

その他	低張性脱水	a.あり b.なし c.不明	歳 ヶ月	a 治癒 b.改善 c.不変 d.悪化 e.不明
	発汗過多	a.あり b.なし c.不明	歳 ヶ月	a 治癒 b.改善 c.不変 d.悪化 e.不明
	糖尿病	a.あり b.なし c.不明	歳 ヶ月	a 治癒 b.改善 c.不変 d.悪化 e.不明
	発育不全	a.あり b.なし c.不明	歳 ヶ月	a 治癒 b.改善 c.不変 d.悪化 e.不明
	( )	a.あり b.なし c.不明	歳 ヶ月	a 治癒 b.改善 c.不変 d.悪化 e.不明
検査所見	汗中電解質検査	1. 異常あり 2. 異常なし 3. 検査せず 4. 不明		
		方法：a. ピロカルピンイオン導入法 b. その他 ( )		
		結果 ①：Cl <sup>-</sup> ( )mEq/L, Na <sup>+</sup> ( )mEq/L 施行時年齢： 歳 ヶ月 ②：Cl <sup>-</sup> ( )mEq/L, Na <sup>+</sup> ( )mEq/L 施行時年齢： 歳 ヶ月		
	腓外分泌機能検査	1. 異常あり 2. 異常なし 3. 検査せず 4. 不明 施行時年齢： 歳 ヶ月		
		方法：施行項目に○		結果：
		a. 便中脂肪測定		
		b. PFD 試験 (BT-PABA 試験)		
c. 便中キモトリプシン				
喀痰培養検査	1. 施行あり 2. 施行なし 3. 不明			
	(結果) a. Staphylococcus aureus (MSSA) b. MRSA c. Pseudomonas aeruginosa d. Haemophilus influenzae e. Proteus vulgaris f. Candida albicans g. その他 ( )			
遺伝子診断	1. 施行あり 2. 施行なし 3. 不明 (施行時年齢： 歳 ヶ月)		未施行の場合：遺伝子診断を 1. 希望する 2. 希望しない	
	結果：			
治療	1. 薬物療法 (薬剤名と量をお書きください。)	a. 抗菌薬 (薬剤名： ) (量： )		
		b. 去痰薬 (薬剤名： ) (量： )		
		c. 気管支拡張薬 (薬剤名： ) (量： )		
		d. 消化酵素剤 (薬剤名： ) (量： )		
		e. その他 (薬剤名： ) (量： )		
	2. 在宅酸素療法			
	3. 栄養療法 (種類とカロリー)	a. 中心静脈 (種類： ) ( kcal)		
	b. 経腸栄養 (種類： ) ( kcal)			
4. 理学療法				
5. 手術 (方法と年齢)			( ) 歳	
6. その他				
現在の状況 (診断時と比較)	1. 治癒 2. 改善 3. 不変 4. 悪化 5. 死亡		最終受診日 年 月 日	
	死亡の場合 死亡年月日： 年 月 日 死因： ( )			
	剖検：1. あり 2. なし 3. 不明 剖検所見：			
症例報告の有無	学会発表 a. あり b. なし c. 不明			
	学会名： 第 ( ) 回 ( ) 年			
	紙上発表 a. あり b. なし c. 不明 雑誌名： ( ) 年 ( ) 巻 ( ~ ) 頁 (もしありましたら、抄録もしくは論文のコピー等を添付いただければ幸いです。)			

厚生労働省難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班

## 膵嚢胞線維症の新規および未承認薬の現況

研究報告者 成瀬 達 みよし市民病院 院長

### 共同研究者

石黒 洋（名古屋大学総合保健体育科学センター）、山本明子（名古屋大学大学院健康栄養医学）  
吉村邦彦（日本赤十字社大森赤十字病院呼吸器内科）、正宗 淳（東北大学大学院消化器病態学）  
下瀬川徹（東北大学大学院消化器病態学）

### 【研究要旨】

平成22年度に「医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議」において海外で承認されている膵嚢胞線維症(嚢胞性線維症)の治療薬が取り上げられた。この中で平成23年度4月には高力価のパンクレアチンの製造販売が承認され、8月末より市販が開始された。現在、ドルナーゼアルファ(7月申請)およびトブラマイシン(8月申請)の吸入薬の製造販売申請は審査中である。今後これらの申請が承認されたら、市販開始までに治療薬が速やかに患者に行き渡る体制を確立する必要がある。

### A. 研究目的

膵嚢胞線維症(嚢胞性線維症 CF)は cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) と命名されたクロライドイオンチャネルの遺伝子変異を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患である<sup>1)</sup>。CFTR は全身の外分泌腺におけるクロライドイオンの分泌ならびに水分泌を調節している。CFTR 遺伝子変異により CFTR の機能が著しく障害されると、分泌液が極めて粘稠になるため、消化管、膵管や気管支線の導管細胞が閉塞する。新生児では粘調な胎便により腸閉塞がおこる。膵導管は閉塞により嚢胞状に拡張し、膵外分泌不全となる。脂肪などの消化吸収障害が起きるため脂肪便が生じる。その結果、患者は栄養障害となる。気道では、反復する慢性気管支炎、細気管支炎や副鼻腔炎がおきる。肺感染症による呼吸不全のため、わが国の患者の平均生存期間は約19年である<sup>2)</sup>。

CFはわが国では極めて稀な疾患である。本研究班による全国調査ではCFの発症頻度は150-200万人に1人、年間生存罹患患者数は15名程度であると推計されている<sup>2)</sup>。一方、欧米ではCFは最も頻度の高い遺伝性疾患である。このため様々な治療法が開発されており、患者の生存期間の期待値の中央値は37.4歳に達してい

る<sup>3)</sup>。わが国に比べて生存期間が着実に長くなった理由として、米国では高力価のリパーゼ製剤により膵外分泌不全に起因する消化不良が著しく改善され、栄養状態が良くなったことがある。また、1994年には気管支分泌液の粘性を低下させるドルナーゼアルファが導入された結果、呼吸機能が改善されるようになった。更に、1997年にはトブラマイシンの定期的吸入療法が導入され、緑膿菌による気道感染症のコントロールが改善されたことなどが考えられている<sup>4)</sup>。

わが国ではCF患者の数が少ないため、欧米の標準的治療薬の承認に必要な治験を行うことができない状態が続いてきた。医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議<sup>5)</sup>の検討結果を受けて、平成22年5月に厚生労働省から開発企業の募集および開発要請が行われた。その結果、海外での治験の結果やわが国での使用例の治療成績などの調査に基づいて、わが国でも製造販売申請を行うことが可能となった。ここでは平成23年度の未承認および新たに承認されたCF治療薬の現況を報告する。

### B. 研究方法

1. 調査の対象期間は2011年4月から2012年1月までの10ヶ月間である。

2. 調査の対象は平成23年に製造販売承認が得られたパンクレアチン製剤(リパクレオン<sup>®</sup>)と、ドルナーゼアルファおよびトブラマイシン吸入用製剤の製造販売申請を行った3社である。面談および電子メールにて申請の進捗状況を確認した。

3. リパクレオン<sup>®</sup>の特定使用成績調査(全例調査)について協力依頼を行ったのは、昨年度に施行した「未承認薬の使用経験と今後の治験参加の希望」に関するアンケート調査<sup>6)</sup>に回答のあった8施設および調査後、研究班に遺伝子検査の依頼のあった5施設である。(倫理面への配慮)

1. 本調査はみよし市民病院倫理委員会で承認されている。
2. 本調査の調査内容は患者の年齢、性および主治医の所属施設名のみである。
3. 特定使用成績調査は研究班から主治医にのみに連絡した。主治医が適応ありと判断した場合は、製造販売業者が主治医に調査内容を説明した。主治医が患者もしくはその家族から同意を得た場合、所属施設長との契約が行われており、患者の匿名性および自由意思は守られている。

### C. 研究結果

#### 製造販売申請および審査状況(表1)

わが国でも治験が行われた高力価のリパーゼを含有するパンクレアチン製剤(リパクレオン<sup>®</sup>)は2011年4月に製造販売が承認され、8月31日に市販開始となった。アルファドルナーゼはオーファンドラッグ(希少疾病用医薬品)に指定され、7月に製造販売申請がされた。トブラマイシンの吸入薬は8月に製造販売申請がされた。いずれも現在、審査中である。

#### 市販後の副作用調査(表2)

平成22年度の未承認薬使用状況調査に回答のあった7施設およびその後、研究班に遺伝子検査の依頼があった5施設を加えた計12施設(14症例)にパンクレアチン製剤の適応の有無の確認を依頼した。2例は外国人で、その内1例は依頼時点で非通院であった。5例は臍症状がないため主治医が適応なしと判断した。8

