

総 説

小児ウイルス性肝炎の現状と課題

小児科

田 尻 仁

Current opinions and future issues on viral hepatitis in children and adolescences

Hitoshi Tajiri

Key words: ウイルス肝炎、潜伏感染、インターフェロン、リバビリン、核酸アナログ
Viral hepatitis, occult infection, interferon, ribavirin, nucleotide analogues

はじめに

小児期に肝炎を起こすウイルスとしては、まず肝炎ウイルスがあげられる。肝炎ウイルスとは、肝細胞で増殖し、主に肝細胞障害をおこすものであり、A型からE型までの5種類が知られている。日本の小児ではD型肝炎とE型肝炎の報告は非常に稀である。A型は急性肝炎のみを起こし、しかも大人と比べて小児では症状が軽く、短期間で治癒するので、問題の少ない肝炎と言える。B型肝炎、C型肝炎は主に血液を介して感染するもので、小児でも劇症肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を起こす。肝炎ウイルス以外に肝炎を起こすウイルスとしては、様々なヘルペスウイルスが知られている¹⁾。サイトメガロウイルス²⁾、EBウイルス、HHV-6^{3,4)}などが知られている。本稿ではB型肝炎、C型肝炎について述べる。

小児 B 型肝炎

1. 臨床症状

1) 急性肝炎・劇症肝炎

B型急性肝炎はA型急性肝炎と症状に本質的な差はないが、一般にA型より軽く、また成人に比べて軽症である。新生児・乳児では無症状のことが多い。劇症肝炎はまれであるが、いったん発症すると死亡率が高く約2/3が死亡する。母子感染防止対策導入後に乳児期の劇症肝炎は激減した。Gianotti

病は、水平感染による乳幼児のB型急性肝炎の一病型であり、顔面、体幹、四肢の伸側に特徴的な発疹が出現する。

2) 慢性肝炎

小児では非特異的症状(食思不振、顔色不良、右季肋部痛、鼻出血)を示すこともあるが、多くは無症状である。セロコンバージョン(SC; HBe抗原陽性からHBe抗原陰性/HBe抗体陽性への転換)を起こすと肝炎が鎮静化することが多い。小児期ではまれではあるが、慢性肝炎から肝硬変・肝癌に進行する例もある。成人では長期間炎症が持続したB型慢性肝炎では肝線維化が進行し、年率2%で肝硬変に進展し、肝細胞癌の発生率は無症候性キャリアで年率0.1-0.4%、慢性肝炎で0.5-0.8%、肝硬変では1.2-8.1%と報告されている⁵⁾。

2. 病因

成人でのB型肝炎ウイルス(HBV)初感染は急性肝炎がほとんどであり感染が持続することは少ないが、周産期、乳幼児期に感染すると90%以上が持続感染となる。HBVそのものに細胞障害性はなく、HBV持続感染はウイルスと宿主免疫機構とのバランスの中で成立している。HBV持続感染の自然経過は、①免疫寛容期、②ウイルス排除期、③無症候性キャリア期、④再燃期、⑤回復期に分けられる。母子感染の小児では、成人になるまでに上記の①→②→③の経過を経て15歳までに約45%、20歳までに約55%がSCを起こす⁶⁾。

再燃期はSC後20-30%の症例で、自然経過もしくは免疫抑制剤使用などが誘因となって、HBVが再増殖し肝炎が再燃した状態で、HBe抗原産生に関する領域のHBV遺伝子変異を伴っているためHBe抗原は陽転化せずに、HBV増殖が起こる。再燃期の肝炎は、肝硬変、肝細胞癌進展のハイリスクであると考えられている。最終ステージの回復期に進みHBs抗原が陰性化してHBs抗体陽性になるのは全症例の1%前後とされている。

