

試料提供についての同意撤回書

殿

私は「多発肝のう胞症に対する治療ガイドライン作成と試料バンクの構築」への参加に同意し、同意書に署名しましたが、その同意を撤回いたします。

平成 年 月 日

氏名 _____ 印 _____

自筆署名または記名押印

「多発肝のう胞症に対する治療ガイドライン作成と試料バンクの構築」への参加の同意撤回を確認いたしました。

平成 年 月 日

確認者
所属 _____

氏名 _____ 印 _____

残余試料の取り扱いについての同意書

殿

私は、「多発肝のう胞症に対する治療ガイドライン作成と試料バンクの構築」の研究に使用する試料が研究終了後に残った場合の取り扱い（組織バンクで保管すること）について、十分な説明を受けました。また、組織バンクでの保管に同意しなくても何ら不利益を受けないことも確認した上で、残余試料を組織バンクで保管することに同意します。

平成 年 月 日

氏名 _____ 印

自筆署名または記名押印

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「多発肝のう胞症に対する治療ガイドライン作成と試料バンクの構築」
分担研究報告書

バンキングした試料を用いた PLD 関連遺伝子の変異解析

研究分担者 竹内 朋代 筑波大学 医学医療系 診断病理 助教
研究協力者 李 冬平 筑波大学 医学医療系 診断病理 研究員

研究要旨

近年、腎病変を伴わない PLD の原因遺伝子として protein kinase C substrate 80K-H (*PRKCSH*)と *SEC63*が同定され、オランダやフィンランドの PLD 患者の家系で複数の遺伝子変異が報告されている。本邦における多発肝のう胞症(Polycystic Liver Disease, PLD)の病態を把握して治療ガイドラインを作成するために PLD 試料バンクで収集した試料を利用して、両遺伝子の変異解析を行った。昨年度の研究成果で PLD 試料バンクに保存しているホルマリン固定パラフィン包埋薄切切片を用いて DNA の抽出及び GAPDH 遺伝子の PCR が施行できることを確認された。今年度は、PLD 関連遺伝子の Open Reading Frame(ORF)の全長をカバーするプライマーセットを設計して、抽出した DNA について PCR を施行した。PCR 産物のシーケンス解析を行い、遺伝子変異の有無を調べた。*PRKCSH* 遺伝子の ORF カバー率は 63.1%であり、この中で遺伝子変異は認められなかった。しかし、*SEC63* 遺伝子では、ORF カバー率は 33.9%と低いものの複数の症例でエクソン 18 の同一箇所にも 1 塩基欠失の変異が認められた。遺伝子変異の認められた症例の中には免疫組織化学染色で *SEC63* タンパクの発現が認められなかった症例も含まれており、この変異が PLD の原因となる何らかの異常を引き起こす可能性が示唆された。

A.研究目的

PLD は希少な疾患で病態の詳細はわかっておらず、国内外における報告は症例報告が数編のみである。近年、PLD の原因遺伝子として *PRKCSH*と *SEC63*が同定された。オランダ、フィンランド及び北アメリカの PLD 患者の家系で複数の遺伝子変異が報告されたが、変異の種類は人種によって様々であった。国内においては、*PRKCSH*並びに *SEC63* 遺伝子の変異解析を含めて PLD 患者の試料を使った遺伝子解析の報告はなされていない。本研究は、前年度の難治性疾患克服研究事業で構築した PLD 試料バンクに集積した組織を活用して、日本の PLD 患者における *PRKCSH* 遺伝子及び *SEC63* 遺伝子の変異を解析することを目的とした。

B.研究方法

1. PLD 関連遺伝子の変異を解析するためのプライマー設計

海外における遺伝子変異解析の文献を参考にして、プライマー設計ソフトを使って *PRKCSH* 及び *SEC63* の ORF の全長をカバーするプライマーを設計、作製した (Table 1, 2).

2. PCR の施行

PLD 試料バンクで保存している試料から抽出した DNA 50ng を鋳型として PLD 関連遺伝子の PCR を行った. 鋳型 DNA に対してプライマー 0.2 μ M, dNTPs 0.2mM, Takara Ex Taq 1.25U を混合し, Table 3 で示したアニーリング温度で 35 サイクル反応させた. PCR で増幅ができなかった部位 (エクソン) についてはプライマーの再設計を行い, 再度 PCR を行った.

3. DNA シークエンスにおける変異解析

2 で得られた PCR 産物を精製して, ダイレクトシークエンスを行った. 解析は, 株式会社バイオマトリックス研究所の受託 DNA シークエンスサービスを利用した. 塩基配列のホモロジー検索を行い, 変異の有無を検証した.

C.研究結果

1. PLD 関連遺伝子の変異を解析するためのプライマー設計

PRKCSH 遺伝子の遺伝子座は 19p13.2 であり, ORF は 1581bp で 18 のエクソンを持つ. 既知文献を参考にしてエクソン 1 から 17 にかかる ORF の全長をカバーできるプライマーを設計した. *SEC63* 遺伝子の遺伝子座は 6q21 であり, ORF は 6500bp で 21 のエクソンを持つ. 既知文献を参考にしてエクソン 1 から 21 にかかる ORF の全長をカバーできるプライマーを設計した. 両遺伝子ともホルマリン固定試料から抽出した DNA を使用することを考慮して各プライマーペアの増幅長が 200bp 程度になるようにした.