表1 新規および未承認 CF 治療薬の現況  
(2012.01.26)

治療薬	販売名	製造販売申請	承認日	発売日
パンクレアチン	リパクレオン	2010.12	2011.4.22	2011.8.31
ドルナーゼアルファ	Pulmozyme	2011.07	審査中	
トブラマイシン	TOBI	2011.08	審査中	

表2 リパクレオン<sup>®</sup>の特定使用成績調査(全例調査)の契約状況

調査協力依頼施設数	12
協力可能施設数	10
登録者数	5(適応なし:5例)
今後登録予定	3

2012.01.16現在

例が適応ありと判断され、5例で副作用調査に関する契約が行われた。今後、3例が契約予定である。

### D. 考察

医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議<sup>5)</sup>の結果を受けて、昨年度のパンクレアチンに続き、今年度はドルナーゼアルファおよびトブラマイシン吸入薬の製造販売申請がされた。現在、審査中であるが、近い将来に承認されることが期待される。今回、わが国では治験が行えない状況下で、主として海外での治療成績と国内の少数の使用経験にて申請が受理された。今後、海外で標準的 CF 治療薬として認められた薬剤が、わが国の患者にも使用できる道を開いた判断であり、高く評価できる。

これまで未承認薬の中で使用経験が最も多かったのは消化酵素薬のパンクレアチン製剤である<sup>6)</sup>。CF 患者では閉塞性呼吸障害や繰り返す気道感染に伴う咳のためエネルギー消費が大きい。このため間食を含め、頻回の食事摂取が推奨されている<sup>7)</sup>。ところが、膵外分泌不全を伴う CF では、食事の度に消化酵素を補充しないと多量の脂肪便が生じる<sup>1)</sup>。これまでの消化酵素製剤では CF における膵外分泌不全には不十分であり、常用量の数倍を服薬する必要があった。今回、高力価のリパーゼ活性をもつパンクレアチン製剤が市販開始されたことにより、少量の内服で十分な消化が得られることになっ

た。今後、患者の日常生活の質(QOL)および栄養状態は大きく改善することが期待される。

CF患者における粘稠な痰は、気道の水分分泌障害に加えて、壊死した好中球由来の多量のDNAが原因と考えられている。遺伝子組み換え型ヒトデオキシリボヌクレアーゼ(ドルナーゼアルファ)はDNAを分解することにより痰の粘稠性を改善する<sup>8)</sup>。本剤の長期連日のエアロゾル投与はCFにおける肺機能低下の進行を遅らせ、重度の気道機能の増悪を減らすので<sup>9,10)</sup>、欧米では標準治療ある<sup>11,12)</sup>。昨年度の未承認薬の使用調査では、わが国での使用は1例のみであった<sup>6)</sup>。今回の全国調査では72%のCF患者に呼吸困難が認められ<sup>2)</sup>、適応がある症例は多いと考えられる。市販が承認されれば、CFにおける肺機能の改善、QOLの向上ならびに生存期間の改善が期待できる薬剤である。

今回の二次調査では気道感染はCF患者の約90%に認められた。CFの気道感染の起病菌は黄色ブドウ球菌や緑膿菌が多いことが特徴である<sup>1)</sup>。トブラマイシンの吸入療法(TOBI)では緑膿菌感染を制御できる高濃度のトブラマイシンを気道内に直接もたらす。一方、血中濃度の上昇を抑えることができるので、全身性の副作用の発現頻度は低い。本剤の間歇投与(4週投与/4週休薬)は肺機能を改善させ、緑膿菌量を減少させ、入院のリスクを減らし、かつ体重増加をもたらす<sup>13,14)</sup>。欧米における標準的な治療法である<sup>11,12)</sup>。昨年度の未承認薬の使用調査ではわが国での使用経験は4例であった<sup>6)</sup>。わが国のCFの死因の約60%は呼吸器感染であり<sup>2)</sup>、その制御の良否が患者の予後を左右する。

今回の申請は主として海外での成績をもとに審査されている。このため日本人のCF患者における副作用調査は十分でない。そこで、市販後には製造販売業者には全例の追跡調査が義務付けられる。副作用調査を行うためには、製造販売業者は主治医の所属する医療機関と契約を結ぶ必要がある。しかし、業者にはCF患者が通院している医療機関を知る術がない。そこでリパクレオンの市販後の副作用調査を開始するにあたり、CFの全国疫学調査や未承認薬の使用調査で得られた情報の利用を認めることとし

た。CFの全国疫学調査や未承認薬の使用調査は、患者の個人情報を守るため主治医を介して行っている。今回は、昨年度の未承認薬使用状況調査<sup>6)</sup>で将来の調査に協力可能との返事をいただいた8施設の主治医にメールおよび郵便で本剤の適応の有無を問い合わせた。しかし、1か月以内に回答をいただいたのは3施設のみであった。その後の調査により、主治医が転勤により交代したため依頼状が届いていない場合もあった。最終的には14例の主治医と連絡が取れ、市販後3か月以内に5例が契約でき、今後、3例が契約予定となった。全国疫学調査の推定値によれば2009年の年間受療患者数は13例(95%信頼区間:10~16)であるので<sup>15)</sup>、90%以上の患者に薬剤情報を伝達できたと推定される。多くのCF患者はパンクレアチン(リパクレオン<sup>®</sup>)、ドルナーゼアルファおよびトブラマイシンの吸入薬の内、複数を同時に使用する可能性が高い。審査の結果、承認・市販される時には、全ての患者に必要な薬が速やかに行き渡るように、情報の共有ができるシステムの構築が必要であると思われる。

## E. 結論

医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議で取り上げられたCF治療薬は、本年度に順次、製造販売承認申請が行われ、審査が進められている。市販される時には、複数の新薬が同時に使用される可能性が高いので、全ての患者に必要な薬が速やかに行き渡るように、情報の共有ができるシステムの構築が必要である。

## F. 参考文献

1. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性脾疾患に関する調査研究班. 脾嚢胞線維症の診療の手引き(大槻眞, 成瀬達編). アークメディア 2008.
2. 成瀬 達, 石黒 洋, 山本明子, 吉村邦彦, 辻一郎, 栗山進一, 正宗 淳, 菊田和宏, 下瀬川徹 第4回脾嚢胞線維症全国調査 二次調査の解析 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性脾疾患に関する調査研究」平成23年度総括・分担研究報告書 2012:

- 341-354.
3. What is the life expectancy for people who have CF in the United States? Cystic Fibrosis Foundation-Frequently Asked Questions (<http://www.cff.org/AboutCF/Faqs/>)
  4. SM ロウ, JP クランシー, EJ ソーシャー 嚢胞性線維症に光, 日本における嚢胞性線維症 (石黒 洋, 成瀬 達) 日経サイエンス 41; 2011: 88-95.
  5. 医療上の必要性の高い未承認薬・適応外薬検討会議. 厚生労働省関係審議会議事録等その他 (医薬食品局) (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2010/04/s0427-12.html>)
  6. 成瀬 達, 石黒 洋, 吉村邦彦, 辻 一郎, 栗山進一, 下瀬川徹, 菊田和宏 嚢胞性線維症の未承認薬の使用状況 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性肺疾患に関する調査研究」平成22年度総括・分担研究報告書 2011: 305-311.
  7. Stallings VA, Stark LJ, Robinson KA, Feranchak AP, Quinton H. Evidence-based practice recommendations for nutrition-related management of children and adults with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency: results of a systematic review. *J Am Diet Assoc.* 2008; 108: 832-9.
  8. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 9188-92.
  9. McCoy K, Hamilton S, Johnson C. Effects of 12-week administration of dornase alfa in patients with advanced cystic fibrosis lung disease. *Pulmozyme Study Group. Chest.* 1996; 110: 889-95.
  10. Quan JM, Tiddens HA, Sy JP, McKenzie SG, Montgomery MD, Robinson PJ, Wohl ME, Konstan MW; Pulmozyme Early Intervention Trial Study Group. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr.* 2001; 139: 813-20.
  11. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ Jr, Willey-Courand DB, Bujan J, Finder J, Lester M, Quittell L, Rosenblatt R, Vender RL, Hazle L, Sabadosa K, Marshall B; Cystic Fibrosis Foundation, Pulmonary Therapies Committee. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176: 957-69.
  12. Heijerman H, Westerman E, Conway S, Touw D, Döring G; consensus working group. Inhaled medication and inhalation devices for lung disease in patients with cystic fibrosis: A European consensus. *J Cyst Fibros.* 2009; 8: 295-315.
  13. Ramsey BW, Pepe MS, Quan JM, Otto KL, Montgomery AB, Williams-Warren J, Vasiljev-K M, Borowitz D, Bowman CM, Marshall BC, Marshall S, Smith AL. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. *Cystic Fibrosis Inhaled Tobramycin Study Group. N Engl J Med.* 1999; 340: 23-30.
  14. Moss RB. Long-term benefits of inhaled tobramycin in adolescent patients with cystic fibrosis. *Chest.* 2002; 121: 55-63.
  15. 成瀬 達, 石黒 洋, 山本明子, 吉村邦彦, 辻 一郎, 栗山進一, 正宗 淳, 菊田和宏, 下瀬川徹 第4回嚢胞性線維症全国調査(一次調査の集計) 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性肺疾患に関する調査研究」平成23年度総括・分担研究報告書 2011: 297-304.
- G. 研究発表**
1. 論文発表 該当なし
  2. 学会発表 該当なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**
1. 特許取得 該当なし
  2. 実用新案登録 該当なし
  3. その他 該当なし

