症における肝細胞トランスポーターの関与について解明することを目的とする。

### B. 研究方法

対象症例は小児胆汁うっ滞症計 25 症例、年齢は 0 歳 1 か月～15 歳 3 か月（平均 2 歳 3 か月）、男性 13 症例、女性 12 症例である。症例の内訳は、胆道閉鎖症(BA)9 例、原発

性硬化性胆管炎(PSC)疑い 1 例、肝内胆管減少症(PILBD)疑い 3 例、良性反復性肝内胆汁うっ滞症(BRIC)1 例、原因不明 11 例である。対象症例の中には、感染症合併が 6 症例、低酸素血症合併が 4 症例、成長障害合併が 3 症例にみられた。なお、これらの対象症例の中で、15 症例は当講座へのコンサルテーション症例であり、このうち、3 症例は当研究班が作成した乳児黄疸ネットを介した症例であった。対象症例の内訳を表 1 に示す。

これらの対象症例の肝組織に対して、トランスポーター(ATP8B1、BSEP、MDR3、MRP2)の免疫組織化学的検討を行った。

### 倫理的配慮

研究の対象となった症例は診断のために

肝生検が施行された症例である。個人への危険性はなく、検体は匿名化し、そのプライバシーに細心の注意を払い、研究を遂行した。

### C. 研究結果

免疫組織化学の結果を表 1 に示す。

#### 免疫組織化学によるトランスポーター発現

ATP8B1 免疫組織化学は発現が弱く、胆汁うっ滞が高度な症例が対照症例となるため、発現強弱の判定は困難であり、発現の有無のみ判定した。

BA 9 例の病理組織所見は、全例に特徴とされる病理組織所見、すなわち、門脈域線維性拡大、小葉構築改変傾向、細胆管の著明な増生、胆汁栓を伴う胆汁うっ滞が見られた。免疫組織化学所見で、トランスポーターは全例に BSEP が不規則に強発現あるいは消失、MRP2 が強発現していた。MDR3 は対照症例と同等の発現であった。トランスポーター発現と肝組織所見との関連は別項で述べる。

BRIC の 1 例は臨床所見、病理組織所見、免疫組織化学所見にて本症が疑われ、遺伝子診断にて診断の確定ができた。臨床所見は、トランスアミナーゼや総胆汁酸が高値、 $\gamma$  GTP は正常値であった。本症例は、リファンピシン投与によって、胆汁うっ滞症状が改善した。病理組織所見では、肝細胞の敷石状配列、軽度の線維化が見られた。免疫組織化学所見で、トランスポーターは ATP8B1 が部分的に消失、BSEP および MRP2 が強発現していた。

PILBD 3 例は、免疫組織化学所見で、トランスポーターは BSEP 強発現 1 症例、MDR3 強発現 2 症例、MRP2 強発現 2 症例であった。

PSC 疑い 1 例の病理組織所見は PSC と

しても矛盾しない所見であり、門脈域線維性拡大、小葉間胆管消失がみられた。免疫組織化学所見で、トランスポーターは対照症例と同等の発現であった。

原因不明症例の中の 1 例は、臨床所見および病理組織所見、免疫組織化学所見から PFIC1 が強く疑われた。この症例の臨床所見はトランスアミナーゼや総胆汁酸が異常値、 $\gamma$  GTP は正常値であった。病理組織所見として、肝細胞敷石状配列、軽度の線維化がみられた。トランスポーター免疫組織化学は ATP8B1 陰性、BSEP 正常～減弱であった。これらの所見から、この症例は PFIC1 が強く疑われた。しかし、遺伝子診断が施行されていないため、診断が確定していない。

さらに、原因不明症例の中には、臨床所見および病理組織所見から PFIC1 あるいは PFIC2 が疑われる症例がみられた。PFIC1 が疑われた 2 症例において、臨床所見はトランスアミナーゼや総胆汁酸が異常値、 $\gamma$  GTP は正常値であった。病理組織所見として、肝細胞敷石状配列、軽度の線維化がみられ、PFIC1 に合致した。しかし、免疫組織化学所見で、トランスポーターは 2 症例とも、ATP8B1 が発現、BSEP が陰性あるいは不規則に減弱しており、通常の PFIC1 の発現態度と異なっていた。また、PFIC2 が疑われた 2 症例において、臨床所見はトランスアミナーゼや総胆汁酸が高値、 $\gamma$  GTP は正常値であった。病理組織所見は、小葉全体にわたる肝細胞巨細胞性変化、高度の線維化および炎症所見が見られ、PFIC2 に合致した。しかし、免疫組織化学所見で、トランスポーターは 2 症例とも BSEP が不規則に減弱しており、通常の PFIC2 の発現態度と異なっていた。

