

り、診断の精度や再現性に問題があることが理由としてあげられる。近年、新たなアプローチとして免疫組織化学染色によるHD類縁疾患の病理学的診断・分類の試みが報告されるようになったが、HD類縁疾患の定義に利用されるまでには至っていない。

今回、HGについては、HuC/D染色にて、概ね、20個/cm以上のHuC/D陽性細胞があれば、HGの可能性は低いと考えられた。対照群の中に、HuC/D陽性細胞が20個/cm以下の症例が5例（臍腸管遺残 1, メッケル憩室 1, NEC 1, 鎖肛 1, 胎便性腹膜炎 1）認められたが、その原因は明らかでなかった。

今回の全国調査の登録症例全例で、新生児期早期に腸閉塞症状を認めた。したがって新生児期の腸閉塞の緊急手術時に、HGの病理診断に必要な全層生検を行うことを想定し、生検部位や方法（腸管全周を人工肛門造設部で採取するなど）について、病理診断ガイドライン（案）を作成した。今後この方法により、統一された全層生検のデータが集積すれば、HGの診断基準として、具体的な数値が策定できると考えられる。

E. 結論

HGの病理診断ガイドラインの策定にあたり、腸管神経叢の神経節細胞について免疫組織化学染色により、評価を試みた。

HuC/D抗体を用いた免疫組織学的検討では、HG症例の筋層間神経節細胞は全例で20/cm未満であった。

HDとの鑑別を確実にを行うことを主旨とし、HG病理診断のためのガイドライン（案）を作成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. Masahiro Hatanaka, Astuko Nakazawa, Nastuko Nakano, Chizuko Haga, Hajime Okita, Kentaro Matuoka, Mariko Aoki, Akihiro Igarashi, Junko Fujino, Makoto Suzuki, Yuki Ishimaru, Kazunori Tahara, Hitosi Ikeda. Pathological Evaluation of Hypo ganglionosis using Immunohisto chemistry. 第46回太平洋小児外科学会議, Hunter Valley, Australia 2013.4.10.
2. 畑中政博, 中野夏子, 羽賀千都子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中澤温子: 免疫組織化学染色を用いたヒルシュスプルング病類縁疾患に対する病理学的評価. 第50回日本小児外科学会学術集会, 東京, 2013.6.1.
3. 畑中政博, 中野夏子, 羽賀千都子, 大喜多肇, 松岡健太郎, 中澤温子: 免疫組織化学染色を用いた腸管神経叢発育の評価. 第102回日本病理学会総会, 札幌, 2013.6.7.

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

Hirschsprung病類縁疾患： 「疾患特異的iPS細胞を用いた疾患解析と新規治療法開発の可能性」 に関する研究

研究分担者 中畑 龍俊 京都大学iPS細胞研究所 副所長・特定拠点教授

【研究要旨】

Hirschsprung病やHirschsprung病類縁疾患は、小児期からの消化器系の希少難治性疾患群であり、その原因については不明な点が多い。本分担研究においては、疾患の原因解明を目的として、疾患特異的iPS細胞を樹立し、疾患解析を行った。

今回我々は、Hirschsprung病患者末梢血より疾患特異的iPS細胞を樹立し、iPS細胞を神経堤細胞・さらには末梢神経およびグリア細胞へと分化誘導する分化系を確立した。

本研究によりHirschsprung病やHirschsprung病類縁疾患の病態像が明らかになり、新規治療法の開発につながれば、患者や家族に福音をもたらすのみならず、医学研究領域に本邦発の大きなインパクトを与えることが期待される。

研究協力者

桐野 浩輔

（京都大学iPS細胞研究所
大学院特別研究学生）

Hirschsprung病類縁疾患は、その希少性により原因を含めた疾患概念に関するコンセンサスが十分に得られていないが、一部ではHirschsprung病と類似した腸管神経系発生異常が原因として考えられている。

A. 研究目的

Hirschsprung病およびHirschsprung病類縁疾患は、ともに小児期より腸管蠕動不全をきたす疾患である。

Hirschsprung病は、胎生期における腸管神経系の発生異常によって生じ、腸管神経系細胞の前駆細胞である神経堤細胞の機能異常が主な疾患原因と考えられている。モデルマウスにおける表現型がヒトでの表現型と異なること・胎生期にのみ存在するヒト神経堤細胞を実験材料として手に入れることが困難であることなどから、ヒトにおける疾患解析は進んでいない。

近年、疾患特異的iPS細胞を用いることで、多くの疾患で発生段階における細胞機能異常を再現することが可能となった。本分担研究は、京都大学iPS細胞研究所・臨床応用研究部門を中心として、Hirschsprung病およびHirschsprung病類縁疾患の疾患特異的iPS細胞を用いた疾患解析を行い、腸管神経系細胞の発生異常であるHirschsprung病の疾患モデルを作成し、病態や遺伝型と表現型の相関などに関する新たな知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

- 1) Hirschsprung病家族例（父・娘、娘の方がより重症）と非罹患家族（母）よりインフォームドコンセントを得て採取した末梢血（平成24年度に採取）より、ゲノムDNAを抽出した。原因遺伝子の抽出を目的とし、エキソーム解析を行った。解析用ツールとして、参照配列へのマッピングにはBWA(Burrows-Wheeler Aligner)を、一塩基変異および欠失/挿入変異のコールにはGATK(The Genome Analysis Toolkit)を用いた。
- 2) ヒトiPS細胞を神経堤細胞へと分化誘導し、CD271およびCD49d陽性の神経堤細胞をFACSにより分離・濃縮した。このヒトiPS細胞由来神経堤細胞を用いてsphereを作成、培養することで神経細胞・グリア細胞へ分化することを確認した。
- 3) 神経堤細胞をレチノイン酸で刺激することでRETを発現誘導し、RETのリガンドであるGDNFを添加した培地で培養し遊走能を比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は、九州大学病院および京都大学の臨床研究・遺伝子解析に関する倫理委員会の承認を得て開始された。

また、すべての試料は書面にてインフォームドコンセントを得て収集された。

C. 研究結果

- 1) ゲノムDNAを抽出し、エキソーム解析を行った。過去に論文での報告のあるRET遺伝子のヘテロ接合ナンセンス変異(c.C538T;p.R180X)が罹患患者である父・娘に同定された。同定された変異を、ゲノムDNAをPCRで増幅後に直接シーケンス法にて再解析した(図1)。