## 膵嚢胞線維症患者の栄養障害の実態と治療の現況

研究報告者 石黒 洋 名古屋大学総合保健体育科学センター 教授

### 共同研究者

成瀬 達（みよし市民病院），山本明子（名古屋大学大学院健康栄養医学）  
吉村邦彦（日本赤十字社大森赤十字病院呼吸器内科），辻 一郎（東北大学大学院公衆衛生学）  
栗山進一（東北大学大学院公衆衛生学），菊田和宏（東北大学大学院消化器病態学）  
下瀬川徹（東北大学大学院消化器病態学）

### 【研究要旨】

第4回膵嚢胞線維症全国疫学調査で集計された2000～2009年の患者42症例のうち、個人調査票が回収された18症例の解析を行った。最終確認時の体格については、18歳以上の10症例のBMIは $15.7 \pm 1.8$  (mean  $\pm$  SD)で全例18.5未満であり、18歳未満の8症例のうち、1症例は体重が、4症例は身長が $-2SD$ 以下であった。膵外分泌機能については、13症例で機能低下が確認され、そのうち8症例に脂肪便が見られた。高力価の脂肪分解酵素製剤は2症例に用いられていた。全経過において栄養障害の改善が急務である。

### A. 研究目的

膵嚢胞線維症（嚢胞性線維症）は、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)の遺伝子変異を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患である。CFTRアニオンチャンネルは、膵、消化管、気道粘膜、輸精管、汗管など全身の上皮膜細胞に発現する。CFTRの両方のアレルに重度の変異があり、CFTR機能が5%以下に低下すると、上皮膜/粘膜を介するイオンと水の輸送が障害されるため、管腔内の粘液/分泌液が過度に粘稠となり、管腔が閉塞したり感染し易くなり、嚢胞性線維症(cystic fibrosis; CF)を発症する。

膵液中の重炭酸イオン( $\text{HCO}_3^-$ )と水は、膵導管の上皮細胞(膵導管細胞)から分泌され、管腔膜(apical membrane)上に存在するCFTRの活性に依存する。CFではCFTR機能が失われ、膵腺房細胞から分泌された消化酵素液をアルカリ化し希釈することができないため、膵管腔内は蛋白質に富む粘稠な膵液に満たされる。そのため、膵管が拡張し、小葉間および小葉内の線維化が起き(Cystic Fibrosis of the pancreas)、膵腺房細胞が減少するため膵酵素分泌不全により脂肪便が生じる。CFTRの機能がほぼ完全

が失われる場合には、膵外分泌不全(pancreatic insufficient: PI)を伴う重症のCFを発症する。CFTRの機能が少し保たれる場合には、膵外分泌不全を伴わない(pancreatic sufficient: PS)軽症のCFを発症する。

厚生労働省の難治性膵疾患に関する調査研究班は、第1回1994年<sup>1)</sup>、第2回1999年<sup>2)</sup>、第3回2004年<sup>3)</sup>、第4回2009年<sup>4)</sup>と、5年毎に全国疫学調査を行ってきた。本研究では、第4回全国疫学調査の二次調査によって回収された18症例の調査個人票を用いて、膵外分泌機能、脂肪便の有無、栄養障害の実態および治療の現況を解析した。

### B. 研究方法

事務局に届いた調査個人票は、個人情報管理者が、症例の重複をチェックした上で、症例の匿名化(連結可能)を行い、症例の対応表を保管した。膵外分泌機能、脂肪便の有無、栄養障害の実態、および治療の現況を解析した。汗中 $\text{Cl}^-$ 濃度の測定方法と結果、呼吸器症状の経過、使用された抗菌薬、呼吸器治療薬、重症度の経過などのデータは、別項“第4回膵嚢胞線維症全国調査 二次調査の解析”にまとめる。

(倫理面への配慮)

本研究は、東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会(2008-312, 2008年11月17日承認), および名古屋大学医学部生命倫理審査委員会(728, 2009年2月27日承認)で承認されている。

### C. 研究結果

#### 各症例の概要と栄養状態(表1)

過去10年間中の生存が確認された42症例のうち18症例の調査個人票が回収された。生存例11症例の年齢の中央値は19歳であった。7症例が死亡しており、死亡年齢は10ヶ月, 2, 18, 19, 24, 28, 37歳, 死因は6症例が呼吸器感染, 1症例が肝不全であった。

栄養状態の指標として、出生時および最終確認時の身長と体重を調査した。出生時に低体重(平均-2SD(標準偏差)以下)の症例は2例あった。最終確認時の栄養状態を、18歳以上はBody Mass Index(BMI)で、18歳以下はSDスコアで表した<sup>5)</sup>。18歳以上の10症例のBMIは $15.7 \pm 1.8$ (mean  $\pm$  SD)で全例18.5未満であり、18歳未満の8症例のうち、1症例は体重が、4症例は身長が-2SD以下であった。ほとんどの症例が、全経過において明らかな栄養障害を示していた。

#### 各症例の診断基準を満たす項目(表2)

各症例について、わが国の腓膵胞線維症診断基準<sup>6,7)</sup>を満たす項目を示す。各項目の陽性率は、発汗試験は16/18(89%), 腓外分泌不全は13/16(81%), 但し2症例については、脂肪便ありと記載されているが脂肪の定量などはされていない, 呼吸器症状は17/18(94%), 胎便性イレウスは9/16(56%), 家族歴は2/17(12%)であった。遺伝子解析は14症例に施行されており, CFTR 遺伝子変異は20アレルに検出されていた。

#### 腓外分泌機能検査(表3)

腓外分泌機能検査としては、便中脂肪検査が6例, BT-PABA 試験が6例, 便中キモトリプシン測定が5例, 血中トリプシン測定が5例に施行されていた。

離乳期より進行する大量、頻回の悪臭を伴う脂肪便は腓外分泌不全の良い指標であるが、他の先天性疾患でも生じうるため、腓外分泌の低下を併せて示す必要がある。便中キモトリプシンは測定キットが製造中止となっている。便中エラスターゼ濃度の低下は腓外分泌不全の最も信頼できる簡便な検査であり<sup>8,9)</sup>、酵素補充療法を行っていても判定できるが、わが国ではまだ承認されていない。BT-PABA 試験は、現

表1 各症例の概要と栄養状態

症例	性別	現在の状況	調査時年齢	死亡年齢	死因	診断年齢	出生時体重(kg)	現在/最終確認時					
								身長(cm)	体重(kg)	BMI	年齢		
1	男	改善	2歳			11ヶ月	2.9	79.9	-2.5SD	9.8	-1.7SD		2歳
2	女	改善	3歳			4ヶ月	2.5	86.4	-2.2SD	12.5	-0.6SD		3歳
3	男	不変	6歳			6歳	3.0	112.8	-1.2SD	16.3	-1.6SD		6歳
4	女	不変	14歳			6歳	2.8	157.7	0.1SD	49.9	-0.2SD		14歳
5	男	不変	14歳			10歳	3.2	157.0	-1.6SD	52.1	-0.5SD		14歳
6	女	悪化	19歳			1ヶ月	3.3	147.1		37.0		17.1	19歳
7	男	改善	20歳			0ヶ月	1.5	139.7		27.5		14.1	20歳
8	男	不変	20歳			15歳	3.0	161.0		43.0		16.6	20歳
9	男	悪化	22歳			5ヶ月	2.4	158.0		46.1		18.5	22歳
10	男	改善	26歳			15歳		161.0		35.0		13.5	26歳
11	女	改善	34歳			11歳	2.8	154.0		32.0		13.5	34歳
12	女	死亡		10ヶ月	肝不全	3ヶ月	1.6	44.0	-10.8SD	1.6	-7.4SD		0歳
13	女	死亡		2歳	呼吸器感染	1歳	2.4	82.0	-2.5SD	11.3	-0.9SD		2歳
14	男	死亡		18歳	呼吸器感染, 呼吸不全	17歳		160.7		37.0		14.3	18歳
15	男	死亡		19歳	肺出血疑い	8歳	3.2						
16	男	死亡		24歳	呼吸不全	1ヶ月	2.5	159.2		40.3		15.9	24歳
17	男	死亡		28歳	呼吸器感染	14歳		164.0		48.0		17.8	28歳
18	男	死亡		37歳	呼吸器感染	32歳		181.0		53.0		16.2	36歳

