

201128123B

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 22 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 須磨崎 亮

平成 24(2012)年 3 月

目 次

I. 研究班組織(平成21年～平成23年)	1
II. 総合研究報告書	
研究代表者総合研究報告書	
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	3
須磨崎 亮	
研究分担者総合研究報告書	
1. 臨床データのマネジメントと解析	11
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	14
小崎 健次郎	
3. Alagille症候群をふくめた新生児胆汁うっ滞の診断とその問題点 「新生児胆汁うっ滞の病因の変遷～特に非徴候性肝内胆管減少症について」 ..	17
田澤 雄作	
4. 小児胆汁うっ滞症における肝組織形態所見と肝細胞トランスポーターの 免疫組織化学的検討	21
鹿毛 政義	
5. 原因不明の胆汁うっ滞性疾患における診断の可能性	26
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	34
木村 昭彦	
7. 「乳児胆汁うっ滞を来すミトコンドリア肝症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	39
村山 圭	
III. Alagille症候群診断基準(案)	45
IV. 診断支援サイト	
遺伝性胆汁うっ滞性疾患の診断ガイドライン「乳児黄疸ネット」	47
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	95

I . 研究班組織

(平成 21 年～平成 23 年)

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」

平成21年～平成23年度 研究班組織

区 分	氏 名	所 属 機 関 名 ・ 職 名
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
	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 室長
	木村 昭彦	久留米大学医学部小児科学教室 講師
	田澤 雄作	独立行政法人国立病院機構仙台医療センター 総合成育部 総合成育部長
	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
	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

II. 総合研究報告書

研究代表者

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 症候群は遺伝性胆汁うっ滞性疾患の中で最も頻度が多く、かつ多彩な症状と多臓器の異常を伴う遺伝性疾患である。本研究班では本症について全国疫学調査を行い、新たな診断基準を定め、患者さんの抱える問題点を明らかにした。さらに、Alagille 症候群と類縁の進行性家族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、シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症、新生児肝炎症候群などについて班研究を行い、これらをまとめて乳児胆汁うっ滞性疾患の診断ガイドラインを作成した。このガイドラインは関連学会で検討され、学会のホームページ上に公開され、全国で利用されるようになった。

我が国の Alagille 症候群の患者数は 200～300 名程度と推定された。本症の診断方法としては、84%が主として臨床的な症候によって診断されており、遺伝子診断の利用は少数例に留まっていた。一方、熱変性高速液体クロマトグラフィー法 (DHLPC)－シーケンシング法の導入によって、遺伝子診断がより簡便に実施できることが明らかになった。本症患者 92 例について詳細な臨床データが蓄積された。24 %の症例で肝移植が行われていた。本症患者で高率にみられる合併症の多くは肝胆道系の異常に関連しており、胆汁うっ滞による黄疸、高コレステロール血症、搔痒感、ビタミン K 欠乏、多発性黄色腫が主なものであった。循環器系では 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。合併奇形としては、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。欧米で報告の多い脳血管系の異常や腎泌尿器系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が重要であることが判明した。

乳児肝内胆汁うっ滞の中には、本症以外にも多数の類縁疾患が含まれており、これらの疾患を正確に鑑別するためには、詳細な臨床データの解析に加えて、免疫染色を含む肝病理学的検査、尿中胆汁酸分析、肝組織を用いたミトコンドリア呼吸鎖複合体の解析、各種の遺伝子検査など、多種類の特殊な検査を効率的に用いる必要性が確認された。乳児肝内胆汁うっ滞性疾患の正確な診断に基づいて、適切な治療法を選択することが予後や QOL の飛躍的な改善につながると考えられる。そこでこれらの成果をまとめて診断ガイドラインを作成した。これは第 28 回日本小児肝臓研究会と本研究班の公開シンポジウムで広い立場から検討され、一部内容を修正の上、日本小児栄養消化器肝臓学会のホームページ上に公開された。現在、「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、このサイトの利用回数は月間約 800 回に達しているため、広く活用されていると推測された。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し、これらの疾患の予後が改善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
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
木村昭彦 久留米大学医学部医学科
小児科学講座 講師