かつてはHBs抗原陰性でHBs抗体陽性の場合にはHBV既感染者とされ、臨床的には治癒の状態と考えられてきた。しかし、このよう既感染者でも肝臓や末梢単核球中にはHBVが潜伏感染し、強力な免疫抑制剤使用や化学療法によりHBV再活性化が起こり重症肝炎を起こすことが分かっている (de novo B型急性肝炎)。それゆえ、HBV感染症は治癒の判断が困難で、HBs抗原陰性となった場合でも肝細胞癌発生の危険性があり、一生経過観察が必要な病態と考えられる。

3. 疫学

1) 発生状況

HBVは世界総人口の約5%に相当する3億5千万もの人々に持続感染している。一部の感染者は長期間の感染後に慢性肝炎から肝硬変を経て肝細胞癌を発症し、そのために年間60万人以上が死亡していると推定される。感染者の70%以上がアジアに集中しているが、日本の感染率は低く0.63%で、約110~140万人がHBVに持続感染している。小児B型肝炎はかつては比較的頻度の高い疾患であった。しかし1970年以降は、献血および血液製剤のHBV関連マーカー検査、医療器材のデイスボ化などによりHBVの水平感染は減少した。さらに1985年からB型肝炎母子感染防止事業が始まり、HBVキャリア率は開始前の0.26%から、9年後には0.024%と1/10に低下している。これらの結果、近年小児科領域で経験するB型肝炎は次第に減少している。しかしながら依然として一定数の小児のHBVキャリアは発生しており、B型急性肝炎、劇症肝炎、B型慢性肝炎も散発している⁷⁾。

2) Genotype

HBVはAからHまでの8種類のgenotypeに分類されている⁸⁾。Genotypeはさらにsubgenotypeに分類され、地域により分布に違いがある。genotype Aaはアジアやアフリカ、Aeはヨーロッパ、Baは中国南部、台湾、インドシナ半島、Bjは日本、Ceは日本、中国南部、インドシナ半島、Csは中国北部から韓国に分布する。Genotype Dは地中海沿岸から中近東、Eは西アフリカ、Fは中央および南アメリカ、Gはフランス、Hは中南米でみられる。Genotypeによって臨床経過や治療反応性に差があるとの知見が集積しつつある。日本で最も多いのはgenotype Ceである。Genotype CはBに比べてHBe抗原からHBe抗体へのSCが遅く、そのため肝硬変・肝細胞癌の頻度が高い。

3) 感染経路

(1) 母子感染

HBs抗原陽性の妊婦全体では母子感染率は20~30%であるが、妊婦がHBe抗原陽性の場合には80~90%がHBVキャリアになる⁹⁾。一方、HBe抗体陽性の場合のHBVキャリア化は10%未満であり、その多くは一過性の感染であるが、ごくまれに劇症肝炎を発症する。

(2) 家族内・集団内感染

HBVは性行為により感染するため、夫婦間感染も重要な感染経路である。特にHBe抗原陽性者では高率に夫婦間感染がみられ、大半の配偶者は結婚後5年以内にHBs抗体を獲得する。HBVキャリア父親からの父子感染も多い¹⁰⁾。その他の家族がHBVキャリアの場合も含めて、歯ブラシの共有などで少量の血液を介して家族内感染する可能性がある。2005年の全国調査の報告でも、1998~2003年の95例のHBV感染経路として父子感染10.5%、その他の家族内感染4.2%と報告されている¹¹⁾。家族内水平感染によって重症肝炎や劇症肝不全を発症する例もある。

(3) 輸血による感染

1970年に献血者に対するHBs抗原によるスクリーニング検査が始まり、1989年にHBe抗体検査が導入され、さらに近年核酸増幅検査(NAT)によるHBV DNA検査が導入された結果、輸血によるHBV感染はきわめてまれになった。最近の日本赤十字の輸血情報によると、34~45万本の輸血に対して1件の受血者に感染すると推定されている。

(4) 性行為による感染 (STD)