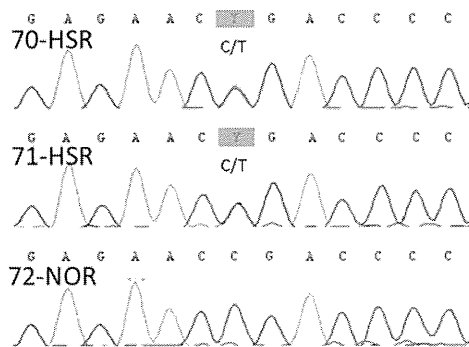


図1. 同定されたRET遺伝子の変異

- 2) iPS細胞をTGF-β阻害剤(SB431542)を含む無血清培地を用いて7日間分化誘導した。神経堤細胞を含む細胞集団をフローサイトメトリーを用いて解析し、神経堤細胞マーカーであるCD271陽性、CD49d陽性の細胞を認め、この細胞をFACSにより分離することができた。この神経堤細胞を、神経栄養因子(GDNF, BDNF, NGF)を添加した無血清培地で培養し、末梢神経およびグリア細胞を誘導した。免疫染色により末梢神経マーカーであるPeripherinおよびTuj1、グリア細胞マーカーであるGFAPの発現を確認した(図2)。

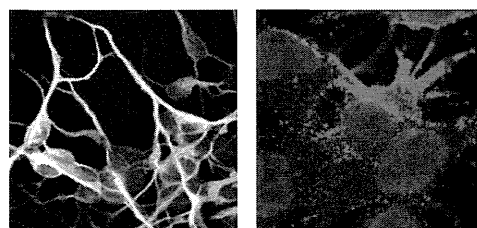


図2. 末梢神経細胞およびグリア細胞

左:末梢神経細胞 Tuj1:緑,Peripherin:赤,DAPI:青
右:グリア細胞 GFPA:赤,DAPI:青

- 3) 神経堤細胞をレチノイン酸(all-trans型)で48時間刺激し、RETの発現誘導を行った(図3)。このRET陽性神経堤細胞を用いて遊走能解析を行った。RETのリガンドであるGDNFを添加することにより、神経堤細胞の遊走が促進された(図4)。

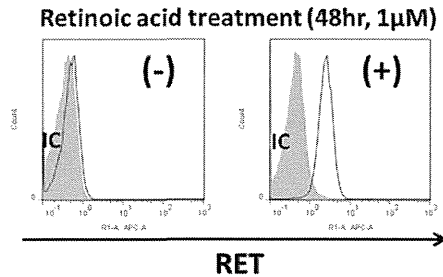
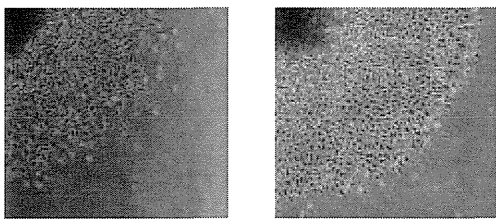
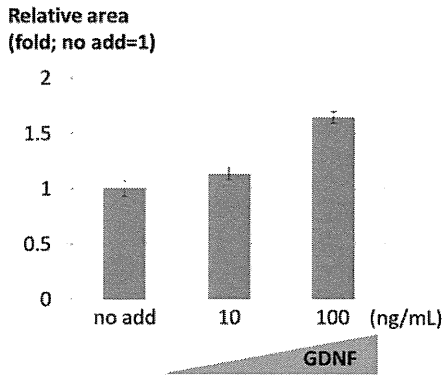


図3. 神経堤細胞のRET発現誘導



GDNF添加なし GDNF100ng/mL添加

図4. RET陽性神経堤細胞の遊走能解析

D. 考察

平成24年度に引き続き、疾患特異的iPS細胞を用いたHirschsprung病の解析を行った。本年は以下の成果が得られた。

- ①樹立したHirschsprung病家族例のエキソーム解析を行い、疾患に関与すると思われるRET遺伝子のヘテロ接合ナンセンス変異を同定した。
- ②ヒトiPS細胞由来神経堤細胞が神経細胞・グリア細胞に分化することを確認した。
- ③ヒトiPS細胞由来神経堤細胞では、レチノイン酸刺激によりRETが発現誘導された。またRET陽性神経堤細胞はそのリガンドであるGDNFの存在により遊走が促進された。

今後、解析系をより洗練することで、Hirschsprung病モデルを確立することが期待できる。

E. 結論

疾患特異的iPS細胞を用いることにより、これまで困難であったヒト神経堤細胞の機能異常を解析することが可能となった。神経堤細胞に由来する腸管神経系の発生、および腸管神経系の発生異常に起因するHirschsprung病やHirschsprung病類縁疾患といった疾患の病態については不明な点が多い。本研究はこれらの疾患原因を解明する糸口になると考えた。

F. 研究発表

論文発表

1. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell- free conditions. PLoS ONE. 4/3/2013; 8(4): e59243.
2. Kondo T., Asai M., Tsukita K., Kutoku Y., Ohsawa Y., Sunada Y., Imamura K., Egawa N., Yahata N., Okita K., Takahashi K., Asaka I., Aoi T., Watanabe A., Watanabe K., Kadoya C., Nakano R., Watanabe D., Maruyama K., Hori O., Hibino S., Choshi T., Nakahata T. Hioki H., Kaneko T., Naitoh M., Yoshikawa K., Yamawaki S., Suzuki S., Hata R., Ueno S., Seki T., Kobayashi K., Toda T., Murakami K., Irie K., Klein W.K., Mori H., Asada T., Takahashi R., Iwata N., Yamanaka S., Inoue H.: Modeling Alzheimer's disease using iPSCs

reveals stress phenotypes associated with intracellular $A\beta$ and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12(4):487-496. 2013.

3. Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*. 2013 Aug.23.98: doi 10.3324/haematol. 2013.083873
4. Egawa N., Kitaoka S., Tsukita K., Naitoh M., Takahashi K., Yamamoto T., Adachi F., Kondo T., Okita K., Asaka I., Aoi T., Watanabe A., Yamada Y., Morizane A., Takahashi J., Ayaki T., Ito H., Yoshikawa K., Yamawaki S., Suzuki S., Watanabe D., Hioki H., Kaneko T., Makioka K., Okamoto K., Takuma H., Tamaoka A., Hasegawa K., Nonaka T., Hasegawa M., Kawata A., Yoshida M., Nakahata T., Takahashi R., Marchetto M.C., Gage F.H., Yamanaka S., Inoue H.: Response to Comment on "Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells". *Science Transl. Med.* 06/2013; 5(188):188lr2. DOI:10.1126/scitranslmed. 3005697
5. 斎藤潤, 中畑龍俊 : 疾患特異的iPS細胞. *再生医療*12(1):19-29,2013.
6. 中畑龍俊 : 総論疾患iPS細胞の樹立と臨床病態解析への応用. *Medical Science Digest (MSD)* 39 (11) : 4(504)-6(506) 2013.