田澤雄作 国立仙台医療センター
小児科 総合成育部長
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
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(以下、ALGSと略す)は遺伝性胆汁うっ滞性疾患の中で最も頻度が高く、常染色体優性遺伝形式をとる疾患である。本症は肝内胆管の減少という肝病理所見と共に、胆汁うっ滞、心血管奇形、椎体の異常、眼球の異常、特異的な顔貌などの臨床症状を伴う症候群として記載された。その後、病因遺伝子として*JAG1*遺伝子や*NOTCH2*遺伝子の変異が同定され、臨床病理学的な従来の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、またこれらの疾患相互の鑑別が臨床的に大きな問題となっている。そこで、本研究班では、以下を目的に調査・研究を行った。

- 1) 本邦におけるALGS患者の実態を明らかにするために全国調査を実施して、患者数の把握、診断方法の現状、患者さんの抱える問題点を明らかにする。
- 2) 近年新たに導入された遺伝学的診断法を本症の診断にどのように役立てるかという観点に重点を置いて、ALGSの新たな診断基準案を作成する。
- 3) ALGSの簡便な遺伝子診断法を開発する。
- 4) ALGSの類縁疾患、すなわち進行性家族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、シトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症、新生児肝炎症候群などの乳児胆汁うっ滞性疾患について、疫学情報や診断・治療法を明らかにする。

- 5) これらをまとめて、診断ガイドラインを作成し、これを全国の臨床現場で使用できるように発信する。
- 6) これらの研究を進める過程で、必要な患者さんの生体資料を集積して、他の研究者にも利用できる体制を整える。

B. 研究方法

1. Alagille症候群

1.1. 全国調査

一次調査では、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、並びに日本全国の主要な小児外科施設を対象として、はがきによる一次調査を実施した。二次調査では、ALGS患者の診療経験を有する施設に、臨床データ分析するための調査用紙を郵送した。重複登録症例や、不完全回答例を除く92例のALGS患者について、解析した。全ての臨床データは、国立成育医療研究センター臨床研究推進室に集積した。特に侵襲的な治療が行われた症例や重大な合併症を伴った症例を対象に、三次調査を行って臨床経過の詳細を明らかにした。

1.2. 新たな診断基準案の策定

PubMedで調査し得た2000年以降に発表されたALGSに関する論文45編、米国NIHのデータベース2か所（OMIM: Online Mendelian Inheritance of Man 及び GARD:Genetic And Rare Diseases Information Center）を参考に、本邦の現状に合致した診断基準案を作成した。

1.3. 遺伝子診断法の開発

臨床的にALGSと診断された患者の血液からDNAを抽出し、遺伝子診断法について検討した。

2. その他の疾患について診断法の開発

全ての病理学的検索は久留米大学病院病理部で一括して行われた。先天性胆汁酸代謝異常症はガスクロマトグラフィ/質量分析法による異常胆汁酸の有無と直接塩基配列決定法による当該遺伝子の検索によって診断された。臨床的にミトコンドリア呼吸鎖異常症を疑われた症例から得られた検体について、ミトコンドリア分画を単離し、各呼吸鎖酵素活性とBlue-native 電気泳動法による呼吸鎖複合体蛋白量を測定した。さらに、これらで異常が認められた場合には、ミトコンドリアDNAの枯渇があるか否かを調べる目的で、定量的PCR法によりミトコンドリアDNAの比較定量を行った。シトリン欠損症の遺伝子診断はReal time PCR法を用いて行われた。

3. 乳児胆汁うっ滞症の診断ガイドラインの作成

研究班に所属する研究者が全員で分担して、乳児胆汁うっ滞症の診断ガイドラインの原案を執筆し、相互に査読して草案を完成した。この案を第28回日本小児肝臓研究会と本研究班主催の公開シンポジウムで検討、加筆訂正した。この診断ガイドラインは、日本小児栄養消化器肝臓学会の了解をえて、そのホームページ上に公開された。

(倫理面への配慮)

各分担研究者の所属施設における倫理基準を遵守した。

C. 研究結果

1. Alagille症候群

1.1. 全国調査

全国の小児診療を行う621施設に一次調査用紙を郵送し、367施設（59%）から回答を得た。全国61施設から114例の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名と推定される。一方、日本肝移植研究会のALGS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。