## 合併症とトランスポーター発現との関係

感染症がみられた 6 例では、ATP8B1 一部消失 2 例、BSEP 減弱あるいは消失 5 例、MDR3 減弱 2 例、MRP2 減弱 1 例、低酸素血症がみられた 4 例では、ATP8B1 一部消失 1 例、BSEP 減弱 4 例、MDR3 減弱 2 例、MRP2 減弱 1 例、成長障害がみられた 3 例では、ATP8B1 一部消失 1 例、BSEP 減弱 3 例、MDR3 減弱 1 例、MRP2 減弱 1 例であった。

## 肝組織所見とトランスポーター発現との関連

対象症例全例に対し、トランスポーター発現と組織学的変化との関連について検討した。組織学的に、再生小型肝細胞あるいは巨細胞性変化を示す肝細胞に BSEP 発現が減弱あるいは消失する傾向がみられた。ATP8B1、MDR3 および MRP2 発現の減弱あるいは消失については上記の傾向はみられなかった。

## D. 考察

今回対象とした様々な小児胆汁うっ滞症のほとんどが肝トランスポーター発現の異常を示した。免疫組織化学的にトランスポーター発現の減弱あるいは消失の所見からはトランスポーターの傷害が疑われる。トランスポーター自体の異常である PFIC などの疾患のみならず、胆道閉鎖症、あるいは、胆汁うっ滞による障害、感染症や低酸素血症などの合併症がトランスポーター傷害に関与している可能性が推察された。

臨床所見および病理組織所見から PFIC が疑われた症例において、免疫組織化学所見が一致しない症例がみられた。具体的には、病理組織所見では PFIC1 が疑われたが、免疫組織化学所見では PFIC2 が示唆される所見であった。これらの症例は遺伝子診断が未施行であり、確定診断はついていな

い。しかしながら、PFIC 症例のなかには、特徴とされている組織形態所見を呈さない症例が存在し、PFIC の組織学的スペクトラムが広いことが示唆された。

## E. 結論

小児胆汁うっ滞症において、トランスポーター異常症のみならず、BA をはじめとした種々の疾患においても、肝トランスポーター傷害があり、胆汁うっ滞の病態に関与している可能性が考えられた。

PFIC1 および 2 はそれぞれ特徴的な肝病理組織像が報告されているが、PFIC が疑われる症例の中には、病理組織像とトランスポーター免疫組織化学所見が解離していると思われる症例があり、このような症例では確定診断に遺伝子診断が必要であると考えられた。

遺伝的なトランスポーター障害だけでなく、低酸素血症などによる合併症によっても、トランスポーターが傷害される可能性が示唆された。トランスポーター傷害が小児胆汁うっ滞の病態に関与していることが示唆された。

組織学的に再生性変化や巨細胞性変化を示している部分に BSEP 発現が減弱あるいは消失している傾向がみられた。

原因不詳の小児胆汁うっ滞症において、乳児黄疸ネットを通して、コンサルテーションを行うことが有用であると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Asakawa T, Yagi M, Tanaka Y, Asagiri K, Kobayashi H, Egami H, Tanikawa K, Kage M. : The herbal medicine Inchinko-to reduces hepatic