2. PCR の施行

作製した PLD 関連遺伝子のプライマーを用いて, PLD 試料バンクで保存している試料から抽出した DNA の PCR を行った. PCR の増幅効率 は症例間並びにエクソンによりまちまちであった. また, PCR 産物の一部を用いて second PCR を行うことで, 一度の PCR では増幅が認められない症例においても増幅を確認することができた症例もあった.

3. DNA シークエンスにおける変異解析

PLD 関連遺伝子のプライマーを用いた PCR を行い, 得られた産物を精製してダイレクトシークエンスを行った. Forward と Reverse の両方のプライマーを用いてシークエンスを行うことで, 増幅長全ての塩基配列を読むことができた. 各遺伝子の解析結果を Table 4, 5 に示した. *PRKCSH* 遺伝子の解析では, ORF のカバー率は 63.1% であり, 変異は認められなかった. *SEC63* 遺伝子は ORF のカバー率は 33.9% とあまり高くなかったが, 複数の変異が認められた. 特にエクソン 18 では解析を行った 15 症例のうち 12 症例で変異が認められ,

そのうち 11 症例で c.2155a の 1 塩基欠失が認められた。PLD を発症していない患者の肝組織 6 症例を用いてエクソン 18 の塩基配列を調べたところ、全て野生型の塩基配列であった。エクソン 18 の変異が認められた症例のうち、4 症例は SEC63 抗体を用いた免疫組織化学染色においても陰性であり、1 症例は陽性部と陰性部が混在する症例であった。

D. 考察

PLD は希少性の高い難治性良性肝疾患であり、腹部膨満のために肝移植を行う症例も報告されている。病態については、女性に多い疾患であること、多発性腎のう胞に合併してみられることが多いということが分かっている以外に、詳細は不明である。本研究は、治療ガイドラインを作成するために重要な項目を明確にすることを目標として、前年度までにバンキングした試料を用いた遺伝子変異解析を行った。

昨年度の当該研究でバンキングした試料から遺伝子解析に必要な DNA を抽出することができるか否かを検証したところ、収量に差はあったものの 2 μ m 厚の薄切切片 1 枚から 200ng ~5 μ g の DNA を抽出することが可能であり、遺伝子解析に十分量の DNA を抽出できることがわかった。また、ホルマリン固定材料から抽出した DNA は断片化が進んでおり、PCR による増幅ができない場合があるため、抽出した DNA を用いてハウスキーピング遺伝子 (GAPDH) の PCR を実施したところ、全ての症例で PCR が可能であった。これより、ホルマリン固定試料から抽出した DNA であっても、施行した 110bp 程度の増幅長の PCR は可能であることがわかった。バンキングした試料を利用して PLD 関連遺伝子の解析を行う場合も primer 設計や増幅長を工夫することで遺伝子の全長をカバーした解析が可能であると考えられた。

近年、腎病変を伴わない PLD の原因遺伝子として *PRKCSH* 及び *SEC63* 遺伝子が同定された。オランダや北米の PLD 患者において両遺伝子の変異が報告されているが、変異の種類は人種によって様々で、家族歴のある患者の *PRKCSH* の変異は 20.7%、*SEC63* の変異は 5.7% であった。日本人患者における両遺伝子の変異解析は実施されておらず、またアジア人においても遺伝子変異を持つ症例は見つかっていない。本研究では、まず、それぞれの遺伝子に対する PCR プライマーを設計、作製した。これまでに報告されている変異は複数の箇所にわたり、頻度もまちまちであったため、遺伝子の ORF の全長をカバーできるようにエクソンごとにプライマーセットを設計した。PCR に用いる DNA はホルマリン固定試料より抽出したサンプルになるため、DNA の断片化が進んでいることも考えられた。そこで、増幅される PCR 産物の全長が 200bp 程度になるようにした。設計したプライマーを用いて PCR を行った結果、症例により PCR 効率に差がみられた。この理由として、使用した症例は多施設から提供を受けて保管した検体であるため、手術で検体が摘出されてからホルマリン固定標本作製されるまでの過程が施設間で異なり、標本から抽出した DNA の質も症例によって差があることが考えられた。また、設計したプライマーの中で 200bp 以上の PCR 産物が増幅されるエクソンでは一度の PCR ではバンドが確認できなかったが、PCR 産物の一部を用いて second PCR を行うことで、増幅を確認することができた症例もあった。これより、PCR 産物が 200bp 以上になる場合には second PCR が有効であることがわかった。一方でエクソン