学会発表

1. 中畑龍俊 : 特別講演、iPS細胞研究が切り開く未来の医療. 日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」 2013年8月3日 京都大学薬学部記念講堂
2. 中畑龍俊 : 特別講演、iPS細胞の小児医療への応用. 第38回東日本小児科学会 2013年11月23日 大宮ソニックシティ (さいたま市)
3. 中畑龍俊 : 教育講演、iPS細胞の臨床応用. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013年11月29日-12月1日 (30日) ヒルトン福岡シーホーク
4. Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.
5. Yoshida M., Kitaoka S., Yamane M., Tsukita K., Inoue H., Saito M., Nakahata T.: Spinal moter neurons generated from induced pluripotent stem cells derived from spinal muscular atrophy patients failed to cluster acetylcholine receptors at the neuromuscular junctions. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.

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

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

胆道閉鎖症・非胆道閉鎖症新生児・乳児胆汁うっ滞症候群に 関する検討

研究分担者 (順不同)	仁尾 正記	東北大学・医学系研究科 教授
	松井 陽	国立成育医療研究センター 病院長
	窪田 正幸	新潟大学・医歯学総合研究科 教授
	北川 博昭	聖マリアンナ医科大学・医学研究科 教授
	菫澤 融司	杏林大学・医学研究科 教授
	安藤 久實	名古屋大学・医学系研究科 教授
	橋本 俊	名古屋市立大学大学院医学研究科分子神経生物学 研究員(医療法人 純正会 名古屋西病院 院長)
	鈴木 達也	藤田保健衛生大学医学研究科 教授
	工藤 豊一郎	国立成育医療研究センター肝臓内科 医長
	岡田 忠雄	北海道大学消化器外科 講師

【研究要旨】

消化器系の希少・難治性疾患群として特に上記分担研究者のグループにより胆道閉鎖症ならびに非胆道閉鎖症新生児・乳児胆汁うっ滞症候群に関する研究を行った。具体的には胆道閉鎖症と非胆道閉鎖症新生児・乳児胆汁うっ滞とに分けて現状の把握と必要な調査研究を行った上、最終的に両者を統合するかたちでシームレスな診断ガイドライン作成にむけての研究を行うこととした。

具体的には胆道閉鎖症については、仁尾、安藤、北川、窪田、鈴木、橋本、岡田の各分担研究者により現在の分類試案の見直しと日本胆道閉鎖症研究会による全国登録データの解析ならびに診断基準ならびに重症度分類の策定を行った。

非胆道閉鎖症新生児・乳児胆汁うっ滞症候群については、松井、菫澤、工藤、仁尾の各分担研究者によりこのカテゴリーの疾患状況がどのようなものなのかを把握するための全国調査を企画した。

研究協力者

虻川 大樹 (宮城県立こども病院 部長)

野坂 俊介

林田 真 (九州大学病院 助教)

(独立行政法人国立成育医療研究センター 部長)

佐々木 英之 (東北大学大学病院 講師)

伊藤 玲子

坂本 修 (東北大学 准教授)

(独立行政法人国立成育医療研究センター)

脇坂 宗親

(聖マリアンナ医科大学 准教授)

A. 研究目的

消化器系の希少・難治性疾患群として、今回の分担研究者のグループでは胆道閉鎖症ならびに非胆道閉鎖症新生児・乳児胆汁うっ滞症候群に関連した検討を行い、最終的にこれらの疾患に対応したシームレスな診断ガイドライン作成を目指すこととした。

B. 研究方法

この分野の研究を行うにあたり、まずは胆道閉鎖症と非胆道閉鎖症新生児・乳児胆汁うっ滞とに分けて現状の把握と必要な調査研究を行った上、最終的に両者を統合するかたちでシームレスな診断ガイドライン作成にむけての研究を行うこととした。

1. 胆道閉鎖症に関して

分担研究者の仁尾が事務局代表を務めている日本胆道閉鎖症研究会では1989年より胆道閉鎖症の全国登録事業を行っている。胆道閉鎖症については、この登録事業をベースに研究を進めていくこととした。

具体的な研究方法としては

- 1) 現在の登録内容の詳細な検討
- 2) 胆道閉鎖症の病態解析
 - ①現在の病型分類の見直し
 - ②肝内胆管の形態と予後の関連調査
- 3) 登録事業の悉皆性向上に向けた取り組みを行うこととした。

このカテゴリーの研究は特に仁尾、安藤、北川、窪田、鈴木、橋本、岡田の各分担研究者と研究協力者の佐々木が担当することとした。

2. 非胆道閉鎖症胆汁うっ滞症候群について

このカテゴリーには様々な疾患が含まれている。その中でAlagille症候群やTORCH症候群な

どの限られた疾患の現状調査が行われているのみで、包括的かつ網羅的な現状調査が行われていない。よって本研究ではこの実態調査を行う予定とした。

このカテゴリーの研究は松井、仁尾、工藤、蕨沢の各分担研究者と虻川の研究協力者により行われることとなった。

これらの実態調査は取りまとめ機関としての東北大学で倫理委員会の承認を得ることで倫理的配慮を行った。

C. 研究結果

1. 胆道閉鎖症に関して

1) 登録内容の検討 (図1)

これまでの登録情報より今回各因子別にKaplan-Meier法による生存率曲線を作成した。これまでも言われていたことであるが、病型や手術時日令は予後に有意に関連していることが示された。特に病型では1cyst型が最も良好な病型であった。

2) 胆道閉鎖症の病態解析

上述のように治療成績と胆道閉鎖症の病型に関連があることがしめされた。しかし最も良好である1cyst型は以前より先天性胆道拡張症との異同について学会で論じられていたところである。本研究ではこれについての検討を行うために、葛西手術時の術中胆道造影所見と臨床経過との検討・長期生存例の肝内胆管像と臨床経過との検討という二つを行うことで現在の病型分類の見直しに必要な基礎資料を収集することとなった。全国登録のデータから葛西手術時に肝内胆管の造影像が得られている可能性のある症例を全国登録のデータから2006年より2011年までの症例57例をピックアップした。(図2)

3) 登録の悉皆性向上に向けて

現在の登録事業は登録用紙による紙ベースの登録である。この登録に関する業務軽減ならび

に、データ精度の向上をはかり、より有用なデータを登録参加者へ還元することが悉皆性向上に向けて必要と考えられた。それに向けて、登録をオンライン化することを計画した。具体的にはUMINのオンライン登録システムを利用して行うことについて、UMINとの話し合いを行った。

4) 胆道閉鎖症の診断基準ならびに重症度分類の作成について

①診断基準

診断基準については、主に松井、工藤らにより、これまでの文献をレビューして、診断の手引きを作成した。(資料1)

②重症度分類の作成

胆道閉鎖症の重症度分類については、その重症度を規定するものが多岐に渡ることが班内で開催されたエキスパートミーティングで明らかにされた。具体的には

- i. 胆汁うっ滞の有無
- ii. 胆道感染の程度
- iii. 門脈圧亢進症の程度
- iv. 身体活動制限
- v. 関連する病態の程度
- vi. 肝機能障害の程度