fibrosis in cholestatic rats,  
Pediatric Surgery  
international. 2011 in press

- (2) 谷川 健、鹿毛政義、八木 実  
胆汁うっ滞の病理  
小児内科 43 巻 6 号 992-999  
ページ

2. 学会発表  
2012年4月日本病理学会 示説発表予定

#### H. 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

表1 対象症例内訳

症例	年齢		性	臨床診断	合併症			ATP8B1	BSEP	MDR3	MRP2
	歳	ヶ月			感染症	低酸素血症	成長障害				
症例1	0	2	M	胆道閉鎖症				+	++ ~ -(不規則)	+	++
症例2	0	1	F	胆道閉鎖症				+	++ ~ -(不規則)	+	++
症例3	0	1	F	胆道閉鎖症				+	++ ~ -(不規則)	+	++
症例4	0	2	M	胆道閉鎖症				+	++ ~ -(不規則)	+	++
症例5	0	1	M	胆道閉鎖症				+	++ ~ -(不規則)	+	++
症例6	0	2	F	胆道閉鎖症				+	++ ~ -(不規則)	+	++
症例7	0	1	F	胆道閉鎖症				+	++ ~ -(不規則)	+	++
症例8	0	1	F	胆道閉鎖症				+	++ ~ -(不規則)	+	++
症例9	0	2	F	胆道閉鎖症				+	++ ~ -(不規則)	+	++
症例10	0	4	F	PFIC1疑い				-	+	+	+
症例11	0	11	F	PFIC1疑い			+	+	±(不規則)	ND	++
症例12	0	1	M	PFIC1疑い	+	+		+	±(不規則)	±(不規則)	++
症例13	0	1	M	PFIC2疑い	+	+	+	+	±	ND	++
症例14	0	3	M	PFIC2疑い	+	+		+	±	ND	++
症例15	7	0	M	BRIC1	+			一部消失	++	ND	++
症例16	13	0	F	PILBD疑い				+	+	++	++
症例17	0	6	M	PILBD疑い				+	++	++	++
症例18	0	6	M	PILBD疑い				ND	+	ND	+
症例19	3	0	M	PSC疑い				+	+	+	+
症例20	0	4	F	早産、超低出生体重、TPN	+	+	+	一部消失	±	±	±
症例21	5	5	M	原因不明	+			+	-	ND	+
症例22	0	1	M	原因不明				一部消失	±	-	+
症例23	15	3	F	原因不明				ND	ND	ND	ND
症例24	0	1	F	原因不明				+	+	ND	ND
症例25	0	2	M	原因不明				+	+	ND	+

ND: not done

±: 対照に比して発現減弱

+: 対照と同等の発現

++: 対照に比して発現増強

ATP8B1免疫組織化学は発現が弱く、対照に胆汁うっ滞症例を使用しているため、発現増減の判定は困難であり、発現の有無のみ判定。

BSEP: bile salt export pump

MDR3: multidrug resistance P-glycoprotein 3

MRP2: multidrug resistance-associated protein 2

## 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

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 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

シトリン欠損症は、SLC25A13 遺伝子異常により発症し、新生児期から乳児期早期には胆汁うっ滞を呈し、NICCD と呼ばれる。わが国における NICCD の診断は、そのほとんどが分子遺伝学的に可能であるが、数%の症例では既知の遺伝子変異が検出されない。乳児期の脂肪変性を伴う乳児肝炎では肝組織のシトリン蛋白を検出することが確定診断や除外診断の一助になり得る可能性がある。

#### A. 研究目的

原因不明の乳児胆汁うっ滞性肝炎におけるシトリン欠損症診断法の検討。

#### B. 研究方法

原因不明の脂肪変性を伴う乳児肝内胆汁うっ滞性肝炎において、肝内のシトリン蛋白の検出によりシトリン欠損症の診断を行った。

[症例]1 歳、男児。主訴：肝機能異常。現病歴：父はニュージーランド人、母は日本人でニュージーランド在住。生後 4 か月から体重増加不良と肝機能異常がみられ、ニュージーランドの小児病院にて精査を受け、脂肪肝炎と診断された。極長鎖脂肪酸；異常なし。尿有機酸分析；異常なし。カルニチン分画；異常なし。血中アミノ酸分析ではシトルリン 9.0nmol/ml、スレオニン 304nmol/ml、セリン 158.0nmol/ml。

Jagged-1 遺伝子異常なし。脂肪肝炎の原因がわからず、帰国して前医を受診し当センター紹介となった。入院時現症：身長 70.1cm(<3%ile)、体重 8.26kg(3%ile)、顔貌は Alagille 様、high pitched voice であった。肝脾腫なし。Gross motor の遅れあり。入院時検査所見：AST 60 IU/l、ALT 38 IU/l、T.bil 0.4 mg/dl、D.bil 0.2 mg/dl、 $\gamma$  GTP 25 IU/l、総胆汁酸 2.2  $\mu$  mol/l、PSTI 80.1 ng/ml と PSTI のみ高値を認めた。

肝生検では、大小混合の脂肪滴が約 30-40%にみられた。門脈域は線維性に拡大しているが、炎症細胞浸潤は軽度で小葉間胆管は保たれていた(図 1)。

シトリン蛋白の発現の検討については、同時に採取した肝組織とすでに遺伝子診断されているシトリン欠損症症例([II] IVS11+1G>A)の肝組織をホモジェナイズして可溶化 (QIGEN; Qprptenome