によって PCR 効率の悪いプライマーもあり、これらはプライマーを再設計して検証する必要があると考えられた。次に PCR 産物を用いたサイクルシーケンスを行った。PCR 産物を精製して、ダイレクトシーケンスを行った結果、片側のプライマーのみで行った場合、全長が解読できていない箇所もあった。しかし、Forward と Reverse の両方のプライマーを用いてシーケンスを行うことで、増幅長全ての塩基配列を読むことができた。今後、正確な塩基配列を特定して変異の有無を調べるためには、両方のプライマーを使用する必要があることがわかった。今回解析を行った症例では、*PRKCSH* 遺伝子の変異は認められなかった。しかし ORF のカバー率が 63.1%であり、塩基配列が解読不能であった 36.9%の中に変異が認められる可能性もあり、より多くの試料を検証するとともに血液検体などの DNA の断片化の影響が少ない試料を解析する必要があると考えられた。*SEC63* 遺伝子では、ORF のカバー率が 33.9%と低かったものの複数の変異が認められた。特にエクソン 18 では 15 症例中 13 症例に変異が認められ、12 症例は同じ部位の変異であった。PLD を持たない患者の肝組織のシーケンスを行ったところ、PLD 患者に認められたエクソン 18 の変異は認められず、野生型を示した。これより、この変異は PLD 患者に特異的に認められる変異である可能性が高い。しかし、PLD の発症により生じる体細胞変異であるのか、家系的に引継がれている生殖細胞系列の変異であるのかは不明である。これまで文献的に報告されている変異は生殖細胞系列変異であるが、今回同定された変異はこれまでに報告がなく、同一患者の血液の入手ができないために体細胞変異であるか生殖細胞系列の変異であるか解析することが難しい。さらに

遺伝子変異の認められた症例の中には免疫組織化学染色で *SEC63* タンパクの発現が認められなかった症例も含まれており、この変異が PLD の原因となる何らかの異常を引き起こす可能性が示唆された。今回、新たに見つかった遺伝子変異について詳細に調べるためにも血液検体などを利用した多数の症例の解析が必要であると考えられた。

E. 結論

- 1) バンキングした試料を用いた PLD 関連遺伝子の PCR では、症例やエクソンにより PCR 効率が異なった。
- 2) PCR 効率の悪いサンプルについては second PCR の施行やプライマー設計の工夫が有効であった。
- 3) バンキングした試料において、*PRKCSH* 遺伝子の ORF のカバー率が 63.1%で遺伝子変異は認められなかった。
- 4) バンキングした試料において、*SEC63* 遺伝子の ORF のカバー率は 33.9%と低かったが複数の遺伝子変異が認められた。
- 5) *SEC63* 遺伝子のエクソン 18 で多くの症例で同一の変異が認められ、これらの症例の中には免疫組織化学染色で陰性のものも含まれており、PLD の原因となる何らかの異常を引き起こす可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1 *PRKCSH* 遺伝子の ORF をカバーするプライマー

Exon	Sequence	Size	Exon	Sequence	Size
1-1F	CCACTCCAAGATGGAGGTA	186	10F	CGTGGTGGCCTAGATCTTGA	205
1-1R	GTCACTTCCGGTCGTACGTT		10R	AGAGGCAGCTCCTTTGTGAG	
1-2F	TTCACAGTCCTGCCAAGAT	227	11-1F	GACCCTGAGTCCACAACACC	203
1-2R	GCTCGTTCACACCTACACGA		11-1R	ACCTCGGAATCCTCCTCCT	
2F	TCCAATTGGCTGGAAGTAGC	261	11-2F	GCCACAGAGGAGGAGGA	161
2R	CGGAAACTGAGTCAAAGG		11-2R	AGGGTCAGTGAGTAGCCCTTC	
3F	TGGGAGGACAGAGGTGGTAT	216	12F	TTGGGGGAGAAGTGGAGAC	239
3R	TGATGGATGAACAGAGAAAAGG		12R	ATCTTCCCTCGACCTGTGC	
4F	GTGGGTCAGGGGCTCTTATC	229	13F	ATGAGGGTATGGGAGCACAC	227
4R	CCTCCCTCTACCACCTTTC		13R	CTGGGAGTCAAGGAGCAGTC	
5F	GCACTGCCAGGTCTGATCTT	154	14F	TCTGTCGTCCTGGGTCAG	201
5R	GGAGCCAGGCAAAGTCTT		14R	GCCTCCCACCCTGCCAGT	
7F	AGCTGGTCTCTTGCCTTCTG	187	15F	TGTGGGAGGAGGCTGGAATC	173
7R	GGTGAGTCCTTGGCCATTTC		15R	AGGAGGAGGCAGAGGGAAG	
8-1F	GGTGACAGAGGTGGCTTCTT	109	16-1F	GATACGTCTACCGCCTCTGC	230
8-1R	TCCCGTCCATGTCATCATC		16-1R	CGTGCCTTGCTCATACTTCA	
8-2F	AAGCCCAACAGGAGCA	163	16-2F	CGACCACGACAAGTTCAGTG	205
8-2R	CAAGGAGGATCTGGCTGGT		16-2R	GCTGGTCACCATGGTCTCTT	
9F	CCTGCAGGGAAGAACAGGT	209	17F	CTCTCGAGCACCCGTCTG	223
9R	CCTGCAGGGAAGAACAGGT		17R	CAGGCCGACGAGACTCCAC	