によって規定されることが確認された。それぞれの病態の重症度を過去の論文のレビューないしは既存のガイドラインを参照して規定して、それらを総合的に判定する形で重症度判定を行うこと方式を採用した。(資料2)

2. 非胆道閉鎖症胆汁うっ滞症候群について

非胆道閉鎖症胆汁うっ滞症候群についての包括的・網羅的実態調査を行うための準備を本年度は行った。

まず調査する具体的疾患として

- ①新生児肝炎
- ②シトリン欠損症

③Alagille症候群

④非症候性肝内胆管減少症

⑤進行性家族性肝内胆汁うっ滞症

⑥胆汁酸代謝異常症

⑦ウイルス性肝炎

⑧腸管不全・静脈栄養関連肝障害の調査を行うこととした。

また調査対象として

①日本小児外科学会の関連施設

②日本周産期・新生児医学会の関連施設

③日本小児栄養消化器肝臓学会の関連施設に対して行うこととした。

それに向けてアンケートのフォームを策定し、グループ内での検討を重ねた。また各学会に対してアンケート調査を行う許可申請を行い、3学会からの承諾を得ることができた。

D. 考察

今回は胆道閉鎖症ならびに非胆道閉鎖症新生児乳児胆汁うっ滞症候群の包括的調査研究ならびにシームレスな診断治療ガイドライン作成の1年目の研究を行った。上記のように、既存のデータ解析ならびに新規のデータ収集に向けての準備を中心に行った。

既存のデータ解析では、従来言われていた胆道閉鎖症の治療成績に病型と手術時日令が影響を与えているということが統計学的に証明された。これにより現在の病型分類にある程度の妥当性があることが考えられる。しかし一方で以前から学会で議論がなされてきた嚢胞を形成している胆道閉鎖症と先天性胆道拡張症との異同については未だ結論が出ておらず、このことが病型と予後との関係に影響を与えることが懸念される。これを解消する目的で本研究では病型分類の見直しを行うことを計画した。これに必要な調査研究として、葛西手術時の肝内胆管像の検討と長期生存例の肝内胆管像の検討を行う

準備を進めることができた。

胆道閉鎖症研究会による全国登録事業の悉皆性回復にむけてのオンライン化移行についても、これまでの全国登録との整合性を保ちつつ、より有効かつ簡便な登録へと移行できるように、検討を重ねているところである。

非胆道閉鎖症新生児乳児胆汁うっ滞症候群については、これまでこのカテゴリーの包括的かつ網羅的な調査研究が行われていなかったことが改めて確認された。このカテゴリーは胆道閉鎖症との鑑別診断も含めて重要なカテゴリーであると同時に、昨今の周産期医療の進歩に伴う体出生体重児増加による腸管不全・静脈栄養関連肝障害がクローズアップされている状況でもあり、実態把握は重要である。さらに、昨今静脈栄養関連肝障害の治療効果が注目されている ω 3系脂肪酸製剤の国内使用承認にむけての基礎的データとなる可能性が確認された。関連施設に向けての調査研究を次年度に速やかに行えるようにアンケート調査内容の検討ならびに関連学会からの承認を得て、順次調査を進行中であるが、集計を終えるには至らなかった。

本年度は主に、当該疾患領域において最も患者数が多い胆道閉鎖症に絞って、その診断基準ならびに重症度分類の作成の作業を行った。この作業を通じて、まずは最も基本的な診断基準ならびに重症度分類が作成された。また今回の作業の中から、本格的な系統的レビューによる胆道閉鎖症の診断治療ガイドラインを作成するための作業を行う中核作業チームが結成され、現在本格的な作成作業の準備段階である。

既存の胆道閉鎖症全国登録制度の悉皆性を向上させるためのオンライン化へ向けた作業に着手することができた。またこの作業過程において、既存の登録制度の情報制度向上の作業を推進することができた。

またこれまで明確に規定されていなかった胆

道閉鎖症の診断の手引きと重症度分類について文書化し、学会の評価手続きを進めるに至ったことは、今後の胆道閉鎖症の病態評価の均一化を図ることにつながり、より高精度の情報収集が可能となることが期待される。

E. 結論

小児領域において最も肝移植を要する症例の多い胆道閉鎖症について全国的な調査のより高精度化を図り、主要症状の頻度や治療の現状が解析された。これらのデータともに、文献検索やエキスパートパネルによるミーティングなどを経て診断の手引き、重症度分類案が策定され、さらにより系統的レビューによる診断治療ガイドライン作成への端緒を開くことができた。

非胆道閉鎖症新生児乳児胆汁うっ滞症候群については、その疾患領域の複雑さと希少さが改めて浮き彫りとなり、今後さらに詳細な検討が必要であることが再認識された。

引用文献・出典

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表	27件
原著論文による発表	1件
それ以外（レビュー等）の発表	7件
そのうち主なもの	

論文発表

仁尾 正記 佐々木 英之, 田中 拓, 岡村 敦, 小児から成人に至る外科 こどもからおとなへ胆道閉鎖症術後の成人期の問題 日本外科学会雑誌(0301-4894)114巻4号 Page201-205 2013

学会発表

岡田忠雄、本多昌平、宮城久之、武富紹信、

胆道閉鎖症における移植治療を含めた包括的治療戦略の構築：葛西術を担当する小児外科医の観点から 第113回日本外科学会定期学術集会 (博多) 2013.4.13

2) 海外

口頭発表	11件
原著論文による発表	17件
そのうち主なもの	

論文発表

Nio M, Sasaki H, Takana H, Okamura A. Redo surgery for biliary atresia. *PediatrSurg Int.* 29(10): 989-93, 2013

Hussein M.H, Hashimoto T, Suzuki T, Daoud G.A-H, Goto T, Children undergoing liver transplantation for treatment of inherited metabolic diseases are prone to higher oxidative stress, complement activity and transforming growth factor- β 1, *Annals of Transplantation*,18,63-68, 2103

学会発表

Okada T, Honda S, Miyagi H, Minato M, Cho K, Taketomi A, Outcomes are Different between Prenatal and Postnatal Diagnosed Cystic Biliary Atresia Infants 2013 Joint Meeting of 13th APPSPGHAN and 40th JSPGHAN 2013.11.1.