Mammalian Protein Kit)したのち Sample 処理を行った。泳動装置を実施後 Blotting 装置セットにて電気転写を行った。電気転写後、メンブレンを取り出して、ブロッキングバッファー(ATTO; Ez Block)に浸して 4°C over night で保存した。その後、一次抗体 (Abcam: Mouse monoclonal 抗 SLC25A13 抗体) 添加して室温で振とうし、洗浄後、二次抗体 (Santa Cruz Biotechnology: Goat-anti-mouse IgG-HRP 抗体) 添加し再度振とうした。再びメンブレンを洗浄後、HRP 用発色試薬(ATTO: Ez West Blue)を用いて発色させた。

(倫理面への配慮)

本研究について、患児の家族に検査の必要性を説明し、書面で同意を得た。

### C. 研究結果 (図 2)

遺伝子診断されている症例の肝組織ではシトリン蛋白は検出されなかったが、本症例では検出され、シトリン欠損症は否定的であった。

### D. 考察

シトリン欠損症は、SLC25A13 遺伝子異常により発症し、新生児期から乳児期早期には胆汁うっ滞を呈し、NICCD と呼ばれる。わが国における NICCD の診断は、そのほとんどが分子遺伝学的に可能であるが、数%の症例では既知変異が検出されない。

本症例では、NICCD に特徴的なアミノ酸 profile は認められず、特異な食癖もみられなかった。しかし、肝組織所見では、脂肪変性と炎症がみられ、PSTI も高値であり、NICCD 類似の病態が考えられた。父親がニ

ューゼーランド人であり、食癖を診断の手掛かりにすることができず、既知の遺伝子変異が検出されない可能性が考えられた。

### E. 結論

既知の遺伝子変異が検出されない乳児期の脂肪変性を伴う胆汁うっ滞症では肝組織のシトリン蛋白の検出を検討することが診断の一助になり新たな症例を見いだせる可能性がある。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Komatsu H, Sugawara H, Inui A, Nagamine K, Hiejima E, Sogo T, Fujisawa T. : Dose the spread of hepatitis B virus genotype A increase the risk of intrafamilial transmission in Japan?, J Infect Chemother. 2011 Apr;17(2) 272-277
- (2) Tahara M, Sakai H, Nishikomori R, Yasumi T, Heike T, Nagata I, Inui A, Fujisawa T, Shigematsu Y, Nishijima K, Kuwakado K, Watabe S, Kameyama J. : Patient with neonatal-onset chronic hepatitis presenting with mevalonate kinase deficiency with a novel MVK gene mutation., Mod Rheumatol. 2011 (Epub ahead of print)
- (3) Hiejima E, Komatsu H, Takeda Y, Sogo T, Inui A, Okafuji I, Nishikomori R, Nakahata T, Fujisawa T. : Acute liver failure young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis

without macrophage activation syndrome: Report of two cases., J Pediatr Child Health. 2011 (Epub ahead of print)

- (4) 須磨崎亮、乾あやの、位田忍、長田郁夫、松井陽、虫明聡太郎：小児の急性肝不全，小児科 2011 52(1) 43-52
- (5) 藤澤知雄：劇症肝炎（急性肝不全），小児内科 2011 43(1) 89-92 (20) 藤澤知雄：小児肝外胆汁うっ滞症候群，別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 176-179
- (6) 十河剛、村山昌俊、小松陽樹、乾あやの、藤澤知雄：肝性昏睡（肝性脳症），小児内科 2011 43(3) 598-602
- (7) 十河剛、村山昌俊、小松陽樹、乾あやの、藤澤知雄：胆汁うっ滞に対する内視鏡的逆行性胆管造影法 小児内科 2011 43(6)1064-1068
- (8) 乾あやの：小児の黄疸，日本医師会雑誌 2011 140 特別号(2) S316-S319
- (9) 日衛嶋栄太郎、十河剛、小松陽樹、乾あやの、藤澤知雄：良性反復性肝内胆汁うっ滞，小児内科 2011 43(6) 1038-1041
- (10) 角田 知之、乾あやの：皮膚が黄色い，小児内科 2011 43(10) 1646-1649
- (11) 藤澤知雄：序：胆汁うっ滞—診療の最先端，小児内科 2011 43(6) 965-966
- (12) 小松陽樹：便の色の異常，小児内科 2011 43(10) 1643-1645
- (13) 藤澤知雄：1 か月健診での黄疸の対応について教えてください，児内科