Table 2-1 *SEC63* 遺伝子の ORF をカバーするプライマー

Exon	Sequence	Size	Exon	Sequence	Size
1F	GGAGTGCAGAGCGTGGTC	191	9-2F	GGCTGGAGCTTCTGAATTTG	203
1R	ACTCACCGGCATTCTGATCT		9-2R	TGCTGCCAATTTCTCTGATT	
2F	CCAGTTAGCTGGTTTTACCTTCA	160	10-1F	AAAGATGCCACAAGCAGACC	248
2R	GAATAATATTTGGCTGGGGTTTT		10-1R	GCAAGATGAGACAGTAAAAGAACTC	
3F	TGCCTTGACCTTGCCATAAT	240	10-2F	ACCTGCCCATATAGCCTGAA	180
3R	CATGGGACCATTAAACTAATATGC		10-2R	AGAGCAATGCGAGAACAACACT	
4F	AGGGAGCCACAGTAGCAGAA	176	11F	GTCCAGCCCTGTTTCTTTTT	237
4R	ACCACTGCACCTGGCTTATC		11R	ATTGCTGAAGTCCCTGAACG	
5F	TGAGTTGGTTGGCTAATGGA	214	12-1F	CCAACCTTTGGCATCCCTAGA	121
5R	TCATCATTTACCACACCTTGAG		12-1R	TGACAGGACAAACTGCTGAAA	
6F	TTGTGTTGTGGGGGAGAGTT	241	12-2F	TTGCTGGATTTTGTGTGGT	186
6R	CCAAGACAGATTGTACATAACAAAAA		12-2R	ACTCCCAAGGACAGCCATAA	
7F	CCTGACGAAGGCCATAATTC	156	13-1F	CTATCCAGGATTTGGTGAGTTT	213
7R	GGGAGACTCCAAAACATGTCA		13-1R	AAAAGGGAAGCAATGCTCAA	
8-1F	CTCCCAAAGTGCTGGGATTA	150	13-2F	GCTAAGTTTTGCTGTTTGCATT	175
8-1R	TGCGTATTAGAATCTGGTCTCC		13-2R	TACAGCCATTGTTTGCCTTG	
8-2F	TAGGGCTCTTGGTGGTATCG	158	14-1F	GATGAAGATAGCAACAACATCACA	161
8-2R	CACAAAACAATGTGATTAATAGCAAA		14-1R	TTGACTTTGACAATGAGGGAAA	
9-1F	TTAAGTATCTCAGGAGGGGGAAT	150	14-2F	TGCAGTTTGAAAGATTGCTTTG	157
9-1R	TATCCGTTGGTCTGCTTGTG		14-2R	GGTTCGGAAACCCAAGTTTT	

Table 2-2 *SEC63* 遺伝子の ORF をカバーするプライマー

Exon	Sequence	Size
15F	TGCAGTTTGAAAGATTGCTTTG	166
15R	GGTTCGGAAACCCAAGTTTT	
16-1F	TTGCTCTGGGAGAGTAATTCAG	180
16-1R	AGCAGTTTTTCTTGGGTCCTTT	
16-2F	GGAGGATGGCAACAGAAGAG	216
16-2R	CACGTAAGACTTGAACATTTTAGTTTG	
17-1F	TGTGTTTGCCTTTCCTTTT	120
17-1R	TCATCTTCTCACTTGGGAATC	
17-2F	GGGCAGTGATTCTGAAGAAGA	186
17-2R	CAAAACCCAAAGCTATCATCA	
18F	GGAGTGGCAAGAATTACAACAA	156
18R	CCTGAGGAGAAAGTGAATGGA	
18-2F	CAACAAAGCATACAGCGAAAA	175
18-2R	CACACGACAGAGGGCTAAAA	
19-1F	ACCAAGCAGTTTGTGTCAGTGC	169
19-1R	TCTGCTCCTTCCTTATCTGCAA	
19-2F	TGGTGGCTTTACATTGCAGA	147
19-2R	AAGCAGCATGATGGTGACAG	
20-1F	TGAGCTGTTTCCTCCCCATA	160
20-1R	CCTTCAATGGTTTAATCTGATCC	
20-2F	CAGGCAAGCCTGGAAATTAT	198
20-2R	TGAGATGACTTCTTTTTCCTTCC	
21-1F	TTTCTCCCAAATTTCTGATG	117
21-1R	TTCATCCCCCTCTATTGCTG	
21-2F	AGCCTGTGCCAGAAAATCAC	156
21-2R	TGCAAACACTGTGGTCCATT	

Table 3 設計した各プライマーに対するアニーリング温度

PRKCSH		SEC63			
Exon	Annealing temp.	Exon	Annealing temp.	Exon	Annealing temp.
1-1	63°C	1	59°C	15	60°C
1-2	64°C	2	59°C	16-1	56°C
2	63°C	3	58°C	16-2	59°C
3	63°C	4	60°C	17-1	59°C
4	63°C	5	56°C	17-2	57°C
5	62°C	6	58°C	18	56°C
7	63°C	7	59°C	19-1	58°C
8-1	59°C	8	59°C	19-2	58°C
8-2	60°C	9-1	58°C	20-1	58°C
9	62°C	9-2	58°C	20-2	56°C
10	59°C	10-1	56°C	21-1	55°C
11	60°C	10-2	58°C	21-2	56°C
12	62°C	11	59°C		
13	60°C	12-1	58°C		
14	61°C	12-2	59°C		
15	61°C	13-1	58°C		
16-1	59°C	13-2	56°C		
16-2	60°C	14-1	58°C		
17	60°C	14-2	56°C		