Sasaki H, Tanaka H, Wada M, Sato T, Nishi K, Nakamura M, Okamura A, Sekiguchi S, Kawagishi N, Nio M, Analysis of 59 biliary atresia patients who required liver transplantation following with Kasai operation in a single institution 45th Annual Meeting of The Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2013, April

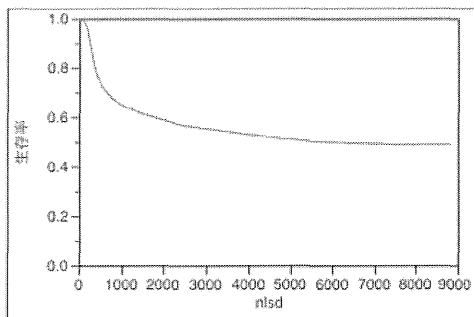
[図書] (計5件)

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

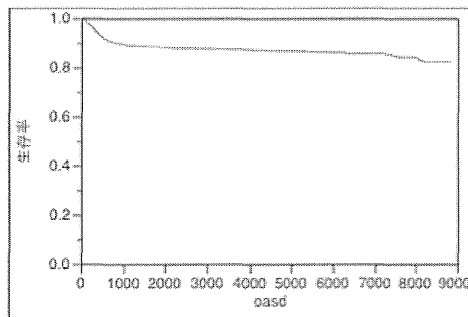
図1 胆道閉鎖症全国登録におけるKaplan-Meier法による生存率曲線

自己肝生存率曲線



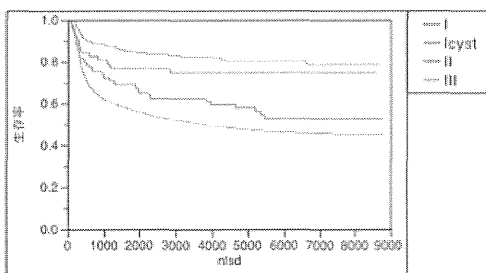
1年自己肝生存率: 80.2%
 3年自己肝生存率: 64.1%
 5年自己肝生存率: 59.6%
 10年自己肝生存率: 53.7%
 15年自己肝生存率: 50.0%
 20年自己肝生存率: 48.9%

全生存率曲線



1年全生存率: 94.2%
 3年全生存率: 89.0%
 5年全生存率: 88.2%
 10年全生存率: 87.2%
 15年全生存率: 86.2%
 20年全生存率: 85.1%

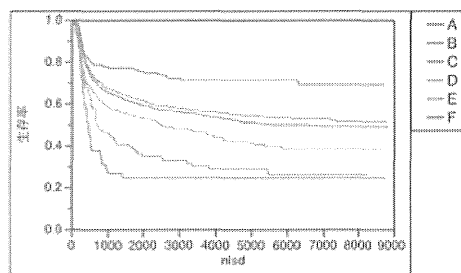
自己肝生存率曲線(病型別)



20年自己肝生存率
 I: 52.5%
 I-cyst: 78.4%
 II: 74.7%
 III: 45.3%

log-rank test p=0.0023

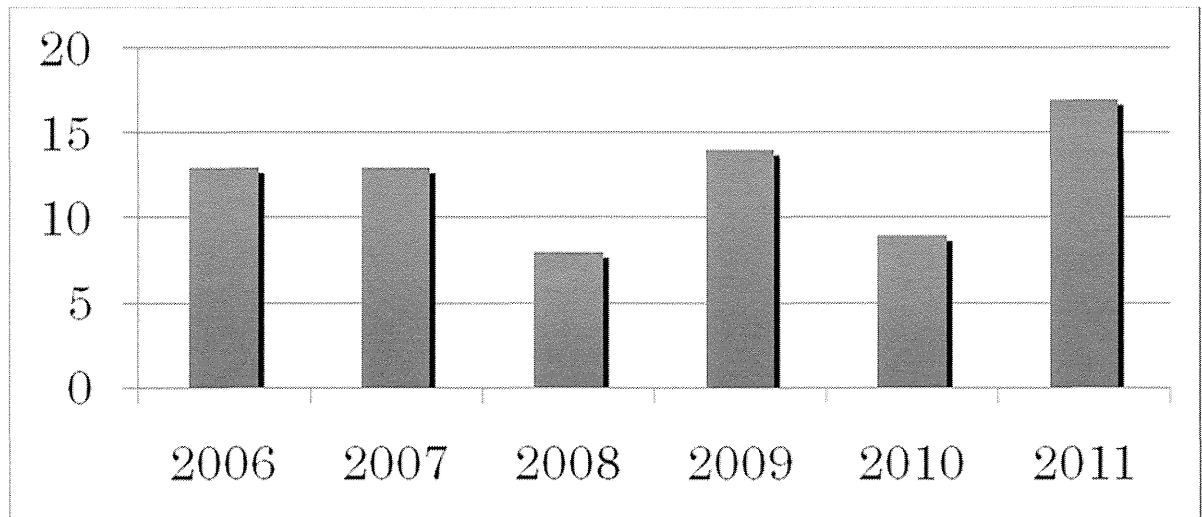
自己肝生存率曲線(初回手術日令別)



20年自己肝生存率
 A (- 30): 69.0%
 B (31-60): 52.1%
 C (61-90): 49.0%
 D (91-120): 38.6%
 E (121-150): 26.1%
 F (151-): 24.4%

log-rank test p<0.0001

図2 胆道閉鎖症全国登録における最近の1型・2型症例



胆道閉鎖症の診断の手引き（試案）

筑波大学医学医療系

工藤 豊一郎

同 消化器科

伊藤 玲子

国立成育医療研究センター 放射線診療部長

野坂 俊介

胆道閉鎖症の疑いを持つ手がかり

疾患を疑う手がかりとして症状や頻度の広報に努める。ことに母子手帳に採用された便色カラーカードを用いることを市町村を通じて子を持つ親・助産師・産科医・小児に関わる看護師・小児科医・一般内科医・総合診療医などにひろく広報する。

便色カラーカードの他、濃い尿色・眼球結膜の黄疸など主要症状もあわせて注意を要すると広報する。

一般医療機関での胆道閉鎖症スクリーニング検査

直接ビリルビンを測定し、1.5(mg/dl)以上ではただちに小児外科のある施設へ即日紹介する。総ビリルビン単独の測定は鑑別において意味をなさないことを広報する必要がある。

小児外科のある医療機関での検査スケジュール

ビタミンK欠乏による頭蓋内出血を回避しながら鑑別診断をすすめる。

すでに頭蓋内出血がある場合はビタミンKを投与しつつ安定化をはかる。

乳児の胆汁うっ滞性疾患でもっとも頻度が高く、かつ予後不良であるのは胆道閉鎖症であるため、開腹胆道造影とKasai手術を入院から1週間以内に実施できるように検査計画をたてる。

＜理学所見＞肝の腫大・肝辺縁の性情のほか、心雑音・血管雑音・紫斑や点状出血・脾腫・腹部膨満などに留意する。

＜血液＞生化学（ γ -GT・総コレステロールを含む）・凝固系・PIVKA-II・リポ蛋白Xなど。

＜十二指腸液採取＞採取液中の総ビリルビン・直接ビリルビン・総胆汁酸・リパーゼを測定。経時的に検体採取し、短時間少量の胆汁が分泌されていないか硫酸マグネシウム負荷・ミルク負荷などで確認する。