2011 43(増刊号) 226-228

## 2.学会発表

- (1) 角田知之、西村謙一、村山昌俊、十河剛、小松陽樹、乾あやの、小崎健次郎、鹿毛政義、長坂博範、林久允、杉山雄一、藤澤知雄：搔痒を伴う小児肝内胆汁うっ滞症例に対するフェニル酪酸の効果，第 28 回日本小児肝臓研究会 (2011, 7/16-17 つくば)
- (2) 村山昌俊、釧持孝博、山口健史、時田裕介、十河剛、小松陽樹、乾あやの、藤澤知雄：内科的に救命した急性肝不全の一例，第 311 回日本小児科学会神奈川県地方会 (2011, 6/18 横浜)
- (3) 十河剛、垣内俊彦、乾あやの、笠原群生、藤澤知雄：小児の劇症肝不全における新『劇症肝炎に対する肝移植適応ガイドライン』の有用性の検討，第 38 回日本小児栄養消化器肝臓学会 (2011, 10/8-9 盛岡)

## 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

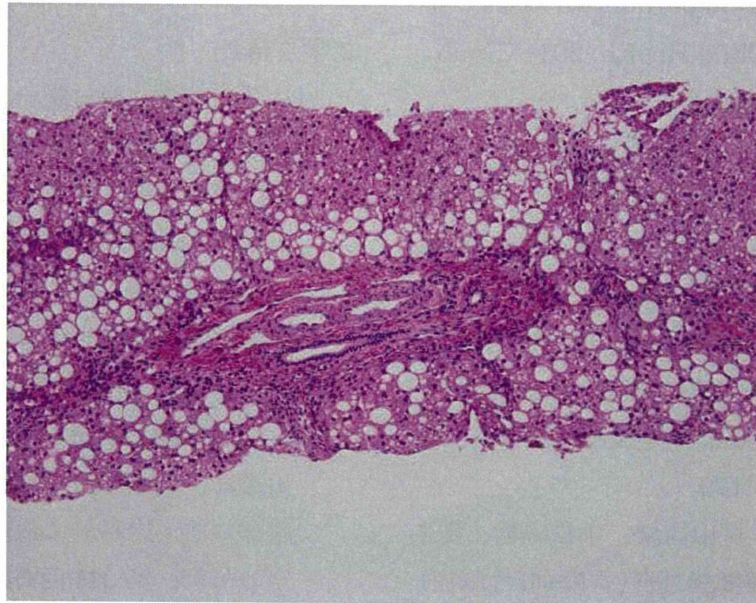


図1: HE染色 × 100

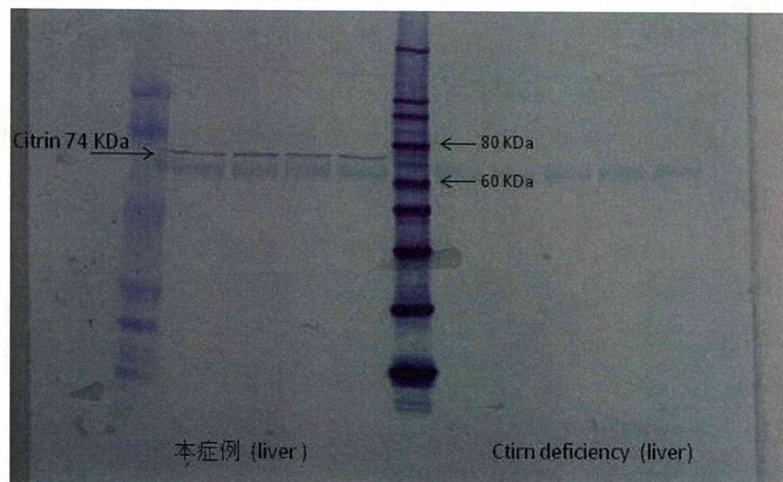


図2: Western blot法を用いたシトリン蛋白の検出

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 $\alpha$ -hydroxylase の診断について

研究分担者 木村 昭彦 久留米大学小児科

**研究要旨**

平成 21 年から 23 年の 3 年間、我々は遺伝性胆汁うっ滞性疾患である胆汁酸代謝異常症の早期発見および治療について研究して来た。今回、胆汁酸分析において多量の 3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>24</sub> bile acid を検出し oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症を疑った胆汁うっ滞症を 3 例経験した。この 3 例（これらは、遺伝子検索の結果、2 例は oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症で 1 例は 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/isomerase 欠損症と診断された）について、診断に 3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub> bile acid (3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid) および 27-hydroxycholesterol の検出が重要か否かを検討した。その結果、3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid は尿では検出されず、血清で oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症にのみ検出された。また、27-hydroxycholesterol は oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症の尿で検出された。しかしながら、3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/isomerase 欠損症では、これら物質はいずれも検出されなかった。