表2 診断基準を満たす項目

症例	発汗試験	膵外分泌不全	呼吸器症状	胎便性イレウス	家族歴	遺伝子変異		(剖検)
1	○	○	○	○		dele 16-17b		
2	○	○	○	○		G85R(385G>A)		125C
3	○	(脂肪便)	○		○			
4		○				D924N	5T	
5	○		○		不明			
6	○	○	○	○		不明		
7	○	○	○	○		不明		
8	○	(脂肪便)	○			E217G		
9	○	○	○	○		R75X	dele 16-17b	
10	○	○	○			Q98R	125C	
11	○		○			E267V	T663P	
12		○	○	○				○
13	○		○	○		dele 16-17b		dele 16-17b
14	○	検査せず	○	不明		dele 16-17b		dele 16-17b, V1318I
15	○	○	○	○		1742 delAC		1525-18 GtoA
16	○	○	○			不明		
17	○	○	○	○		不明		
18	○	検査せず	○	不明	○	dele 16-17b		T1086I

表3 膵外分泌機能

症例	便中脂肪		BT-PABA試験		便中膵酵素 キモトリプシン		血中トリプシン	
	結果	施行時年齢	結果	施行時年齢	結果	施行時年齢	結果	施行時年齢
1	(3+)脂肪染色	不明						
2								
3								
4			55%	不明				
5	不明		不明		不明		不明	
6					低値	0ヵ月		
7			低値	6ヵ月			低値	6ヵ月
8								
9	2.79 g/日	4ヵ月	36.0%	5ヵ月	異常なし	10ヵ月		
10			17.0%	15歳				
11	吸収99%	11歳			異常なし	11歳		
12	(3+)脂肪染色	不明			<0.1	不明	>272	不明
13	陰性	2歳					<50 ng/ml	2歳
14								
15							30 ng/ml	不明
16	20.8 g, 28.8 g/100 g 便	2ヵ月	12.20%	2ヵ月	0.4 u/g	2ヵ月	668 ng/ml	2ヵ月
17			25.3%	14歳				
18								

在, 施行可能な唯一の膵外分泌機能検査法であるが, 6時間の採尿が必要であり, 吸収不良, 肝疾患, 腎疾患でも低値を示すため偽陽性率が高いという欠点がある. 血中トリプシン(トリプシノーゲン)は, 米国において, 新生児のスクリーニング検査に用いられている<sup>10)</sup>.

消化器症状の有無, 経過, 発現時期(図1)

胎便性イレウス, 脂肪便, 栄養不良, 膵炎発作, 便秘の有無, 症状有りの場合はその経過と初発時期を表した. 脂肪便と栄養不良は, 乳児期に初発し, 半数の症例は経過中に改善したと記載されていた. 一般に, 膵炎発作は, 膵外分



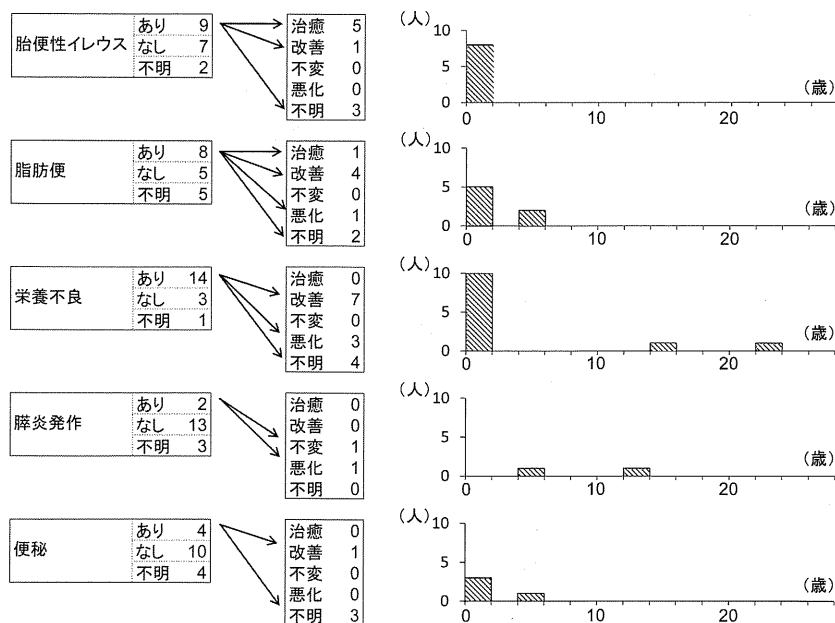


図1 消化器症状の有無，経過，初発時期

表4 使用された消化器治療薬(数字は症例数，重複あり)

消化酵素剤	10/18	利胆剤	2/18
パンクレアチン	3	ウルソデオキシコール酸	2
Creon®, SA-001	2		
ベリチーム®	4		
タフマック E®	1		
セブニーイー・P	1		

泌が比較的保たれている軽症例に起こりやすいとされている。本調査では、2症例(症例4と症例11)に見られ、いずれも膵外分泌機能が比較的保たれた症例であった。症例4は、汗中Cl<sup>-</sup>濃度が正常値を示し、急性再発性膵炎で発症した呼吸器症状を伴わない症例であり<sup>11)</sup>、非定型的/不全型のCFに相当する<sup>7,12)</sup>。症例11は、典型的な呼吸器症状を伴った症例であり、生体肺移植を受けている。

#### 使用された消化器治療薬(表4)

消化酵素剤は10症例に用いられていた。高力価のパンクレアチン製剤(欧米ではCreon®として用いられている。日本ではSA-001として治験が行われた)が2症例で服用されていた。また、経管栄養(EN)は3症例に施行されていた。

#### D. 考察

CFでは、膵からの消化酵素分泌の減少に加えて、膵HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>分泌の減少によって小腸管腔

内のpHが低下するため、消化酵素(特にリパーゼ)の酵素活性が低下し消化不良となる(図2)。治療としては、高カロリー-高エネルギー食で十分な食事を摂るとともに、胃酸で失活されにくい腸溶剤の消化酵素製剤を十分に投与する。小児の場合、健康な子供よりも30~50%多いカロリーを摂る必要がある。体重の増加が充分でない場合には、経管栄養(EN)を積極的に併用する。また、食事の脂溶性ビタミンが吸収されにくいので、総合ビタミン剤を内服する必要がある。

欧米では、高力価のパンクレアチン製剤であるCreon®が標準的に用いられている<sup>13)</sup>。脂質を含んだ食事を摂る毎に(500~4,000 IU lipase/g 脂肪)内服する。カプセルを内服することができない乳児~幼児では、少量のミルクなどに混ぜて、噛み砕かないように内服させる。今まで日本国内で供給されていなかったため、本調査では2症例に使用されたのみであった。今後は、昨年8月に国内で発売になったパンクレリパーゼ腸溶剤(Pancrelipase delayed-release capsule, リパクレオン®)の使用が増えると思われる。治療にあたっては、膵外分泌機能を把握し、可能であれば消化酵素投与前後で便中脂肪の定量を行なう。消化酵素を過剰に投与すると、便秘が悪化したり、fibrosing colonopathyという重篤な合併症を引き起