近年、STDによるHBV感染が増加している。大部分は不顕性感染であるが、急性肝炎や劇症肝炎を発症する例もある。とくにHBV genotype A感染の一部はキャリア化するため問題となっている。

(5) 医療機関内感染

近年、医療機器の消毒が厳重にされるようになり、機器を介しての感染はないと考えられるが、HBV感染者の血液に汚染された針などによる感染リスクがあり、HBs抗体陰性の医療従事者はHBワクチンを接種すべきである。

4. 新しい検査方法

1) HBV DNA定量

最近では測定範囲が広いTaqMan PCR法が使用されている。HBV初感染では4~10週間の潜伏期を経てHBs抗原が血中に現れる。B型急性肝炎では、ごく初期に多量のウイルスが血中に存在した後、ALT値の上昇とともにHBV DNA量は急速に低下する。HBe抗原陽性からHBe抗体陽性へSCした後もHBV DNAが検出されることが多く、さらにHBs抗体陽性例であっても一部の例では少量のHBV DNAが検出されることもある。無症候性キャリアやB型慢性肝炎では、HBV DNA量はしばしば 10^{7-9} copies/ml以上と多い。

2) HBe抗原および関連する遺伝子変異

HBe抗原はHBV DNA量や肝炎の活動性に関連するマーカーである。HBe抗原が陽性であるとHBV DNA量は高値であるが、SCを起こすとしばしばHBV DNA量は著明に減少する¹²⁾。しかし、HBe抗原が陰性化してもHBV DNA高値のことや慢性肝炎が持続することがある。その理由としてHBe抗原非産生変異株の持続感染があり、precore領域の変異(28番目のアミノ酸に停止コドン)やcore promoter領域の変異(nt1762およびnt1764の二重変異)が知られている。

3) Genotypeおよびsubgenotype

Genotypeの判定法にはgenotype特異的のモノクロナール抗体を用いたEIA法、ダイレクトシーケンス法などがある。

5. 治療

1) 急性肝炎

急性肝炎はほとんどが自然治癒するので特殊治療の必要はなく、劇症化の徴候に注意しながら、対症療法を行う。重症化した場合は経口抗ウイルス剤を投与する。プロトロンビン時間(PT)の急激な低下やビリルビンやアンモニアの上昇、肝障害に伴う意識レベルの低下などの劇症化の兆候を見逃さないようにし、劇症化した場合は肝移植の可能性も考え、専門医に相談する。PTが40%未満あるいはヘパプラスチンテストが30%未満になれば、抗ウイルス療法と血漿交換などの人工肝補助療法を行う。

2) 慢性肝炎

(1) 治療開始の目的と適応

治療目的は、肝炎を抑え、肝硬変、肝細胞癌を防ぐことにある。抗ウイルス薬はHBVの増殖を抑制するが、完全に排除することはできない。したがって、現実的な初期の目標は、セロコンバージョン、ALTの正常化、ウイルス量の低下である。

HBVキャリアが肝炎を発症した場合、小児では2年以内に高率にSCを起こすことから、基本的に2年間は経過観察する。2年以上肝炎が持続する例では肝生検を行い、治療適応を検討する。新犬山分類でA2以上の活動性やF2以上の線維化は治療適応となる¹³⁾。肝炎発症2年以内であっても、強い肝炎が持続する例(ALT 300~500IU/l以上)、線維化の進行が疑われる例(血小板の減少など)では肝生検を行い、治療適応を判定する。また肝炎の活動性や線維化が軽度の場合も、長期間肝炎が持続することは肝硬変への進展や発癌リスクが高くなるため、罹患年数を考慮して治療を試みる場合もある。現在、有効な治療法としてはインターフェロン(IFN)、経口抗ウイルス薬(核酸アナログ製剤)がある。詳しくは、2014年に作成された小児B型慢性肝炎に対する初回治療ガイドラインを参照されたい(図)¹³⁾。同様に成人でも「B型慢性肝炎の治療ガイドライン」が出されており、HBe抗原陽性の35歳未満の成人にはIFN療法がfirst choiceになっている⁵⁾。