以上より、胆汁酸分析で多量の 3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>24</sub> bile acid を検出し oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症を疑った場合、直ちに 3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid と 27-hydroxycholesterol の同定を試みる必要があると考えられた。これらの検出は、oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症の診断に非常に有用で、遺伝子診断をまたずして治療に踏み切る事が可能であり、本物質の同定は遺伝子診断と同様 oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症の確定診断に重要と考える。

**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 を高めることにある。oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症は現在までに 4 例報告があり、その

内 3 例は肝移植が行われ、1 例のみ早期発見され内科的治療で経過良好である。そこで今回、診断開始時に胆汁酸分析で多量の 3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>24</sub> bile acid を検出し本症を疑い遺伝子診断を行った 3 症例について、3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub> bile acid

(3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenic acid) と、27-hydroxycholesterol の検出を試み、早期発見が可能かどうか、またこの検査は重要であるかを検討した。

## B. 研究方法

1. 患者1：5か月男児（台湾人）、遷延性黄疸、灰白色便の精査目的で肝機能検査を行った。T-Bil/D-Bil 6.4/4.3 mg/dL、AST/ALT 1080/358 U/L、 $\gamma$ -GTP 45 U/L、と胆汁うっ滞型肝障害を認めた。 $\gamma$ -GTP が正常値のため胆汁酸代謝異常症を疑い、GC-MS を用いて血清および尿中胆汁酸分析を行った。その結果、3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>24</sub> bile acid を多量に検出（血清中 86.6%、尿中 86.9%）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 exon 3 における R112→Stop hmoozygote、を認めた。UDCA で加療するも肝不全へ進行したため、9か月時に生体肝移植を行った。しかしながら移植後感染を起し死亡した。
2. 患者2：6か月男児、遷延性黄疸の為、精査目的で肝機能検査を行った。T-Bil/D-Bil 5.2/3.1 mg/dL、AST/ALT 362/384 U/L、 $\gamma$ -GTP 33 U/L、と胆汁うっ滞型肝障害を認めた。 $\gamma$ -GTP が正常値のため胆汁酸代謝異常症を疑い、GC-MS を用いて血清および尿中胆汁酸分析を行った。その結果、3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>24</sub> bile acid を多

量に検出（血清中 64.7%、尿中 84.3%）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が mutation はみられなかった。そこで、再度胆汁酸分析をしたところ、血清では 3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>24</sub> bile acid の検出はなく他の 3 $\beta$ -不飽和胆汁酸を検出した。以上より、3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/isomerase 欠損症を疑い遺伝子解析を行ったところ、患者では *HSD3B7* に V132F、T149I さらに 956,insCCTGC の heterozygote を認めた、父親に 956,insCCTGC heterozygote、母親に V132F と T149I の heterozygote を認めた。診断後、chenodeoxycholic acid (CDCA) 療法で症状の改善を見ている。本症の最終診断は、これらの結果から 3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/isomerase 欠損症とした。

3. 患者3：6か月女児、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 を用いて血清および尿中胆汁酸分析を行った。その結果、3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>24</sub> bile acid を多量に検出（血清中 84.9%、



尿中 (82.7%) 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。UDCA で加療するも肝不全へ進行したため、8 か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。

4. 方法：3 例の血清・尿中の 3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid を GC-MS で同定、さらに尿を用いて 27-hydroxycholesterol を GC-MS で同定することを試みた。

### C. 研究結果

これまで、われわれは、胆汁酸分析結果で 3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>24</sub> bile acid を多量に検出することと遺伝子検索により oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症を診断してきた。しかし、今回の研究で得た結果は、3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid は、尿では検出されず血清中に検出され、しかも oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症にのみ検出した (図 1)。また、27-hydroxycholesterol は oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症の尿中に検出した (図 2, 3)。しかしながら、3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/isomerase 欠損症では、いずれの物質も検出されなかった (図 1, 2)。したがって、遺伝子診断同様

3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid と 27-hydroxycholesterol の同定は、oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症の診断に重要と考えた。

このことは、本症の第 1 例目を報告した Setchell とも論文の中で述べていたが遺伝子診断と同様に重要とは述べていない。われわれは、これらの物質の同定は遺伝子診断と同等の評価をされるものと考える。

ところで患者 2 は、病初期には oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 活性が低く、その後徐々に活性が高まり、今回のような胆汁酸分析結果となったと考えられた (図 4)。したがって、新生時期には acidic pathway がまだ主代謝経路であるものが存在するとともに、本酵素の活性が低いものも存在すると考えられる。