二次調査により治療法や合併症について詳細な臨床データが蓄積された92例について、その内容を検討した。ALGS患者では、大きな侵襲を伴う治療として、肝移植が24%、心臓手術が4%、カテーテル治療が9%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。

三次調査により、ALGSにおける肝移植の主たる適応は肝不全または強い搔痒感であること、ほとんどが3歳未満の乳幼児に移植され、血縁者をドナーとする生体肝移植であることが判明した。また、葛西術の既往のある肝移植例は4例で詳細なデータが判明し、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。肝移植前のChild-Pugh分類は、A3例、B5例、C7例、不明7例で、ALGSの肝移植では必ずしも、胆汁う

うっ滞性肝硬変が進行していなくとも、強い搔痒感が移植理由となっていることが再確認された。血縁者ドナーでは症状の少ないAGLSであるか否かの検索が必要である。実際、移植前から父親が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。このためのドナー検査としては、肝生検が6例、DIC-CTが5例、MRCPが3例で行われていたが、遺伝子検査の実施は2例に留まっていた。心臓手術やカテーテル治療が行われた12例中5例の予後は、NYHA機能分類で、I度2例、II度2例、III度1例であった。

長期にわたる合併症として、発達遅滞が26%に、成長障害が49%に認められた。二次調査で詳細なデータの得られた92症例で検討すると、身長が-2SD以下は45%、体重の-2SD以下は21%であった。各臓器系に分けて合併症を解析すると、肝胆道系の異常に関連した項目が多くを占め、胆汁うっ滞による黄疸、高コレステロール血症、搔痒感、ビタミンK欠乏、多発性黄色腫が多かった。頭蓋内出血の既往が4例でみられ、うち少なくとも3例はビタミンK欠乏が原因と推定された。以上からALGS患者の長期予後は、約半数で重大な障害を伴うことが判明した。

1.2. 診断基準(案)の策定

ALGSの診断基準案を本報告書の「Ⅲ.Alagille症候群診断基準(案)」に示した。典型例は従来の臨床病理学的なALGSの診断基準と同一である。近年導入された遺伝学的診断法を用いて、非典型例や不完全浸透例を診断する基準を明示した。

1.3. 新たな遺伝子診断の方法

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

が明らかとなった。また、アレイCGH法の導入によって遺伝子診断能が向上する可能性が示唆された。

2. その他の遺伝性胆汁うっ滞症

2.1. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症

臨床的に遺伝性胆汁うっ滞症が疑われた症例について、病理学的検討を行ったところ、Bile Salt Export Pump(BSEP)とMultidrug resistance-associated protein 2(MRP2)の免疫組織染色によって、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型の診断が可能なが判明した。進行性家族性肝内胆汁うっ滞症3型についても、免疫組織学的に肝組織中のMDR3の発現を検討することで、診断できる可能性が示唆された。

2.2. 先天性胆汁酸代謝異常症

乳児期の遷延性黄疸にもかかわらず、血清総胆汁酸と γ GTPの高値を伴わない症例について尿中胆汁酸分析と病因遺伝子の解析が行われた。その結果、3-oxo- Δ^4 -steroid 5 β -reductase欠損症、3 β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇-steroid dehydrogenase/isomerase欠損症、oxysterol 7 α -hydroxylase欠損症が確定診断された。一部の症例ではケノデオキシコール酸とウルソデオキシコール酸による胆汁酸療法が行われ、病態の改善がみられた。

2.3. ミトコンドリア肝症

肝臓組織を用いた検査により、ミトコンドリア肝症27症例が診断された。このうち、13例はミトコンドリアDNA枯渇症候群であった。これらの症例の多くは、ALGSなどと同様に、乳児胆汁うっ滞性肝障害や肝不全として発症していた。このミトコンドリアDNA枯渇症候群からDGUOK遺伝子、MPV17遺伝子、POLG遺伝子変異がみいだされた。

3. 乳児胆汁うっ滞症の診断ガイドライン

本研究班の成果をまとめて、班員が中心となって作成し、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た。この内容を本報告書の項目「IV診断支援サイト 乳児黄疸ネット」に示す。このサイトの使用頻度は、月間約 800 回に達した。現在、「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。