＜胸腹部X-P＞椎骨奇形に注意する。

＜腹部超音波＞後述する。脾臓の有無・十二指腸前門脈の有無などにも注意する。

＜胆道シンチグラフィ＞後述する。

これらの所見によって他疾患を鑑別する。主な鑑別点を表1にまとめた。

検査データがすべて揃うのを待つことなく、腸管への胆汁分泌の証拠がないと考えられる場合は、開腹胆道造影とKasai手術を選択する。

腸管への胆汁分泌が少量でも起きている明確な所見があれば、脂溶性ビタミンの補充に留意しつつ鑑別診断を継続する。これには十二指腸液検査、胆道シンチグラフィが重要である。アラジール症候群でKasai手術を行うと肝予後が悪化する事が知られているが、胆汁が出ていることを客観的に証明できなければ直接胆道造影と肉眼所見とで確認する

胆道閉鎖症を疑った場合の画像診断

より迅速に診断するため、簡便性ならびに低侵襲性から超音波検査を第一選択とし、続いて動態評価が可能な核医学検査を考慮する。それぞれの検査所見につき解説する。

超音波検査

新生児期ならびに乳児期の黄疸で胆嚢が不明

瞭か小さい、総胆管が不明瞭、といった場合は肝門部高エコー(triangular cord (TC) sign)の有無、肝動脈拡張の有無や脾腫の有無を観察し、迅速に胆道閉鎖症の診断あるいは除外することが必要である。表2に胆道閉鎖症の診断に役立つ超音波所見をまとめた¹⁾。Takamizawaら³⁾は、胆道閉鎖症はTC signと胆嚢長径と胆嚢収縮能を組み合わせることで正確に診断あるいは除外でき、十二指腸液検査や核医学検査は必要ないと報告している。TC sign陰性でも胆道閉鎖症を除外できないことに留意する。まれではあるが、胆道閉鎖症のI cyst型が先天性胆道拡張症に極めて類似する場合があります、画像診断の際に注意が必要である⁵⁾。

核医学検査

肝胆道シンチグラフィは胆道閉鎖症と新生児肝炎の鑑別に有用と言われている⁶⁾。肝胆道シンチグラフィに用いる薬剤は、欧米では^{99m}Tc標識のiminodiacetic acidの化合物が一般的であるが^{6, 7)}、我国では^{99m}Tc標識のpyridoxylaminesのうち^{99m}Tc-PMT (^{99m}Tc-N-pyridoxyl-5-methyl tryptophan)が用いられている。これらの核種は通常、フェノバルビタールの経口投与による前処置の後に投与される^{6, 7)}。5日間の前投薬が望ましい点が難点である。正常では、投与された核種は肝細胞に取り込まれ、投与から15分で消化管に排泄される⁷⁾。

胆道閉鎖症では、肝細胞への集積は正常であるにもかかわらず、消化管への排泄は全くなく、24時間後にも認めない⁷⁾。一方、新生児肝炎の典型例では、核種の肝細胞への集積遅延、肝臓からの排泄遅延、時間経過に応じた消化管への排泄、などが所見として認められる⁷⁾。

しかし総ビリルビン高値などの胆汁うっ滞状態では疾患によらず胆汁排泄は減少し核種排泄は遅延するため、適応は限られる。

表2 胆道閉鎖症の診断に役立つ超音波所見
(文献1を参考に一部改)

所見・sign	診断基準
triangular cord *1	門脈右枝近位で前区域枝と後区域枝の分岐部直前で門脈前方の三角形あるいは帯状高エコー 縦断像あるいは横断像で評価 厚さ>4mm
胆嚢の異常*2	
胆嚢の大きさ	3時間以上の禁乳での計測で長軸径15mm未満、あるいは胆嚢が描出されない
胆嚢収縮	授乳後有意な胆嚢収縮を認めない
肝動脈拡張*3	右肝動脈径>1.5mm 右肝動脈径/門脈右枝径>0.45
総胆管の不描出	門脈本幹前方に総胆管を認めない 高周波探触子を用い、カラードブラで肝動脈と区別

*1：文献2)を参考に一部改。8MHz以上の周波数のリニア型探触子で評価。

*2：文献3)を参考に一部改。

胆嚢収縮率(%)=禁乳時胆嚢容積-授乳後胆嚢容積/禁乳時胆嚢容積x100

胆嚢容積=0.52×短軸径×短軸径×長軸径

胆嚢収縮率は、生後12週未満では86%±18%(平均±SD)未満を有意と判断

*3：文献4)を参考にした。5-10MHzの探触子を用いて、右肝動脈近位部で門脈右枝と平行して走行する部分を計測。右肝動脈径は、前壁の中央から後壁の中央の間を計測。

門脈右枝は、右枝前区域枝と後区域枝の分岐点の近位で計測。

肝動脈拡張と総胆管不描出の組み合わせでさらに診断能が向上。

文献

- 1) 野坂俊介, 正木英一: 胆汁うっ滞の画像診断. 小児内科 43: 1000-1007, 2011
- 2) Lee HJ, Lee SM, Park WH, et al: Objective criteria of triangular cord sign in biliary atresia on US scans. Radiology 229: 395-400, 2003
- 3) Takamizawa S, Zaima A, Muraji T, et al: Can biliary atresia be diagnosed by ultrasonography alone? J PediatrSurg 42: 2093-2096, 2007
- 4) Kim WS, Cheon J-E, Youn BJ, et al: Hepatic arterial diameter measured with US: Adjunct for US diagnosis of biliary atresia. Radiology 245: 549-555, 2007
- 5) Caponcelli E, Knisely AS, Davenport M: Cystic biliary atresia: an etiologic and prognostic subgroup. J PediatrSurg 43: 1619-1624, 2008
- 6) Lowe LH, Schlesinger AE: Introduction to the hepatobiliary system. In Slovis TL (editor-in-chief): Caffey's pediatric diagnostic imaging. 11th ed, Mosby, Philadelphia, pp1856-1860, 2008
- 7) Donnelly LF: Gastrointestinal. In Donnelly LF (ed): Pediatric imaging: the fundamentals. 1st ed, Saunders, Philadelphia, pp86-124, 2009

重症度分類

- 軽快者：胆道閉鎖症に起因する症状・所見がなく、治療を必要としない状態
- 重症度 1：胆道閉鎖症に起因する症状・所見があり治療を要するが、これによる身体活動の制限や介護を必要としない状態
- 重症度 2：胆道閉鎖症に起因する症状・所見のため、治療を要し、これによる身体活動の制限や介護を要する状態であるが、病状が可逆的またはその進行が緩やかで肝移植を急ぐ必要がない状態
- 重症度 3：胆道閉鎖症に起因する症状・