Table 4 PLD 試料バンクに保存した組織における *PRKCSH* 遺伝子の変異解析

Exon	症例															ORF カバー率 (%)
	PLD1	PLD2	PLD7	PLD8	PLD9	PLD10	PLD11	PLD12	PLD13	PLD14	PLD15	PLD17	PLD18	PLD21	PLD22	
Exon1	w.t.	w.t.	w.t. 51%	w.t. 63%	w.t.	w.t. 63%	w.t. 63%	w.t. 63%	w.t. 63%	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t. 63%	ND	75.3
Exon2	w.t.	w.t.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	60.0
Exon3	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	ND	w.t.	ND	ND	ND	73.3
Exon4	w.t.	w.t.	w.t.	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	93.3
Exon5	w.t. 69%	w.t. 74%	w.t.	w.t. 16%	w.t. 16%	w.t. 16%	w.t. 17%	w.t. 17%	ND	w.t. 16%	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	55.9
Exon6	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	ND	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t. 47%	83.1
Exon7	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t. 82%	w.t.	92.1
Exon8	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	ND	w.t.	w.t.	w.t.	ND	w.t.	w.t.	86.7
Exon9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t.	ND	w.t.	ND	w.t. 70%	w.t. 44%	20.9
Exon10	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	ND	ND	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	80.0
Exon11	w.t. 79%	w.t. 84%	ND	ND	w.t. 67%	w.t.	ND	ND	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t. 79%	w.t.	w.t.	60.6
Exon12	w.t.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t. 46%	w.t. 61%	w.t.	w.t.	w.t.	w.t. 62%	37.9
Exon13	w.t.	w.t.	w.t.	ND	ND	w.t.	ND	w.t.	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	73.3
Exon14	w.t.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t.	ND	w.t.	ND	w.t.	w.t.	33.3
Exon15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t.	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	ND	33.3
Exon16	w.t.	w.t.	w.t.	ND	w.t.	ND	ND	ND	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	66.6
Exon17	w.t.	w.t.	ND	w.t.	w.t.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t.	w.t.	ND	w.t.	46.7

w.t.: wild type

ND: not detectable

%は解読可能であった割合を示した

Table 5-1 PLD 試料バンクに保存した組織における *SEC63* 遺伝子の変異解析

Exon	症例															ORF カバー 率(%)
	PLD1	PLD2	PLD7	PLD8	PLD9	PLD10	PLD11	PLD12	PLD13	PLD14	PLD15	PLD17	PLD18	PLD21	PLD22	
Exon1	w.t. 71%	w.t. 89%	ND	ND	ND	w.t. 77%	ND	ND	ND	ND	w.t. 71%	w.t. 71%	ND	w.t. 70%	ND	29.9
Exon2	w.t.	w.t.	w.t.	ND	w.t.	w.t.	ND	w.t.	ND	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	w.t.	80.0
Exon3	w.t.	w.t.	ND	ND	ND	w.t.	ND	ND	ND	ND	ND	w.t.	ND	w.t.	w.t.	40.0
Exon4	w.t. 68%	mt 54%	ND	ND	w.t. 39%	w.t. 51%	mt 56%	w.t. 51%	ND	w.t. 39%	mt 61%	w.t. 67%	w.t. 60%	mt 60%	mt 62%	44.5
Exon5	w.t. 53%	w.t. 51%	w.t. 54%	w.t. 40%	ND	ND	w.t. 40%	w.t. 34%	ND	w.t. 53%	mt 52%	w.t. 56%	ND	mt 53%	mt 54%	36.0
Exon6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Exon7	w.t. 68%	w.t. 67%	ND	ND	w.t. 64%	mt 68%	ND	ND	ND	w.t. 69%	w.t. 65%	w.t. 67%	w.t. 67%	w.t. 68%	w.t. 65%	44.5
Exon8	w.t. 59%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t. 68%	ND	w.t. 63%	w.t. 62%	16.8
Exon9-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t. 37%	ND	w.t. 37%	w.t. 55%	8.6
Exon9-2	w.t. 75%	w.t. 66%	w.t. 65%	ND	w.t. 66%	w.t. 64%	ND	w.t. 65%	w.t. 67%	w.t. 65%	w.t. 75%	w.t. 76%	w.t. 74%	w.t. 74%	w.t. 68%	60.0
Exon10-1	w.t. 74%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	mt 67%	w.t. 50%	mt 75%	w.t. 75%	ND	mt 74%	mt 74%	32.6
Exon10-2	w.t. 67%	w.t. 64%	ND	ND	ND	w.t. 63%	ND	ND	w.t. 63%	w.t. 62%	mt 67%	w.t. 67%	w.t. 63%	mt 71%	mt 65%	43.5
Exon11	w.t. 74%	w.t. 75%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t. 73%	w.t. 76%	w.t. 74%	w.t. 75%	w.t. 75%	ND	34.8
Exon12-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Exon12-2	w.t. 74%	w.t. 63%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t. 70%	w.t. 70%	w.t. 70%	ND	w.t. 73%	ND	28.0