4. 生体資料のバンク化

ALGSを含めた遺伝性胆汁うっ滞性疾患のDNA検体は、本研究班が中心となって集積されている。外部からの研究資料の請求にも応えられるように、患者さんのインフォームド・コンセントを整える作業中である。請求に対しては、本研究班分担研究者内で内容を検討し、適切であれば連結不可能匿名化して提供する方針である。

D. 考察

1. Alagille症候群

わが国で初めて ALGS について全国調査が実施され、114 症例が集積され、総患者数は 193 名と推計された。一方、日本肝移植研究会による過去 20 年間の ALGS 肝移植登録症例数は 67 例であった。今回の調査では、ALGS 患者の肝移植率は 24%であったので、肝移植数から推計される患者数は 279 例となる。これらの数字を合わせると、わが国における ALGS の患者総数は、200~300 名程度と推定される。小児慢性特定疾患治療研究事業による平成 18 年度の登録症例数は、ALGS 66 例、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 27 例であった。以上から今回の全国調査は、小児慢性特定疾患治療研究事業の登録数より精度が高いことが裏付けられた。

欧米 ALGS 患者の約 1/3 で肝移植が必要とされているが、日本の肝移植率 24%は欧米に比較すると低い数字であった。ALGS の肝移植の大部分は、乳幼児期に肝不全や強い搔痒感を理由に実施されている。葛西手術（肝門部空腸吻合術）を受けた症例の 71%（7 例中 5 例）が肝移植に移行していたことは注目すべきである。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 ALGS に対する葛西手術は無効、ないし効果が乏しいと判断される。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。

日本における ALGS 患者の肝移植は、血縁ドナーからの生体肝移植によるため、ドナーの選択に際して十分な検索を行う必要がある。軽症の ALGS をドナーとした肝移植で、移植肝が十分に機能しなかった症例が報告されているためである。近年の米国の大規模調査では、典型的な ALGS の血縁者で遺伝子検査を行うと、変異アレルを有するメンバーの半数以上が ALGS の診断基準を満たさず、全く無症状の者もいることが明らかにされた。すなわち、ALGS は浸透率の低い常染色体優性疾患のため、このような無症状または軽症の ALGS が血縁ドナー候補となる確率は高い。今回の調査では、血縁ドナーをこの点から検索する際には、多くの場合、肝生検や胆道系の画像診断が用いられていた。

本研究班で策定した新しい ALGS の診断基準案では、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。医学的治療の必要が乏しい不完全浸透例について遺伝学的

検査を行うことは、医学的・倫理的側面から慎重な配慮が必要である。一方、前述のように、不完全浸透例である両親がこどもの肝移植ドナーになることは危険である。このような場合、遺伝子診断や本研究班の作成した ALGS の診断基準案が有用である。また、遺伝相談の点から、変異アレルの有無を知りたいとする希望はありうる。ただし、ALGS は家族内で同一の変異アレルを有している場合も、重症度は個人毎に大きく異なるため、出生前診断の対象にはならないと考えられる。

2. 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型は肝移植を行っても難治性下痢や高度の脂肪肝などの合併症が起りやすく、肝移植の適応について慎重な考慮が必要である。一方、2型は1型よりも進行が早い場合が多く、幼児期に成人型肝がんを発症する可能性もあるが、肝移植を行えば完治する。したがって肝移植の時期を決めるために、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の1型と2型を鑑別する意義は大きい。本研究班により、肝組織のBSEPの免疫染色により進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型の診断が可能であることが確認された。本法の普及により、診断が大きく進歩すると期待される。

3. 先天性胆汁酸代謝異常症

胆汁酸代謝異常症には多数の病型が含まれるが、いずれも乳幼児期に肝内胆汁うっ滞をきたすため、ALGS や進行性家族性肝内胆汁うっ滞症との鑑別が重要である。また、一部の症例では、胆汁酸の補充治療が可能であり、早期診断・早期治療が求められている。今回の研究によって、尿中の胆汁酸分析を行うことで、希少疾患である胆汁酸代謝異常症が効率的にスクリーニングできる