所見、もしくは著しくQOL低下を来す続発症により生命に危険が及んでいる状態、または早期に肝移植が必要な状態

以下の重症度判定項目により重症度を判定する

- 重症度判定項目
 1. 胆汁うっ滞の状態
 - 1+. 持続的な顕性黄疸を認めるもの
 2. 胆道感染
 - ① 胆道感染の定義（急性胆管炎・胆嚢炎診療ガイドライン2013に準ずる）

急性胆管炎診断基準

A. 全身の炎症所見				
A-1. 発熱(悪寒戦慄を伴うこともある)				
A-2. 血液検査: 炎症反応所見				
B. 胆汁うっ滞所見				
B-1. 黄疸の出現または増悪				
B-2. 血液検査: 肝機能検査異常				
確診	A、Bすべての所見を認めるもの			
疑診	A、Bのいずれかを認めるもの			
注	A-2: 白血球数の異常、血清CRP値の上昇、他の炎症を示唆する所見 B-2: 血清ALP, γ -GTP (GGT), ASTとALTの上昇 ALP: alkaline phosphatase, γ -GTP (GGT): γ -glutamyltransferase AST: asparate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase			
域値	A-1:	発熱	BT>38°C	
	A-2:	炎症所見	WBC ($\times 1,000/\mu l$)	
			CRP (mg/dl)	
	B-1:	黄疸	T-Bil ≥ 2 (mg/dl)	
	B-2:	肝機能検査異常	ALP (IU)	>1.5 \times STD
			γ -GTP (IU)	>1.5 \times STD
			AST (IU)	>1.5 \times STD
ALT (IU)			>1.5 \times STD	

*STD (standard): 各症例の平時のデータ

② 胆道感染の重症度

- 1+. 過去1年以内に胆管炎を一回以上発症し、その入院加療期間が一か月未満のもの
- 2+. 過去1年以内に胆管炎による入院加療期間が一か月以上半年未満のもの
- 3+. 過去1年以内に胆管炎による入院加療期間が半年以上のもの、あるいは重症敗血症を合併した場合

3. 門脈圧亢進症（門脈血行異常の診断と治療のガイドライン2007に準ずる）

① 食道・胃・異所性静脈瘤

- 1+. 静脈瘤を認めるが易出血性ではない
- 2+. 易出血性静脈瘤を認めるが、出血の既往がないもの。易出血性静脈瘤・胃静脈瘤とは「門脈圧亢進症取り扱い規約」に基づき、CbかつF2以上のもの、または発赤所見を認めるもの。異所性静脈瘤の場合もこれに準ずる。出血性静脈瘤を認めるが、治療によりコントロールが可能なもの。異所性静脈瘤の場合もこれに準ずる。
- 3+. コントロールできない静脈瘤出血を認める。

② 肝肺症候群

- 1+. PaO₂が室内気で80mmHg未満、70mmHg

4. 関連する病態：胆道閉鎖症を原因とする場合

① 皮膚掻痒（白取の痒み重症度基準値のスコア）

程度	日中の症状	夜間の症状
0 なし	ほとんど、あるいは全く痒みを感じない	ほとんど、あるいは全く痒みを感じない
1 軽微	時にムズムズするが、特に掻かなくても我慢できる	就寝時わずかに痒いが、特に意識して掻くほどでもない。よく眠れる。
2 軽度	時には手がいき、軽く掻く程度。一度おさまり、あまり気にならない。	多少、痒みはあるが、掻けばおさまる。痒みのために目が覚めることはない。
3 中等度	痒くなり、人前でも掻く。痒みのためにイライラし、たえず掻いている。	痒くて目が覚める。ひと描きすると一応は眠れるが、無意識のうちに眠りながら掻く
4 高度	いてもたってもいられない痒み。掻いてもおさまらずますます痒くなり仕事も勉強も手につかない。	痒くてほとんど眠れない。しょっちゅう掻いているが、掻くとますます痒みが強くなる。

以上（参考所見：経皮酸素飽和度では93-95%）

- 2+. PaO₂が室内気で70mmHg未満、50mmHg以上（参考所見：経皮酸素飽和度では85-92%）

- 3+. PaO₂が室内気で50mmHg未満（参考所見：経皮酸素飽和度では84%以下）

③ 門脈肺高血圧症（肺高血圧症治療ガイドライン2012年改訂版に準ずる）

- 診断基準（the European Respiratory Society Pulmonary Hepatic Vascular Disorder Task Force 2004 Consensus Report）

- a. 慢性肝疾患の有無に関わらず門脈圧亢進症を認める
- b. 安静時平均肺動脈圧(mPAP)>25mmHg
- c. 平均肺動脈楔入圧(cPCWP) <15mmHg
- d. 肺血管抵抗（PVR）>240dyne/sec/cm²

- 2+. mPAPが25 mmHg以上、35 mmHg未満

- 3+. mPAPが35 mmHg以上

④ 症状

- 1+. 出血傾向、脾腫、貧血のうち一つもしくは複数認めるが、治療を要しない
- 2+. 出血傾向、脾腫、貧血のうち治療を必要とするものを一つもしくは複数認める

- 1+. 上記の 1 程度の痒み
- 2+. 上記の2または3程度の痒み
- 3+. 上記の 4 程度の痒み
- ② 成長障害
 - 1+. 身長SDスコアが-1.5SD以下
 - 2+. 身長SDスコアが-2SD以下
 - 3+. 身長SDスコアが-2.5SD以下
- 5. 肝機能障害の評価：採血データおよび Child-Pugh score
 - 1+. 下記表の高度異常が2系列以上認められるもの
 - 2+. 7～9点
 - 3+. 10点以上

			高度異常
A系列	1	アルブミン	2.8g/dl未満
B系列	2	血清総ビリルビン	5.0mg/dl以上
C系列	3	AST	200単位以上
	4	ALT	200単位以上
D系列	5	GGTP	200単位以上

(難治性疾患克服研究事業における肝疾患の重症患者認定からの改変)

Child-Pughスコア

スコア	1点	2点	3点
脳症	なし	I-II°	III-IV°
腹水	なし	軽度	中等度
Bil (mg/dl)	<2	2-3	3<
Alb (g/dl)	3.5<	2.8-3.5	<2.8
PT (%)	70%<	40-70%	<40%

6. 身体活動制限: performance status

grade	performance status
0	無症状で社会活動ができ、制限をうけることなく、健常人と同等にふるまえる。
1	軽度の症状があり、肉体的労働は制限を受けるが、歩行、軽労働や座業はできる、例えば軽い家事、事務など。
2	歩行や身の回りのことはできるが、時に少し介助がいることもある。軽労働はできないが、日中の50%以上は起居している。
3	身の回りにある程度のことではできるが、しばしば介助がいり、日中の50%以上は就床している。
4	身の回りのこともできず、常に介助がいり、終日就床を必要としている。