w.t.: wild type

mt: mutation

ND: not detectable

%は解読可能であった割合を示した

Table 5-2 PLD 試料バンクに保存した組織における *SEC63* 遺伝子の変異解析

Exon	症例															ORF カバー 率(%)
	PLD1	PLD2	PLD7	PLD8	PLD9	PLD10	PLD11	PLD12	PLD13	PLD14	PLD15	PLD17	PLD18	PLD21	PLD22	
Exon13-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Exon13-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	mt 46%	w.t. 34%	mt 41%	ND	w.t. 41%	mt 40%	13.5
Exon14-1	mt 69%	w.t. 66%	w.t. 66%	ND	w.t. 68%	mt 65%	ND	w.t. 66%	ND	ND	w.t. 70%	mt 70%	mt 65%	w.t. 65%	w.t. 63%	48.9
Exon14-2	w.t. 66%	w.t. 68%	ND	ND	ND	ND	ND	mt 69%	w.t. 66%	ND	w.t. 66%	ND	w.t. 69%	w.t. 69%	mt 73%	36.4
Exon15	w.t. 55%	w.t. 52%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t. 67%	ND	ND	ND	11.6
Exon16-1	w.t. 66%	w.t. 66%	ND	ND	ND	w.t. 66%	ND	ND	ND	w.t. 63%	mt 61%	w.t. 58%	ND	mt 64%	mt 71%	34.3
Exon16-2	w.t. 68%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t. 67%	ND	mt 69%	mt 62%	17.7
Exon17-1	w.t. 33%	w.t. 33%	w.t. 35%	mt 53%	mt 53%	w.t. 34%	mt 55%	mt 53%	ND	mt 56%	mt 56%	w.t. 35%	ND	mt 58%	mt 35%	39.3
Exon17-2	w.t. 68%	w.t. 80%	ND	ND	w.t.	w.t. 83%	w.t. 56%	w.t. 56%	w.t. 54%	w.t. 73%	mt 67%	w.t. 68%	w.t. 68%	mt 75%	mt 69%	54.5
Exon18	mt 72%	mt 71%	mt 71%	mt 60%	mt 71%	mt 71%	mt 71%	mt 71%	w.t. 63%	w.t. 62%	mt 72%	w.t. 69%	mt 72%	mt 72%	mt 72%	74.1
Exon19-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Exon19-2	w.t. 63%	w.t. 61%	w.t. 63%	ND	w.t. 45%	w.t. 63%	w.t. 62%	w.t. 55%	w.t. 64%	w.t. 61%	w.t. 59%	w.t. 61%	w.t. 44%	w.t. 63%	w.t. 62%	55.1
Exon20-1	w.t. 69%	w.t. 69%	w.t. 69%	ND	w.t. 69%	ND	w.t. 53%	w.t. 68%	w.t. 70%	w.t. 70%	w.t. 73%	w.t. 73%	ND	w.t. 68%	w.t. 70%	54.7
Exon20-2	w.t. 79%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	w.t. 74%	w.t. 71%	w.t. 76%	w.t. 77%	ND	w.t. 78%	w.t. 76%	35.4
Exon21-1	ND	w.t. 50%	ND	ND	w.t. 51%	mt 55%	w.t. 51%	ND	ND	ND	w.t. 52%	ND	ND	ND	ND	17.3
Exon21-2	w.t. 56%	w.t. 60%	w.t. 53%	w.t. 62%	w.t. 62%	w.t. 61%	w.t. 63%	w.t. 60%	w.t. 62%	w.t. 61%	w.t. 59%	w.t. 60%	w.t. 60%	w.t. 63%	w.t. 62%	60.3

w.t.: wild type

mt: mutation

ND: not detectable

%は解読可能であった割合を示した

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「多発肝のう胞症に対する治療ガイドライン作成と試料バンクの構築」
分担研究報告書

嚢胞に対するオレイン酸モノエタノールアミン注入療法の検討

研究分担者 工藤正俊 近畿大学医学部附属病院消化器内科 教授

研究要旨

症候性肝嚢胞に対し、我々は1999年よりオレイン酸モノエタノールアミン（オルダミン；EO）注入療法を行ってきた。今回は既報の報告に加え、新たに追加した7例の経過報告を加え報告する。

A. 研究目的

肝嚢胞治療の目的は嚢胞内体積を減少させる事によって肝腫大による腹部膨満や腹痛などの圧迫症状の軽減あるいは消失させる事である。内科的治療法としての嚢胞内容穿刺吸引術、肝動脈塞栓療法、外科的治療法としては嚢胞開窓術、肝切除術、肝移植があるが、その選択については明確なコンセンサスは得られていない。当科では1999年より肝嚢胞に対してオレイン酸モノエタノールアミン（オルダミン；EO）注入療法を導入し、その有効性を報告してきた。（Nakaoka R et al. AJR 2009；193：1540-45.今回、さらに症例を追加し、治療経過について検討したので報告する。