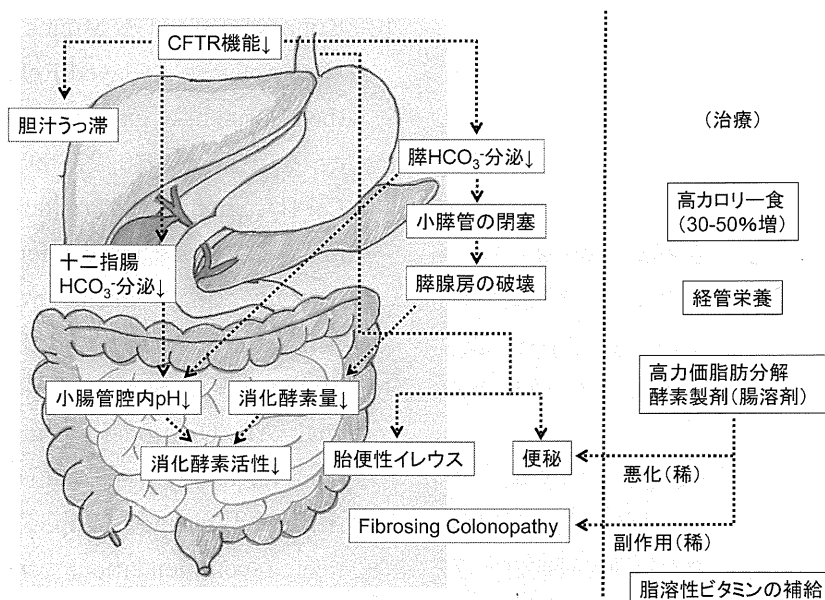


図2 Cystic Fibrosisにおける栄養障害の病態と治療

こすことがある。欧米のガイドラインでは、リパーゼ活性として10,000 IU/kg 体重/日以上消化酵素剤を内服すべきでないとしている。現在、わが国で施行可能な膵外分泌機能検査法はBT-PABA 試験のみであり、より信頼性の高い便中エラスターゼ検査が行えるようになることが期待される。

CFでは、膵外分泌不全による消化吸收障害に、気道の慢性感染症と咳そうによる消耗が加わって、栄養状態が悪化する。今回の二次調査では、脂肪の消化吸收障害は18症例中8症例に見られ、乳児期に初発した脂肪便と栄養不良は半数の症例は経過中に改善したと記載されていた。しかし、体格の検討(表1)では、多くの症例が「やせ」であり、栄養不良が存在すると考えられる。栄養状態の改善は、呼吸機能(FEV 1%)と生存率を改善させることがわかっており、体格(BMIあるいは肥満度)を50パーセントタイルに保つべきだと報告されている<sup>14,15)</sup>。十分な量の消化酵素剤を服用することにより、栄養状態を標準的な体格に近づけることが必要である。

### E. 結論

第4回膵嚢胞線維症全国疫学調査で集計された2000～2009年の患者42症例のうち、個人調査票が回収された18症例の解析を行った。

最終確認時の体格については、18歳以上の10症例のBMIは全例18.5未満であり、18歳未満の8症例のうち、1症例は体重が、4症例は身長が-2SD以下であった。ほとんどの症例に栄養不良が存在すると考えられ、昨年国内で発売になったパンクレリパーゼ腸溶剤の使用を勧め、体格を50パーセントタイルに近づける必要がある。

### F. 参考文献

1. 田代征記, 佐々木賢二 本邦における膵嚢胞線維症(Cystic fibrosis)の遺伝子診断, N1303Kの変異解析 厚生省特定疾患難治性膵疾患調査研究班 平成6年度研究報告書 1994: 20-23.
2. 玉腰暁子, 林 櫻松, 大野良之, 小川道雄, 広田昌彦, 衛藤義勝, 山城雄一郎 膵嚢胞線維症全国疫学調査成績 厚生労働省特定疾患対策研究事業「難治性膵疾患に関する調査研究班」平成12年度研究報告書 2001: 92-95.
3. 成瀬 達, 石黒 洋, 玉腰暁子, 吉村邦彦, 広田昌彦, 大槻 眞 第3回膵嚢胞線維症全国疫学調査 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性膵疾患に関する調査研究」平成17年度～19年度総合研究報告書 2008: 205-215.
4. 成瀬 達, 石黒 洋, 山本明子, 吉村邦彦, 辻一郎, 栗山進一, 下瀬川徹, 菊田和宏 第4回

- 膵嚢胞性線維症全国疫学調査(一次調査の集計) 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性膵疾患に関する調査研究」平成22年度総括・分担研究報告書 2011: 297-304.
5. 伊藤善也, 加藤則子, 立花克彦, 藤枝憲二 小児慢性特定疾患治療研究事業において採用された身長基準に準拠した2000年度版「標準身長表」および「標準成長曲線. 小児科診療 2005; 68: 1343-1351.
  6. 小川道雄, 玉腰暁子, 衛藤義勝, 山城雄一郎 嚢胞線維症の全国調査 厚生省特定疾患対策研究事業「難治性膵疾患に関する調査研究班」平成11年度研究報告書 2000; 66-68.
  7. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究班 大槻眞, 成瀬 達, 編 膵嚢胞性線維症の診療の手引き アークメディア(東京)2008.
  8. Naruse S, Ishiguro H, Ko SB, Yoshikawa T, Yamamoto T, Yamamoto A, Futakuchi S, Goto H, Saito Y, Takahashi S. Fecal pancreatic elastase: a reproducible marker for severe exocrine pancreatic insufficiency. *J Gastroenterol* 2006; 41: 901-908.
  9. 長崎 裕, 水溜浩弥, 柏瀬由紀子, 久保野勝男, 下瀬川徹 便中エラスターゼ I による膵外分泌機能の検討 膵臓 2003; 18: 9-20.
  10. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB, Rock MJ, Campbell PW 3rd; Cystic Fibrosis Foundation. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 2008; 153: S4-S14.
  11. Koyano S, Hirano Y, Nagamori T, Tanno S, Murono K, Fujieda K. A rare mutation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in a recurrent pancreatitis patient without respiratory symptoms. *Pancreas* 2010; 39: 686-7.
  12. 吉村邦彦 Cystic fibrosis 日本胸部臨床 2010; 69: 723-733.
  13. Kuhn RJ, Gelrud A, Munck A, Caras S. CREON (Pancrelipase Delayed-Release Capsules) for the treatment of exocrine pancreatic insufficiency. *Adv Ther* 2010; 27: 895-916.
  14. Lai HJ, Shoff SM. Classification of malnutrition in cystic fibrosis: implications for evaluating and benchmarking clinical practice performance. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 161-6.
  15. Stallings VA, Stark LJ, Robinson KA, Feranchak AP, Quinton H; Clinical Practice Guidelines on Growth and Nutrition Subcommittee; Ad Hoc Working Group. Evidence-based practice recommendations for nutrition-related management of children and adults with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency: results of a systematic review. *J Am Diet Assoc* 2008; 108: 832-9.
- G. 研究発表**
1. 論文発表 該当なし
  2. 学会発表 該当なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**
1. 特許取得 該当なし
  2. 実用新案登録 該当なし
  3. その他 該当なし
- 謝辞
- 第4回膵嚢胞性線維症全国疫学調査にご協力頂きました患者様ならびに先生方に深謝致します。

IV. 瘳囊胞線維症  
2) 各個研究プロジェクト

## わが国の Cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子の解析

研究報告者 石黒 洋 名古屋大学総合保健体育科学センター 教授

### 共同研究者

中莖みゆき（名古屋大学大学院健康栄養医学）、山本明子（名古屋大学大学院健康栄養医学）  
近藤志保（名古屋大学大学院健康栄養医学）、藤木理代（名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科）  
北川元二（名古屋学芸大学管理栄養学部管理栄養学科）、洪 繁（国立長寿医療研究センター病院消化機能診療科）  
成瀬 達（みよし市民病院）

### 【研究要旨】

臨床症状と汗中 Cl<sup>-</sup> 濃度の高値より Cystic fibrosis (CF) が疑われた 7 症例（日本人 6 名，日系ペルー人 1 名）の CFTR 遺伝子解析を行った。ゲノム DNA を用いて CFTR 遺伝子全 27 エクソンとその近傍及びプロモーター部を直接シーケンスすることにより，R75X，E217G，1609delCA，G542X，T1086I の CF 原因変異を検出した。鼻粘膜拭い液より抽出した CFTR mRNA を用いて複数のエクソンをまたぐ RT-PCR を行い，ヘテロに存在する dele 16-17b (c.2908+1085\_3367+260del7201) の変異を検出した。ゲノム DNA のフラグメント解析を行い，日本人 CF 症例 12 アレル中 5 アレルに dele 16-17b 変異を検出した（ヘテロ 3 症例，ホモ 1 症例）。dele 16-17b 変異は，日本人で最も頻度の高い CF 原因遺伝子変異と考えられる。

### A. 研究目的

嚢胞性線維症 (Cystic fibrosis: CF) は，cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) の遺伝子変異を原因とする常染色体劣性遺伝性疾患である。本研究では，臨床症状と汗中 Cl<sup>-</sup> 濃度の高値により CF が疑われた 7 名（日本人 6 名，日系ペルー人 1 名，表 1）の患者の CFTR 遺伝子変異を同定することを目的として，以下の解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. ゲノム遺伝子の解析