まとめると、胆汁酸分析で多量の 3 $\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>24</sub> bile acid を検出し oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症を疑った場合、直ちに 3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid と 27-hydroxycholesterol の同定を試みる必要があり、これらの同定は、oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症の診断に非常に重要で、遺伝子診断をまずして治療に踏み切る事が可能であり、本物質の同定は遺伝子診断と同様 oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症の確定診断に重要と考える。

### D. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Mizuochi T, Kimura A, Suzuki M, Ueki I, Takei H, Nittono H, Kakiuchi T, Shigeta T,

- Sakamoto S, Fukuda A, Nakazawa A, Shimizu T, Kurosawa T, Kasahara M : Successful Heterozygous Living Donor Liver Transplantation for an Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Deficiency in a Japanese Patient. Liver Transpl 2011;17:1059-1065.
- (2) Seki Y, Matsushita M, Kimura A, Nishiura H, Aoki K, Inokuchi T, Mizuochi T, Kurosawa T, Kimura Y, Matsuishi T : Maternal and fetal circulation of unusual bile acids: a pilot study. Pediatr Int 2011;53:1023-1033.
- (3) 木村昭彦 : 胆汁酸, ビリルビンの肝細胞内輸送. 小児内科 2011;43:987-991.
- (4) 水落建輝, 木村昭彦 : 先天性胆汁酸代謝異常. 小児内科 2011;43:1042-1045.
2. 学会発表
- (1) 木村昭彦, 関 祥孝, 水落建輝, 植木 勲, 鈴木光幸, 橋本卓史, 武藤晃奈, 武井 一, 入戸野博 : 3 $\beta$ -Monohydroxy- $\Delta^5$ 胆汁酸尿症を呈した乳児胆汁うっ滞症 2 例の診断. 第 20 回日本小児胆汁酸研究会 2011.2.12 (東京)
- (2) 関 祥孝, 水落建輝, 木村昭彦, 武藤晃奈, 武井 一, 入戸野博, 保科隆之, 井原健二 : SRD5B1 遺伝子解析で compound heterozygote を同定した 3-oxo- $\Delta^4$ -steroid 5 $\beta$ -reductase 欠損症の 1 例. 第 20 回日本小児胆汁酸研究会 2011.2.12 (東京)
- (3) 水落建輝, 弓削康太郎, 西浦博史, 木村昭彦, 谷川 健, 鹿毛政義, 武藤晃奈, 武井 一, 入戸野博, 田中 篤, 滝川 一 : リファンピシンが奏功した肝内胆汁うっ滞症 (BRIC-1) の遺伝子解析と胆汁酸分析. 第 20 回日本小児胆汁酸研究会 2011.2.12 (東京)
- (4) 白石暁, 西尾寿乗, 保科隆之, 井原健二, 原寿郎, 水落建輝, 関祥孝, 木村昭彦, 入戸野博 : 3-oxo- $\Delta^4$ -Steroid-5 $\beta$ -reductase 欠損症の 1 例. 第 463 回日本小児科学会福岡地方会 2011.2.12 (福岡)
- (5) 水落建輝, 柳 忠宏, 関 祥孝, 牛島高介, 木村昭彦, 谷川 健, 鹿毛 政義, 武藤晃奈, 武井 一, 入戸野博, 田中 篤, 滝川 一 : 肝内胆汁うっ滞に対するリファンピシン作用機序の解析. 第 28 回日本小児肝臓研究会 2011.7.16-17 (茨城)
- (6) 関 祥孝, 水落建輝, 保科隆之, 井原健二, 武藤晃奈, 武井 一, 入戸野博, 木村昭彦 : サイトメガロウイルス肝炎を合併した 1 次性 5 $\beta$ -reductase 欠損症の新規例. 第 28 回日本小児肝臓研究会 2011.7.16-17 (茨城)
- (7) 水落建輝, 鈴木光幸, 垣内俊彦, 重田孝信, 春名英典, 植木 勲, 清水俊明, 入戸野博, 笠原群生, 木村昭彦 : Oxysterol7 $\alpha$  欠損症に対する遺伝子解析と生体肝移植—世界初の肝移植救命例の報告—. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011.8.12-14 (東京)
- (8) 関 祥孝, 水落建輝, 植木 勲, 鈴木