- 1+. PS 1
- 2+. PS 2 or 3
- 3+. PS 4

● 重症度判定

因子/重症度	軽快者	重症度 1	重症度 2	重症度 3
胆汁うっ滞	-	1+		
胆道感染	-	1+	2+	3+
門脈圧亢進症	-	1+	2+	3+
身体活動制限	-	1+	2+	3+
関連病態	-	1+	2+	3+
肝機能障害	-	1+	2+	3+

- 重症度判定項目の中で最も症状の重い項目を該当重症度とする。
- 胆汁うっ滞については、あれば重症度 1 以上。重症度 2 以上かどうかは他の5項目の状態によって決定され、必ずしも胆汁うっ滞の存在は必要とはしない。

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

難治性肝血管腫に関する調査研究

研究分担者（順不同） 黒田 達夫 慶應義塾大学小児外科 教授
田村 正徳 埼玉医科大学総合医療センター小児科
総合周産期母子医療センター 教授
田尻 達郎 京都府立医科大学小児外科 教授
前田 貢作 自治医科大学小児外科 教授
土岐 彰 昭和大学小児外科 教授
月森 清巳 福岡市立こども病院産科 部長

【研究要旨】

〔研究目的〕本研究は、新生児、乳幼児の肝血管腫の臨床像をさらに詳細かつ広範囲で検討し、治療実態の把握とともに様々な先端的治療手技の応用可能性を検証することを目的とした。これに基づいて本症の疾患概念ともいふべき診断手順と、リスク評価に直結する重症度分類案の策定をも目指した。今年度は全国的なさらなる症例の洗い出しと、前回調査症例も含めた詳細な解析を目指した。昨年度から準備してきた調査計画を、小児外科領域、周産期・新生児領域に拡大して実行し、より多くの症例を同定することを目標とした。

〔研究方法〕日本小児外科学会認定施設ならびに全国の周産期施設を対象に可及的に悉皆的な症例数の調査を行った。同時に分担研究者、研究協力者の施設において、難治性乳児肝血管腫のほか、関連疾患として年長児も含めた難治性血管腫症、新生児巨大腫瘍などの症例を対象とした観察研究を継続した。

〔研究結果〕日本小児外科学会認定施設148施設中56施設で過去10年において、本症と考えられる26症例が同定された。周産期医療施設に対する調査ならびに小児外科施設に対するより詳細な第四次調査も着手されている。26例における代表的な症状は心不全26.9%、凝固異常23.1%、呼吸不全15.4%、腫瘍出血・貧血11.5%で、内科治療としてはステロイド療法が61.5%で、インターフェロン療法が30.8%で、プロプラノロール療法が15.4%で、抗がん剤治療が3.8%で行われていた。塞栓療法は23.1%で、放射線照射は5.4%で、外科手術が26.9%で行われ、肝移植も2例で行われていた。観察研究から、腫瘍内出血による急激な全身状態増悪の危険性が確認され、頸動脈アプローチによる新生児塞栓療法のfeasibilityや、本症に対する新規治療薬としてプロプラノロールの効果が示唆された。

〔結論〕今年度の調査結果や、付带的に行われた観察研究に基づいて、診断の手引き、重症度分類案が策定された。血管腫のISSVA分類も勘案しつつ、治療抵抗性の症例には内科的、外科的な新規治療の導入を、早い時期に考慮すべきものと思われる。病理学的検討や腫瘍内シャント、血管形成異常は今後の重要な検討課題と思われた。

研究協力者

星野 健 (慶應義塾大学 専任講師)

加藤 稲子

(埼玉医科大学総合医療センター 教授)

Mohamed Hamed Hussein Saleh

(埼玉医科大学総合医療センター新生児科
特任講師)

宗崎 良太 (九州大学大学病院 助教)

A. 研究目的

血管腫は小児肝腫瘍の中で最も頻度の高い腫瘍性病変であり、多くの文献では血管内皮細胞の増殖した良性腫瘍と説明されている。臨床的には多くの肝血管腫は無症状で偶然に発見されるものも多いが、一方で新生児や乳児にみられる肝血管腫の中には、稀少ではあるが、特異な病態から治療抵抗性で致死的経過をとるものがある。新生児の巨大な肝血管腫は、増大した血管床による心負荷による高拍出性心不全や、消費性凝固障害から全身性の播種性血管内凝固障害 (DIC) などの重篤な病態を呈することが1990年代から指摘されており、周産期医療の領域では重要な疾患である。2007年にChristison-Lagayらは新たに重篤な症状を呈する肝血管腫症例をまとめて、特にび慢性に肝内にひろがる肝血管腫は最もリスクが高く、無症状の肝血管腫とは異なる独立した疾患群であることを主張した。その後、この疾患群の提唱を支持する文献が散見されるが、大きな症例数における広域規模での検討は見られず、それぞれの報告で若干異なった臨床像が提唱されている。

一方で、“血管腫”と言われる病変について、特に浅在性の病変については皮膚科、形成外科領域でやはり1990年代から、これを血管内皮の増殖した腫瘍性病変と血管奇形・形成異常の2つのカテゴリーに分けて考える概念が提唱されてきた。前者は自然退縮やステロイド、抗腫瘍

剤などへの感受性が期待できるが、後者では期待できない。臨床的に治療に直結した分類概念として、これはその後、International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) 分類としてまとめられ、今日、広く普及している。しかしながら、ISSVA分類は基本的に浅在性病変の観察から確立された分類概念であり、肝血管腫のような深部病変に関してこの概念がそのまま導入可能か否かは今後の検討課題となっている。

近年、血管腫に対する新たな治療が導入されつつある。Leaute-Labrezeらは2008年に β -ブロッカーのプロプラノロールが重症の血管腫に著効を示すことを報告した。さらに新生児に対する血管内治療技術や、急性期病態に対する肝移植などが報告された。出生前診断技術も飛躍的に進歩し、難治性肝血管腫に対する新規治療をどのように選択すべきか、治療指針の策定に向けて大きなシリーズでの臨床像、治療実態の把握が求められている。

そこで本研究は、新生児、乳幼児の肝血管腫の臨床像をさらに詳細かつ広範囲で検討し、治療実態の把握とともに様々な先端的治療手技の応用可能性を検証することを目的とした。これに基づいて本症の疾患概念ともいべき診断手順と、リスク評価に直結する重症度分類案の策定をも目指した。

平成22年より厚生労働省の難治性疾患研究事業の一環として研究班が発足し、小児外科領域の学会認定施設を対象とし、全国の11施設から過去5年間で19症例の生後1歳未満で治療を要した肝血管腫症例が同定された。今年度は全国的なさらなる症例の洗い出しと、前回調査症例も含めた詳細な解析を目指した。昨年度から準備してきた調査計画を、小児外科領域、周産期・新生児領域に拡大して実行し、より多くの症例を同定することを目標とした。