末梢血より DNA を抽出し，CFTR 全 27 エクソンとその上下流数百 bp 及びプロモーター部（5' 上流約 1,000 bp まで）の塩基配列を直接シーケンスした。

#### 2. CFTR mRNA の解析

鼻粘膜拭い液より mRNA を抽出し，CFTR の複数のエクソンをまたぐように RT-PCR を行った（詳細は，昨年度の報告書参照<sup>1)</sup>）。

#### 3. フラグメントテスト

dele 16-17b は CFTR ゲノム上のイントロン 15 からイントロン 17b にかけての 7,201 bp を欠損する遺伝子変異 (c.2908 + 1085\_3367 +

表 1 各症例における診断基準に当てはまる項目と CFTR 遺伝子変異

症例	年齢	性別	汗中 Cl <sup>-</sup> 濃度 (mmol/l)	腺外分泌不全	呼吸器症状	胎便性イレウス	家族歴	アレル 1 変異	アレル 2 変異
1	10ヶ月	女	156	○	○			c.1609delCA	Q542X
2	1歳	男	122	○	○	○		dele 16-17b	ND
3	38歳	男	88	○	○		○	T1086I	dele 16-17b
4	19歳	男	96	○	○	○		R75X	dele 16-17b
5	2歳	女	238		○	○		dele 16-17b	dele 16-17b
6	20歳	男	>60	○	○			E217G	ND
7	10歳	男	70		○			ND	ND

260del7201)である。ヘテロに存在する dele 16-17bを検出するために、欠損領域をはさんだ位置にプライマーを作成しPCRを行った(詳細は、昨年度の報告書参照)。

#### 4. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)解析

MLPAは、特定の遺伝子領域に反応するように設計されたプローブを目的遺伝子とハイブリダイズさせ、PCRで増幅しキャピラリー電気泳動で増幅ピークを得ることにより、deletionやduplicationなどのgenomic rearrangementを定量的に検出する解析方法である。本研究では、SALSA P091-C1 CFTR MLPAキット(MRC Holland)を用いて解析した。CFTRの27エクソンに対応する各フラグメントの増幅ピークの分離には、CEQ-8000キャピラリー電気泳動システム(Beckmann Coulter)を、サイズコントロールとしてBeckmann D1-labeled CEQ size standard 600を用いた。

(倫理面への配慮)

「腭嚢胞線維症および関連疾患におけるCFTR遺伝子解析」として、名古屋大学医学部生命倫理審査委員会にて承認済(650,平成20年9月11日承認)である。

### C. 研究結果

#### 1. ゲノム遺伝子の解析

CF原因変異として、R75X<sup>2)</sup>, E217G<sup>3)</sup>, 1609delCA<sup>4)</sup>, G542X<sup>5)</sup>, T1086Iの5種類のナンセンス変異、ミスセンス変異をそれぞれ1アレルずつ検出した(表1)。

#### 2. CFTR mRNAの解析

症例2の鼻粘膜拭い液より抽出したCFTR mRNAのRT-PCRにより、エクソン16-17bを欠損しているPCR断片を検出した。欠損のないPCR断片も検出されたことから、dele 16-17b変異(c.2908 + 1085 \_ 3367 + 260del7201)をヘテロに持つことがわかった<sup>1)</sup>。

#### 3. フラグメントテスト

ヘテロあるいはホモに存在するdele 16-17bが、5アレルで検出された(表1)。

#### 4. MLPA解析(図1)

症例2, 3, 4では、エクソン16, エクソン17a, エクソン17bに対応するピークが半減しており、dele 16-17b変異をヘテロに持つことを示している。症例5では、エクソン16, エクソン17a, エクソン17bに対応するピークが消失しており、dele 16-17b変異のホモ接合体であることを示している。これらの結果は、フラグメントテスト結果と一致していた。また、その他のgenomic rearrangementは認められなかった。

### D. 考察

CFTR遺伝子変異の解析として一般に行わ

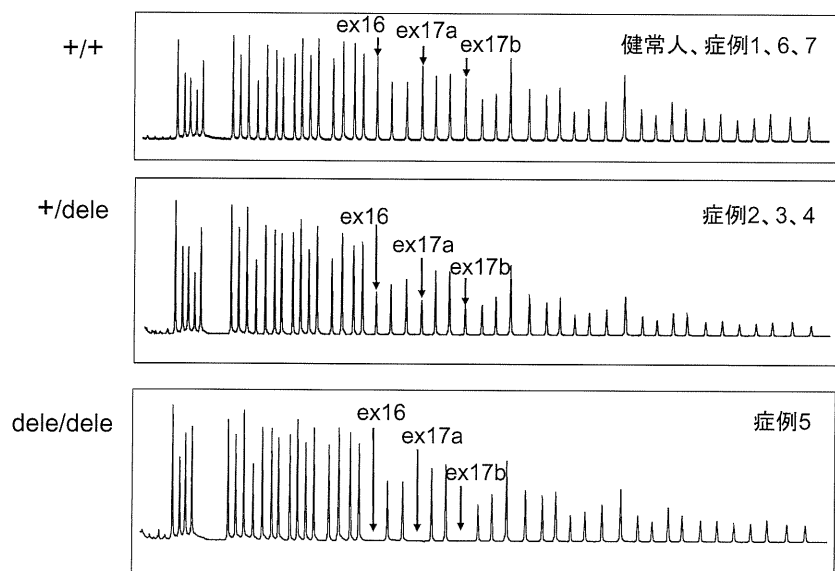


図1 MLPA (Multiple ligation-dependent probe amplification)法による波形

れているゲノムの直接シーケンスでは、CFを引き起こすと推定される CFTR 変異が検出されたのは14アレル中5アレル(検出率35.7%)であった。

臨床症状や汗中 Cl<sup>-</sup> 濃度が高いことから、シーケンスのみでは見つからない変異が潜んでいるのではないかと考え、症例2では、鼻粘膜から CFTR 転写産物を抽出して解析を試み、ヘテロに存在する dele 16-17b 変異を検出した<sup>1)</sup>。dele 16-17b のホモ接合体(症例5)は、エクソン16, 17a, 17b の PCR がかからないことから検出可能である。しかし、片方のアレルにのみ dele 16-17b 変異がある症例では、ゲノムの直接シーケンスでは検出できない。

dele 16-17b 変異におけるゲノム上の欠損箇所を同定し、欠損を持つフラグメントを検出するテスト(フラグメントテスト)を設計し、通常の PCR によって簡便に dele 16-17b 変異を検出することが可能となった。この結果、14アレル中5アレルで dele 16-17b 変異が検出された(表1)。MLPA 解析でも同様の結果が得られた。

CFTR mutation date base には、ゲノム上で数エクソンに及ぶような deletion や duplication などの genomic rearrangement が30種類以上報告されている<sup>6)</sup>。MLPA 法は、CFTR を含めいくつかの遺伝子の genomic rearrangement 検出のために開発されており、有用性が報告されている<sup>7)</sup>。本研究では、キットを用いて MLPA 解析を行ったが dele 16-17b 以外の変異は認められなかった。

以上の解析を追加したことにより、14アレル中10アレル(検出率71.4%)に、CFTR 遺伝子変異が検出された。しかし、依然として4アレルの遺伝子変異が同定されていない。プロモーター部分あるいはイントロン部分に変異があると推定されるが、範囲が膨大であり多型も多く存在するため、CGH アレイなどを用いても CF 症例との対応がつかない。さらに変異検出率をあげるためには、上皮膜細胞で発現している CFTR 蛋白を反映するものとして、鼻粘膜の CFTR mRNA の解析を進める必要がある。

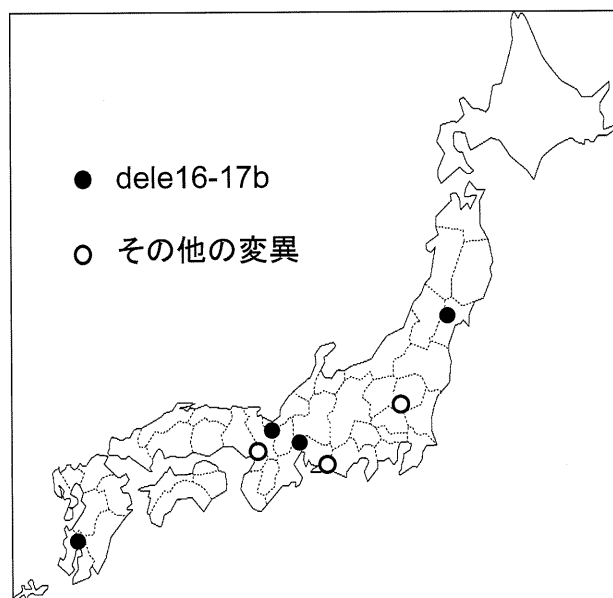


図2 今回の解析における患者の分布

## E. 結論

図2に、今回解析した症例の分布を示した。dele 16-17b 変異は全国に分布し、日本の CF 患者において最も頻度の高い CFTR 遺伝子変異である。dele 16-17b 変異は、フラグメントテストにより簡便かつ確実に検出できる。今後の日本人 CF 患者の CFTR 遺伝子解析に、dele 16-17b フラグメントテストを加える必要がある。