B. 研究方法

1999年1月から2012年12月まで、肝嚢胞に対するEO注入療法を受けた患者24人（平均年齢66歳、男性6人、女性18人）を検討した。エコーガイド下に肝嚢胞を穿刺し、7Frのピッグテールカテーテルを留置した。その後嚢胞内容を吸引したのち、EOを注入し24時間クランプした。その後カテーテルを開放し排液が少量になった時点でカテーテルを抜去。治療後の嚢胞の大きさを計測し治療効果を経過観察した。合併症についても記録を行った。

C. 研究結果

観察期間の中央値は24.5か月（1～141か月）で、嚢胞体積の平均縮小率は93%であった。重篤な合併症として1例に穿刺嚢胞内感染を経験した。ドレーンの再留置と抗生物質の点滴投与にて軽快した。その他の合併症としては経過観察可能な発熱やドレーン留置の腹痛などを数例に認めたがいずれも経過観察にて軽快した。

D. 考察

肝嚢胞に対する治療において穿刺排液のみでは高率（78～100%）に嚢胞の再腫大が起こることが報告されており^{1,2)}、嚢胞を穿刺排液後には硬化剤を注入するが多い。エタノール注入は比較的安全であり、Montorsi らは 21 例中 15 例で嚢胞の完全消失を認め、残る 6 例に関しても 50%以上の縮小が見られたと報告している³⁾。同報告では Simple cyst の場合の再発率は 20%程度であるが、Polysystic liver disease (PCLD) に対するエタノール注入による再発率は 78%と報告している。Hagiwara らは症候性肝嚢胞に対しミノサイクリン 500mg を one-shot 注入し、嚢胞の消失が可能であった事を報告しているが⁴⁾、ミノサイクリンの投与も Polysystic liver disease に対しては一時的な効果しかなかったとの報告もある。以上のように Simple syst に対する各硬化剤の使用はある一定の治療効果は得られているが、PCLD に対する治療効果は一般的に乏しいのが現状である。今回、過去に報告した 17 例の EO 注入例⁵⁾に新たに 7 例を追加した経過を報告した。追加症例で 1 例肝膿瘍の合併を認めたが、嚢胞の縮小率は全例で良好な結果を示した。EO は嚢胞上皮を破壊し嚢胞の消褪をもたらすと考えられる。EO の重篤な副作用に急性腎不全、急性呼吸窮迫症候群、肺水腫の報告がある。血管内に誤って EO が流入すると上記の様な副作用が生じる可能性があるため穿刺を行う際に血管損傷がない様に細心の注意を払って治療を行う必要がある。嚢胞と胆管との間に交通がある場合には EO の注入による胆管炎や胆管狭窄を引き起こす可能性があり、EO 注入前には透視下にて嚢胞と胆管との交通がない事を確認する必要がある。判断に迷う際には嚢胞内のビリルビン濃度を確認する事も必要である。嚢胞壁を直接穿刺する場合にも EO が腹腔内に漏れ出る可能性があり、今後症例を蓄積してどのような症例に EO 注入が可能かどうかを検討する必要がある。

E. 結論

肝嚢胞に対する穿刺排液治療において EO 注入療法は有用であるが、適応症例の選択など更なる検討を要する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

1. Erdogan D, van Delden OM, Rauws EAJ, et al. Results of percutaneous sclerotherapy and surgical treatment in patients with symptomatic simple liver cysts and polycystic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3095-3100.
2. Bean WJ, Rodan BA. Hepatic cysts: treatment with alcohol. *AJR Am J Roentgenol* 1985; 144: 237-241.
3. Montorsi M, Torzilli G, Fumagalli U, et al. Percutaneous alcohol sclerotherapy of simple hepatic cysts. Results from a multicentre survey in Italy. *HPB Surg* 1994; 8: 89-94.
4. Hagiwara A, Hayashi N, Kono M, Suzuki K, Kashio S, Fusamoto H, Kamada T. Successful treatment of a hepatic cyst by one-shot instillation of minocycline chloride. *Gastroenterology* 1992; 103: 675-677.
5. Ryosuke N, Kunal D, Masatoshi K et al. Percutaneous Aspiration and Ethanolamine Oleate Sclerotherapy for Sustained Resolution of Symptomatic Polycystic Liver Disease: An Initial Experience *AJR*:193:1540-1545.2009.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
「多発肝のう胞症に対する治療ガイドライン作成と試料バンクの構築」
分担研究報告書

多発性肝嚢胞に対する外科治療

研究分担者 川岸 直樹 東北大学病院 臓器移植医療部 准教授

研究要旨

多発性肝嚢胞は、多発性嚢胞腎を伴うこともあるまれな遺伝性疾患である。多発性嚢胞腎は進行性で慢性腎不全となり、血液透析や腎移植となる症例が多いが、一方、多発性肝嚢胞は、巨大な嚢胞が肝臓に存在しても肝機能は正常であることが多い。しかし、巨大な肝嚢胞は、腹痛、呼吸困難を伴うことがあり、患者の QOL を低下させる。そのような患者は、外科的な開窓術、肝切除、肝移植の適応となる。肝移植は、両葉にまたがる多発性の嚢胞で、肝腫大が著しく、低栄養で、腹水のある患者に行われる。腎機能が温存されていて、生命予後自体は比較的長いと見込まれる患者で、肝嚢胞による圧迫症状のある患者は、しばしば肝切除か肝移植か議論になる場合がある。本稿では、多発性肝嚢胞に対する治療ガイドラインでの外科治療と多発性肝嚢胞に対する外科治療の動向を概説する。