ことが確定した。今後、この方法を普及させることにより、予後の改善が期待される。

4. ミトコンドリア肝症

わが国の乳児胆汁うっ滞症例の中に多数のミトコンドリア DNA 枯渇症候群が含まれていることは重要な知見である。多くの症例では、本症の診断のために-80度で保存された肝組織を利用しており、今後、生体試料のバンク化にあたって肝組織を収集検体の中にも含める必要性が明らかとなった。ミトコンドリア肝症の診断は始まったばかりであり、その全体像を明らかにするためには効率的な全国調査が必要である。

5. 乳児胆汁うっ滞症の診断ガイドライン

本研究班の研究により、乳児胆汁うっ滞症には、ALGS 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。これらの稀少疾患の診断を支援するツールを全国に提供できた事は、本研究班の成果として極めて重要な点である。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。

E. 結論

疫学研究から日本のALGS患者数は200~300名程度と推定され、肝移植、心臓手術、成長障害や発達遅滞など長期にわたる難治性の合併症を有する症例と比較的予後良好な患者が混存し、患者

ごとの重症度の差が大きいことが確認された。多くは臨床症状によって診断されていたが、非典型例や肝移植ドナーの決定には遺伝子診断が有用である。遺伝学的知見も加味した、ALGSの新しい診断基準案を制定した。遺伝子診断ではDHPLC－シーケンシング法が簡便かつ有効、アレイCGH法は遺伝子変異の同定されなかった症例で有効なことが判明した。さらに、本症に類縁の進行性家族性肝内胆汁うっ滞症、先天性胆汁酸代謝異常症、ミトコンドリア肝症、シトリン欠損症について、実用的な診断法を見出すことができた。これらの成果をまとめて乳児胆汁うっ滞症の診断ガイドラインを制定し、日本小児栄養消化器肝臓学会のホームページに公開して、全国の診療施設で容易に利用できるようにした。これらの電子情報は、日本国内で広く活用されている。また、これらの研究の過程で得られた生体資料は、連結不可能匿名化して、外部研究者に提供する体制を整えた。

F. 研究発表

「V. 研究成果の刊行に関する一覧表」参照

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ. 総合研究報告書

研究分担者

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 国立成育医療研究センター臨床研究センター長
研究協力者 田中久子 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）を対象とした全国アンケート調査（61 施設、81 例）のアンケート調査票の集計を行った。肝胆道系の症状、成長障害・低栄養、発達遅滞を呈することが多く、心奇形、筋骨格系異常、眼科的異常の合併頻度が高い一方で、腎泌尿器系や血管系の異常は比較的少なかった。また、治療としては対症的な薬剤が使用されることが多かった。これらの結果は、疾患の臨床像や治療実態の解明、および診断や治療のための規準作成に有用と考えられる。また、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や問題点をふまえて、検体提供者/代諾者の同意の確認、検体の保存場所、臨床情報収集や管理等を行う部署およびそれに要する費用負担の明確化、その他各種の手順などの面から、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。

本研究班における作業を通して、臨床研究支援の対象を肝疾患領域の臨床研究に拡大できたことは、小児疾患のナショナルセンターの使命としても意義深いと考えている。

A. 研究目的

国立成育医療研究センターでは、小児がんをはじめとするさまざまな疾患領域において、臨床研究のデータマネジメントや中央診断後の検体保存などの面からの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、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）に関するアンケート調査の集計、および生体資料の管理のあり方についての提言を行うことによって、肝疾患領域

における臨床研究支援に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

Alagille 症候群（およびその類縁疾患）については、研究代表者や研究分担者らによって集積された患児121例について、診療担当施設にアンケートを送付して臨床情報を調査した。生体資料の管理については、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

を紹介し、その経験や問題点をふまえて、望ましい検体保存体制について考察した。

(倫理面への配慮)

アンケートで調査した内容は、「疫学研究に関する倫理指針」にいう既存試料に該当し、また患者が特定できるような個人情報には含まない。また、国立成育医療研究センターで実施している臨床データ管理や生体試料保存は、「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。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. Alagille 症候群（およびその類縁疾患）に関するアンケート調査