## F. 参考文献

1. 石黒 洋, 中莖みゆき, 山本明子, 洪 繁, 藤木理代, 丸山真介, 柳元孝介, 伊藤 治, 中島守夫, 成瀬 達 日本人嚢胞性線維症1症例の CFTR 遺伝子解析 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性膝疾患に関する調査研究 平成22年度総括・分担研究報告書 2011; 319-324.
2. Will K, Dork T, Stuhmann M, von der Hardt H, Ellemunter H, Tummler B, Schmidtke J. Transcript analysis of CFTR nonsense mutations in lymphocytes and nasal epithelial cells from cystic fibrosis patients. Hum Mutat 1995; 5: 210-20.
3. Lee JH, Choi JH, Namkung W, Hanrahan JW, Chang J, Song SY, Park SW, Kim DS, Yoon JH, Suh Y, Jang IJ, Nam JH, Kim SJ, Cho MO, Lee JE, Kim KH, Lee MG. A haplotype-based

molecular analysis of CFTR mutations associated with respiratory and pancreatic diseases. Hum Mol Genet 2003; 12: 2321-32.

4. Chillon M, Palacio A, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Estivill X. Identification of a frameshift mutation (1609delCA) in exon 10 of the CFTR gene in seven Spanish cystic fibrosis patients. Hum Mutat 1992; 1: 75-6.
5. Loirat F, Hazout S, Lucotte G. G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. Hum Biol 1997; 69: 419-25.
6. Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. <http://www.genet.sickkids.on>.
7. Paracchini V, Seia M, Coviello D, Porcaro L, Costantino L, Capasso P, Degiorgio D, Padoan R, Corbetta C, Claut L, Costantini D, Colombo C. Molecular and clinical features associated with CFTR gene rearrangements in Italian population: identification of a new duplication and recurrent deletions. Clin Genet 2008; 73: 346-52.

#### G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表
  - 1) 中莖みゆき, 山本明子, 藤木理代, 石黒洋, 成瀬 達 わが国の嚢胞性線維症における CFTR 遺伝子変異 第42回日本膵臓学会大会 パネルディスカッション「膵疾患の遺伝的背景を探る」 弘前市 2011年7月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし



## わが国における嚢胞性線維症症例の CFTR 遺伝子変異解析

研究報告者 吉村邦彦 日本赤十字社大森赤十字病院呼吸器内科 部長

共同研究者

安齋千恵子（国家公務員共済組合連合会虎の門病院呼吸器センター内科）

### 【研究要旨】

嚢胞性線維症(Cystic fibrosis, CF)は、欧米コーカサス系白人種に多い常染色体劣性遺伝性疾患であり、CFTR 遺伝子の変異に起因する。すでに1,800種以上の病的 CFTR 変異がデータベース上に登録されている。一方、わが国では極めて稀な疾患ではあるが、徐々に症例が蓄積され、その遺伝子変異のスペクトラムも解明されつつある。今年度は日本人の CF の姉妹例を新たに解析したので報告する。姉は解析時7歳。出生時胎便性イレウスのため手術。3歳から喘鳴・呼吸困難のため入院を繰り返した。脾機能不全のため、脂肪便・体重増加不良あり。胸部 CT では過膨張、気管支壁の肥厚を認め、喀痰培養では緑膿菌と MRSA を検出した。汗試験で  $\text{Cl}^-$  150 mEq/L。妹は解析時3歳。同様に出生時に胎便性イレウスのため手術施行。8カ月から喘鳴・呼吸困難が持続し、入院を繰り返した。脂肪便・体重増加不良あり。低酸素血症が高度で、胸部 CT では過膨張、気管支壁の肥厚が著明であり、喀痰培養では緑膿菌を検出している。ともに末梢血由来の DNA を用いた遺伝子変異検索を施行し、いずれも一方の CFTR 遺伝子の exon 4 に p.M152R[c.455T>G]変異が確認された。同遺伝子変異はこれまでわれわれがわが国の CF 症例で報告した変異であり[Morokawa et al. *Hum Mutat.* 2000; 15(5): 485], これで計3例の報告になる。他方の CFTR 遺伝子には変異は検出されなかった。以上、これまでにわれわれが遺伝子変異解析し得た CF 症例は合計27例となった。

### A. 研究目的

嚢胞性線維症(cystic fibrosis, CF)は肺、膵臓、消化管などの全身の外分泌管腔臓器を冒す常染色体劣性遺伝性疾患であり、多機能蛋白である cAMP 依存性  $\text{Cl}^-$  イオンチャネル CFTR をコードする遺伝子の突然変異に起因する<sup>1-5)</sup>。CF は欧米白人種にきわめて高率に発症する疾患であるが、一方、日本人をはじめとする東洋人種における CF の発症頻度はきわめて低いと考えられている<sup>3)</sup>。わが国の CF 症例に関しては昭和57年からの厚生省特定疾患難治性膵疾患研究班による全国調査から29例の確診例が報告されているが<sup>6)</sup>、Yamashiro ら<sup>7)</sup>の報告によるとわが国ではこれまでに文献的に約120例の CF 臨床診断例が記載され、発症頻度も出生35万人あたり1人程度と推定された。わが国における CF の発症頻度に関しては複数の推論があるが、ハワイ在住の東洋人での CF 発症頻度を出生9万人以上あたり1人とする報告<sup>8)</sup>を考慮すると、日本人ではおよそ出生10万~100万

人あたり1人程度の発症率と考えられる。

わが国の患者における CFTR 遺伝子変異解析に関して、過去には DNA 検体の得られた少数患者での、“c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del)” (legacy name:  $\Delta$ F508)など欧米で頻度の高い数種の変異検索、あるいは限られた数のエクソンでの PCR 増幅解析などが検討されたが、これらの方法では有意な CFTR 遺伝子異常は確認されず、変異状況は長らく不明であった<sup>3,5,6)</sup>。この主要な理由は、わが国の CF 患者における CFTR 変異が欧米患者と比較して、変異の頻度が少ないのみならず、そのスペクトラムが全く異なっていることに起因する。しかしながら、このような経緯の中、過去10数年わたり漸くわが国での CFTR 変異の状況が明らかにされてきている<sup>3,6)</sup>。われわれは PCR-SSCP 法、直接シーケンシング法などによる27エクソン全ての変異検出体制を確立し、当研究班によるわが国での全国調査で集積された症例などを中心に、CF 確診例ないし疑診例

の CFTR 遺伝子変異検索を進め、昨年度までに合計25例の CF 症例において遺伝子変異を確認し得た<sup>6)</sup>。これらの中には、欧米でもきわめて稀な変異や、これまで国際的な CF Mutation Database (CFMD) に登録記載のない CFTR 変異が大半を占めている<sup>9,10)</sup>。

今年度は日本人の CF の姉妹例を新たに解析したので報告する。

## B. 研究方法(倫理面への配慮)

今年度の解析対象は CF が強く疑われた日本人の姉妹例である。姉は解析時7歳であった。出生直後に胎便性イレウスのため手術を受けた。3歳から喘鳴・呼吸困難のため月1-2回の入退院を繰り返していた。腓機能不全のため、脂肪便・体重増加不良がある。胸部 CT では過膨張、気管支壁の肥厚を認め、喀痰培養では緑膿菌と MRSA を持続的に検出している。複数回施行した汗試験での平均 Cl<sup>-</sup> 150 mEq/

L であった。一方、妹は解析時3歳で、同様に出生時に胎便性イレウスのため手術を施行された。8カ月から喘鳴・呼吸困難が持続し、入院を繰り返している。同様に脂肪便・体重増加不良がある。低酸素血症が高度で、胸部 CT では過膨張、気管支壁の肥厚が著明であり、喀痰培養ではすでに緑膿菌が検出されている。全身状態が悪く、汗の Cl<sup>-</sup> 試験は施行していない。ともに末梢血の単核球から抽出した DNA を用いて CFTR 遺伝子の全27エクソンの塩基配列を、それぞれの5', 3'近接領域を含めて、直接シーケンス法で解析した。