A. 研究目的

二次アンケートの結果から作成した、「多発性肝嚢胞に対する治療ガイドライン」の外科治療と本邦、海外での多発性肝嚢胞の外科治療について概説する。

B. 研究方法

本研究は、患者数が少なく研究の進みにくい PLD について、重点的・効率的に研究を行うことのできる体制を整えるため、PLD 患者の臨床情報や研究用試料を保存するバンクの構築を目指し、肝疾患や難治性疾患、情報管理に関する専門家との協力の下に進めていく。最終的には、PLD の治療ガイドラインを作成する。

1. 患者数の調査（一次調査）

1) 調査対象者

肝臓研究会登録施設を中心とした全国の肝疾患及び難治性疾患を専門とした医療機関の医師を対象とした。

2) 調査実施方法

全国490 施設の医療機関に調査票を郵送にて送付し、郵送またはFAX により回収した。調査期間は平成22 年9 月9 日から12 月7 日とした。調査は各医療機関で診療している患者の有無のみを調べるものであり、個人を特定できるものではない。

3) 調査票

現時点における患者の有無を調査するための調査票を作成した。

4) 集計方法

筑波大学大学院人間総合科学研究科において調査結果の集計を行った。

2. 症状・治療方法などの実態調査（二次調査）

1) 調査対象者

一次調査において、患者有りとは回答した167 施設の医療機関の医師を対象とした。

2) 調査実施方法

167 施設の病院に調査票を郵送にて送付し、郵送により回収した。調査期間は平成22 年12 月1 日から平成23 年2月7日とした。

3) 調査票

調査項目は、患者の年齢、性別、初診日、初診理由、治療の有無、治療適応となった症状、治療方法、治療効果とした。

4) 集計方法

筑波大学大学院人間総合科学研究科において調査結果の集計を行った。

3. 試料（組織）の収集

これまでにPLD 患者の肝切除または肝移植を行い、既存試料（組織）を保管している施設より、検体提供を受けた。

1) 対象

過去にPLD の肝切除または肝移植を行った5 施設（北海道大学、東京大学、東京女子医科大学、京都大学、京都府立医科大学）に保管されている13 症例の既存試料（組織）を対象とした。

2) 試料（組織）収集

試料（組織）の提供を受けるにあたり、提供機関において連結不可能匿名化がなされているものに限り、収集・管理を行った。試料の保管は既に筑波大学で手術検体の収集・管理を行っているつくばヒト組織バイオバンクのシステムを活用した。試料（組織）は、検体保存用に温度異常感知警報装置を搭載した超低温庫で二次元バーコードシステムによる管理を行った。

（倫理面への配慮）

収集・管理する試料（組織）は連結不可能匿名化された既存試料（組織）であり、臨床研究に関する倫理指針に基づき、試料（組織）提供機関の代表者等に対して機関外への試料提供についての報告を行った。また、研究用に試料（組織）を収集、保管することに関しては、すでに筑波大学内の倫理委員会において許可を得た。本研究の遂行においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）、疫学に関する倫理指針および臨床研究に関する倫理指針を遵守した。

C. 研究結果

二次アンケートをもとに、外科的治療法として、嚢胞開窓術、肝切除術、肝移植術の3つの治療法をガイドラインに記した。二次アンケートでは、嚢胞内容穿刺吸引に次いで肝切除術（同時に開窓術が行われた症例を含む）が12.3%と2番目に多い治療法であった。ついで、開窓術（同時に肝切除術がおこなわれた症例は除く）が9%、肝移植術1.9%と続いていた。それぞれの外科的治療法で主治医が効果ありと解答した割合は、肝切除術が96%、開窓術が92%、肝移植術が100%であった。

嚢胞開窓術であるが、開腹または腹腔鏡を用いて嚢胞壁を腹腔内に露出させる手技である。外科的治療の中では最も侵襲が少なく、嚢胞が肝表面に存在する場合に特に有効である。近年は腹腔鏡下での施行例が増加している。開腹術と比べ遜色ない治療結果がある反面、視野がとりづらく、アプローチが困難な部位に存在する症例では適応となりにくい。再発率は、20～72%と報告されている。合併症は、腹水、胸水、出血、胆汁ろうなどが20%にある。致死率が2%あったという報告がある。アンケート調査結果では、28.3%に合併症がみられ、Clavien分類IIIb以上の重症合併症は1.9%であった。

肝切除であるが、全肝容積の3割程度正常な肝臓が残らなければ、施行できない。しばしば嚢胞開窓術が併用される。通常の肝切除と比較し、嚢胞の圧排による脈管の解剖学的変位が著しく、肝実質の著名な線維化もみられるため、手術難易度が高く、合併症が多いと報告されている。再発率は3～34%である。また、将来肝移植の可能