平成 23 年 2 月 11 日までに 61 施設から 81 例のアンケート調査票を回収した。このうち種々の理由で 7 例を除外した 74 例について集計を行った。臨床症状としては、胆汁うっ滞、黄疸、肝炎、高コレステロール血症、肝肥大、掻痒などの肝胆道系の症状、および成長障害・低栄養、発達遅滞を呈することが多く、肺動脈狭窄などの心奇形、蝶型椎骨・腰椎弓根間距離狭小化や潜在性二分脊椎などの筋骨格系異常、後部胎生環などの眼科的異常の合併頻度が高かった。その一方で腎泌尿器系や血管系の異常は比較的少なかった。治療は、肝移植や合併心奇形への手術を除けば、肝・胆機能改善剤、微小循環系賦活剤、Ca・骨代謝改善剤などの対症的な薬剤が使用されることが

多かった。

2. 小児がん領域での余剰検体保存体制の問題点をふまえた望ましい検体保存体制への提言

小児がんの領域では、提供者の同意を得て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。小児がん領域の問題点をふまえて、

- 1) 検査施設に検体が送付される前に、余剰検体の保存と研究利用の同意の有無について確認を徹底すること
- 2) 検体保存を行う場所、および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明確化すること
- 3) 検体の保存や臨床データの付与法、検体分譲対象とする研究の選択法や検体の分譲手順、同意撤回時の手順等についてのルールを定めておくこと

等の提言を行った。すなわち、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ことが肝要であると考えられる。

D. 考察

国立成育医療研究センターでは、これまで主に小児がん分野での多施設共同の臨床研究を中心としてデータセンター整備を進めてきた。本研究班において実施した全国調査の集計によって、本邦における Alagille 症候群（およびその類縁疾患）の実態の解明、および診断や治療規準の作成に寄与することができたと考えられる。

一方、診断方法の進歩や生体肝移植の普

及などによって、Alagille 症候群（およびその類縁疾患）患者の診断法や治療法は急速に変化しつつある。特に遺伝子診断は日進月歩であり、今後は、臨床情報からだけでなく、遺伝子診断と統合した診断法が主流になっていくものと思われる。また、疾患特異的な iPS 細胞や株化細胞を樹立して細胞レベルで病態を研究することによって、遺伝子異常によって胆汁うっ滞が生じる機序等を解明していく必要もある。

以上のことから、疾患診断後の余剰検体を系統的に保存し、利用するシステムの確立はきわめて重要であると考えられる。本分担研究では小児がん領域の余剰検体保存と利用システムをふまえて、望ましい検体保存体制について提言を行った。疾患領域が異なるとはいえ、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、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となるため、「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。

本研究班における全国調査集計や検体保存体制への提言などの作業を通して、臨床研究支援の対象を小児がんから他の疾患領域に拡大できたことは、小児疾患のナショナルセンターの使命としても意義深いと考えている。

E. 結論

本研究班において、Alagille 症候群（およびその類縁疾患）を対象とした全国アン

ケート調査の集計を行い、臨床像や治療実態の解明、および診断や治療のための規準作成に貢献することができた。

また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

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。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、40例に変異を同定したことになり、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。また、研究期間中にAlagille症候群における肝移植前後で可逆性白質病変が起した初例を国際誌に報告することができた（Takenouchi et al）。今後は変異陽性例に認められる特殊な合併症について全国規模でデータベース化・症例登録して、肝臓専門医の間で共有することは有意義と期待される。

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。

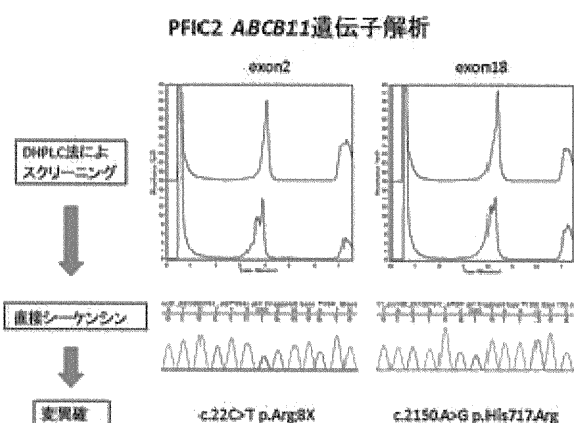
C. 研究結果及び考察

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36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)