倫理面への配慮:「虎の門病院 ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理委員会」において「日本人嚢胞性線維症患者における CFTR 遺伝子変異の検索」研究の審査を受け、承認を得た研究計画(受付番号第2005-5号)に準じて、患児の死亡前に主治医から患児の両親に対し当該症例の CFTR 遺伝子変異検索の臨

表1 これまでに確認された CF 症例の臨床的特徴とその CFTR 遺伝子変異

Case	Age	Sex	PI/PS	Cl <sup>-</sup>	Mutation	Exon	Mutation	Exon	Outcome
1	15 y	F	PI	201	H1085R	17b	H1085R	17b	alive
2	1 y 5 m	F	PI	126	M152R	4	1540del10	10	alive
3	1 y 1 m	F	PI	ND	ΔF508	10	L571S	12	deceased
4	15 y	M	PI	74	125C	1	Q98R	4	alive
5	42 y	F	PS	ND	E217G	4	Q1352H	22	deceased
6*	21 y	M	PI	166	125C	1	L441P	9	alive
7*	16 y	F	PI	100	125C	1	L441P	9	deceased
8	9 y	F	PI	166	1540del10	10	1540del10	10	alive
9*	30 y	M	PS	403	125C+T1086I	1, 17b	125C+T1086I	1, 17b	alive/ABPA
10*	28 y	F	PS	ND	125C+T1086I	1, 17b	125C+T1086I	1, 17b	alive
11	17 y	F	PS	ND	R75X	3	R347H	7	alive
12	26 y	F	PI	121	E267V	6b	T663P	13	alive/TP
13	28 y	M	PI	117	125C	1	460insAT	4	deceased
14	11 y	M	PI	154	125C+dele 16-17b	1, 16-17b	125C+dele 16-17b	1,16-17b	deceased
15	24 y	F	PI	91	L548Q	11	2848delA	15	alive
16	2 y	F	PI	ND	L441P	9	ND	?	deceased
17	18 y	M	PS	93	125C+dele 16-17b	1, 16-17b	125C+dele 16-17b+V1318I	1, 16-17b, 21	deceased/ABPA
18	9 y	F	PI	40	5T	intron 8	D924N	15	alive
19	13 y	F	PI	55	Q98R	4	Q98R	4	alive
20	29 y	F	PI	60	125C	1	R347H	7	alive
21	11 y	F	PS	22	R1453W	24	ND	?	alive
22	18 y	M	PI	ND	I556V	11	ND	?	alive
23	4 m	F	PI	ND	125C	1	G85R	3	alive
24	42 y	F	PS	ND	E217G	4	Q1352H	22	alive
25	2 y	F	PS	207	dele 16-17b	16-17b	dele 16-17b	16-17b	deceased
26*	7 y	F	PI	150	M152R	4	ND	?	alive
27*	3 y	F	PI	ND	M152R	4	ND	?	alive

PI/PS: pancreatic insufficiency/sufficiency, CP: consanguineous parents, \* siblings, TP: live lung transplantation, ABPA: allergic bronchopulmonary aspergillosis, ND: not detected

床的、遺伝学的意義を説明した上、同意を取得した。

### C. 研究結果

いずれの症例でも一方のCFTR遺伝子のexon 4にp.M152R [c.455T>G]変異が確認された。この変異は2000年にわれわれのグループが当時1歳半のCF女児において世界で初めて報告した変異であり、cDNAの455番目の塩基がT->Gに変わるため、結果として152番目のアミノ酸残基がメチオニン(Met)からアルギニン(Arg)に変わるミスセンス変異である<sup>10)</sup>。すでにCFMDに報告されている変異である<sup>5)</sup>。ちなみに、初回の報告例ではもう一方のアリルに同じくそれまでに報告のない1540del10変異が検出された<sup>10)</sup>。以上、これまでにわれわれが遺伝子変異解析し得たCF症例は合計27例となった。表1にその概略をまとめた。

### D. 考察

今回報告した2症例は、胎便イレウス、膵機能不全、難治性呼吸器感染症と呼吸不全を呈し、姉症例では汗Cl<sup>-</sup>濃度の異常高値も確認された典型的なCFである。一方のCFTR遺伝子にp.M152R [c.455T>G]変異が検出されたが、既報告例とは血縁関係はなく、出生地も異なる。詳細な検討にもかかわらず、もう一方のアリルでのCFTR変異は確認されていない。現時点ですでに重症であるため、今後の予後の厳しさが推定される。その意味でも新規の膵酵素剤(LipaCreon)や喀痰の粘稠度を軽減するドルナーゼアルファ(Pulmozyme)の早期導入が期待される症例である。両親は血族結婚ではなく、もう一人の同胞には現時点ではとくにCFを疑わせる臨床症状はない。両親、兄2人の遺伝子検査は施行しておらず、いずれの親がp.M152R変異のキャリアーであるかは不明である。

CFMDには現在全世界からこれまでに1,800種以上のCFTR変異が報告されているが<sup>5)</sup>、近年わが国においてもCFTR変異検出体制が確立され、着実に変異の様相が明らかにされつ

つある<sup>3,6,9,10)</sup>。わが国のCF症例では欧米人CFの変異スペクトラムと全く様相を異にしており、きわめて稀な既報変異か、未だ報告のない新規の変異が大半を占めている<sup>6)</sup>。今回の報告例のように、解析が進むにしたがって徐々に日本人CF症例でこれまで報告されたCFTR変異が反復して報告されるようになってきている<sup>11)</sup>。これまで繰り返し強調してきたように、欧米人を対象としたスクリーニング体系ではわが国のCF例での変異は検出され得ないため、現状では全ての症例において全エクソンの塩基配列を確認しなければ変異の有無に関する結論が導き出せない。わが国の実情に合わせた変異検出システムの確立が依然焦眉の課題である。

### E. 結論

今年度は新規の日本人のCFの小児姉妹例において、わが国で既報告のCFTR遺伝子変異p.M152R [c.455T>G]を確認した。今後も日本人CF症例を出来る限り多く解析し、原因となるCFTR遺伝子の病的変異の種類および頻度を明らかにしたうえで、変異検出システムを確立していきたい。

謝辞：症例の紹介・呈示を頂いたつくばメディカルセンター病院小児科 今井博則先生に深謝する。

### F. 参考文献

1. Welsh MJ, Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th edn. McGraw-Hill, New York, p3799-p3876, 1995.
2. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*, 256: 774-779, 1992.
3. 吉村邦彦. 日本における嚢胞性線維症. *呼吸*, 30(6): 535-545, 2011.
4. Tsui L-C. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med*, 151: S47-S53, 1995.
5. Cystic Fibrosis Mutation Data Base. <http://>

www.genet.sickkids.on.ca/cftr/.

6. 吉村邦彦, 安斎千恵子. わが国の cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異の解析状況. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究. 平成22年度総括・分担研究報告書, p315-318, 2011.
  7. Yamashiro Y, Shimizu T, Oguchi S, Shioya T, Nagata S, Ohtsuka Y. The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 24: 544-547, 1997.
  8. 吉村邦彦. 日本人における Cystic Fibrosis の実態とその CFTR 遺伝子変異. *Ther Res* 26: 1467-1475, 2005.
  9. Yoshimura K, Wakazono Y, Iizuka S, Morokawa N, Tada H, Eto Y. A Japanese patient homozygous for the H1085R mutation in the CFTR gene presents with a severe form of cystic fibrosis. *Clin Genet*, 56: 173-175, 1999.
  10. Morokawa N, Iizuka S, Tanano A, Katsube A, Muraji T, Eto Y, Yoshimura K. Severe cystic fibrosis in a Japanese girl caused by two novel CFTR gene mutations M152R and 1540del10. *Hum Mutat (Online)*, May; 15(5): 485, 2000.
  11. 吉村邦彦, 安斎千恵子. わが国の cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異の解析. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究. 平成20-22年度総合研究報告書, p433-437, 2011.
- 告書, p433-437, 2011.
- 3) 吉村邦彦. 日本における嚥胞性線維症. *呼吸*, 30(6): 535-545, 2011.
2. 学会発表 該当なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得 該当なし
  2. 実用新案登録 該当なし
  3. その他 該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 吉村邦彦, 安斎千恵子. わが国の cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異の解析状況. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究. 平成22年度総括・分担研究報告書, p315-318, 2011.
- 2) 吉村邦彦, 安斎千恵子. わが国の cystic fibrosis 患者における CFTR 遺伝子変異の解析. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 難治性膵疾患に関する調査研究. 平成20-22年度総合研究報