- 光幸, 橋本卓史, 武井 一, 入戸野博,  
木村昭彦 :  $3\beta$ -monohydroxy- $\Delta^5$ 胆汁酸  
尿症を呈した乳児胆汁鬱滞症の2例.  
第114回日本小児科学会学術集会  
2011.8.12-14 (東京)
- (9) 虻川大樹, 角田文彦, 武井 一, 武藤  
晃奈, 吡野 篤, 木村昭彦, 入戸野博 :  
家族性進行性肝内胆汁うっ滞症1型に  
おける部分的胆汁外瘻造設前後の胆汁  
酸分析. 第38回日本小児栄養消化器肝  
臓学会 2011.10.8-9 (岩手)
- (10) 武井 一, 武藤晃奈, 吡野 篤, 入戸  
野博, 水落建輝, 木村昭彦, 飯田 隆,  
清水俊明, 大竹 明, 村井 毅, 黒澤  
隆, 藤間貞彦 :  $\Delta^4$ -3-oxo-steroid  
 $5\beta$ -reductase 欠損症のタンデムマスに  
よる新生児スクリーニングの検討. 第  
38回日本小児栄養消化器肝臓学会  
2011.10.8-9 (岩手)
- (11) 関 祥孝, 水落建輝, 植木 勲, 武藤  
晃奈, 武井 一, 入戸野博, 木村昭彦 :  
本邦における胆汁酸代謝異常症の現状.  
第38回日本小児栄養消化器肝臓学会  
2011.10.8-9 (岩手)

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

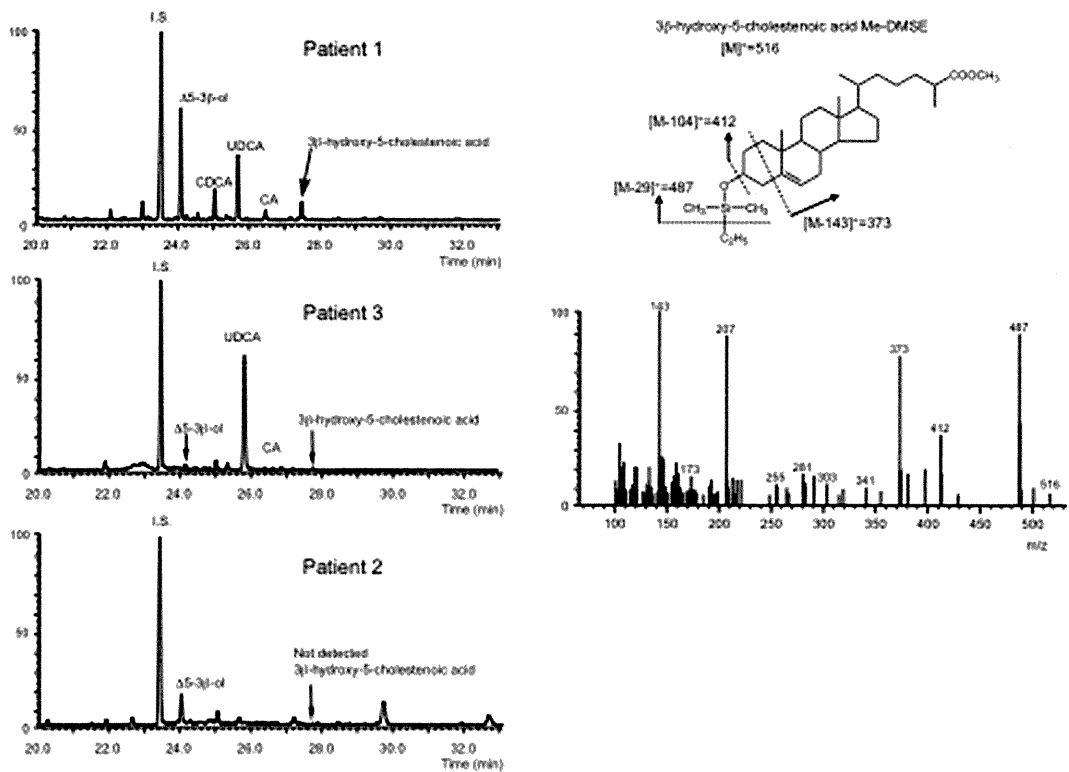


図1.患者1と3 (oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase 欠損症) で血清中に 3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid を検出した。ところが、3 $\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -C<sub>27</sub>-steroid dehydrogenase/isomerase 欠損症では検出されなかった。尿中には3症例とも検出されなかった。右図は Me-DMES 化した時の 3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid の構造式とマススペクトラムである。