Alagille症候群における肝移植前後で可逆性白質病変が起こることはこれまで知られていなかったが、初例を報告することができた(Takenouchi et al)。原因は不明であったが、一過性脳浮腫、髄鞘化遅延、原疾患による血管異常、マンガン蓄積などが関与した可能性が考えられた。

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。侵襲性の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。

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検査の低価格化・自動化という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3つの課題が残されている。

① 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。② 既知の疾患原因遺伝子に変異のない症例の解析も重要な課題である。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。③ 変異陽性例に認められる特殊な合併症について、全国規模でデータベース化・症例登録して、肝臓専門医の間で共有することは有意義と期待される。

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

4) 研究内容の効率性

ゲノム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. 結論

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

た。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、40例に変異を同定したことになる。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。また、研究期間中にAlagille症候群における肝移植前後で可逆性白質病変が起した、初例を国際誌報告に報告することができた (Takenouchi et al)。今後、変異陽性例に認められる特殊な合併症について、全国規模でデータベース化・症例登録して、肝臓専門医の間で共有することは有意義と期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

Takenouchi T, Shimozato S, Kosaki K, Momoshima S, Takahashi T. : Reversible diffuse white matter lesion in Alagille syndrome. *Pediatr Neurol.* 45:54-6, 2011

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

Alagille 症候群をふくめた新生児胆汁うっ滞の診断とその問題点
「新生児胆汁うっ滞の病因の変遷～特に非徴候性肝内胆管減少症について」

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: Alagille 症候群の長期経過観察及び最新の新生児胆汁うっ滞症例の診断、臨床像と組織像の検討から、以下の知見が得られた: 1) Alagille 症候群は、胆汁うっ滞性肝障害などに対する長期的な治療が必要とされ、肝硬変・肝不全や肝内腫瘍性病変、血管障害などの出現に注意が必要である。2) 養育環境の変化と共に、新規の家族性肝内胆汁うっ滞症やシトリン欠損症等の遺伝性・代謝性疾患の存在が解明され、新生児胆汁うっ滞全体に占める新生児肝炎の比率は減少した。3) 最新の自験例では、非徴候性肝内胆管減少症は、胆道閉鎖症と同頻度まで増加し、病因としては「周産期の異常」が推定された。

A.研究目的

自験例を分析し、1) Alagille 症候群 (AGS) の診断と予後、2) 最新新生児胆汁うっ滞症例の病因、3) 新生児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) の病態、以上の3項目に関して検討し、遺伝性胆汁うっ滞性疾患及び周辺疾患の診断の問題点を明らかにした。

B.研究方法

1) 乳幼児期に AGS と臨床的に診断された 7 例を対象として、各徴候の有無と重症度を後方視的に検討した。2) 2003 年から 2010 年に経験した新生児胆汁うっ滞 37 例を対象として、病因の変化について検討した。3) 2003 年から 2011 年に経験した NS-PILBD 15 例を対象とし、その臨床像と肝組織像について検討した。

C.結果

1) 乳幼児期に AGS と診断した症例では、全例で肝内胆汁うっ滞性肝障害を呈し、内科的治療の対象となったが、双胎の 2 例はその後肝障害が軽快し、22 歳となった現在では無治療となっている。総ビリルビンは全例で正常範囲内であるが、 γ -GTP は全例で、総コレステロール値は 3 例で異常高値であった。最年長で肝障害が最も強い症例は、軽度の血小板減少を呈していた。腹部エコーおよび CT 検査では、肝腫大以外の異常所見を呈する症例はなかった。双胎の 2 例を除いた 5 例とも心・肺血管系の異常、眼病変、脊椎変形、特徴的顔貌を呈しており、完全型 AGS と診断された。腎病変を合併 1 例 (症例 2、腎石灰化症)、慢性甲状腺炎を合併した 1 例 (症例 5) に低身長が認められた。

2) 最新の自験例の病因では、胆道閉鎖症は 13 例 (35%)、肝内胆汁うっ滞は 24 例