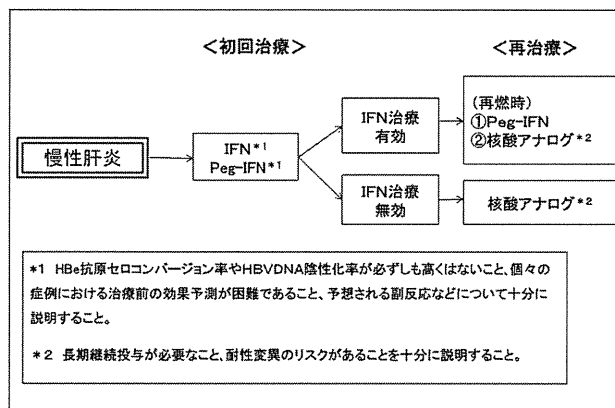


図 小児B型慢性肝炎の治療ガイドライン

(2) インターフェロン療法

保険適応が認められているのは天然型IFN- α 製剤のみである。小児における用法・用量はIFN- α 製剤10万単位/kg/回×週3回、6ヵ月投与である。副作用としては投与中の発熱、倦怠感、投与開始2週間後くらいからの骨髄抑制(白血球減少や血小板減少)がある。その他、胃腸障害、脱毛、甲状腺機能低下、抑うつなどを認める。小柴胡湯との併用は間質性肺炎を起こすため禁忌である。3歳以下の小児でいれん誘発の報告がある。IFNの効果をも高める因子としては、肝炎の活動性が高いこと(肝生検における肝炎の活動性A2以上やALT高値)、HBV DNA量が少ないこと(10^{1-5} copies/ml以下)がある。小児でのIFN治療の有効率は成人より高く、40-50%と報告されている^{14,15)}。欧米の報告では小児でのIFN投与量は300-1000万単位/m²を週3回皮下注射するというものが多く、SCは26-60%と報告により様々である¹⁶⁾。海外の治療成績は我が国とgenotypeが異なるため単純には比較できない。

現在では成人のB型に対しては、主にペグインターフェロンが使用されている。小児でもこれからは通院の負担の少ない、週1回投与のペグインターフェロンが使用されるものと考えられる。

(3) 核酸アナログ製剤

現在保険適応になっているものはラミブジン、アデフォビル、エンテカビル、テノフォビルである。小児ではIFN療法が効果的なが多いので、IFN療法が無効の症例やIFN投与により肝不全になる危険性がある症例に限定して、核酸アナログ製剤を使用する。当初はラミブジンが主に使用されてきたが、2006年にエンテカビルが保険適応となり、ラミブジンに比べ薬剤耐性変異株の発生頻度が少なく、第1選択薬として推奨されている。2014年にテノフォビルが保険適応となりエンテカビルと同様に第1選択薬となっている。当科ではラミブジン3-5mg/kg/日またはエンテカビル0.01mg/kg/日を1日1回内服で投与している。投与期間については一定の見解はないが、核酸アナログ投与終了の目安はHBe抗原消失

が6ヵ月以上持続した時点とされている¹⁷⁾。投与中止後4ヵ月間は肝炎の再燃に注意し厳重に経過をみる。小児でのラミブジンによる治療成績は、3-4mg/kgを52週投与した海外の報告では、HBV DNA陰性化率61%、HBe抗原陰性化率26%であった¹⁸⁾。我が国の小児に対するエンテカビル、テノフォビルの治療効果、安全性については報告が少ない。

6. 予防対策

1) 一般的な感染予防

HBVは血液を介して感染する。感染者の血液や体液に触れないことが感染予防上重要である。HBV感染に対してはHBIG（高力価HBs抗体免疫グロブリン）、およびHBワクチンによる予防が有効である。針刺し事故に対してはまずHBIGを筋注し、同時にHBワクチンを始める。医療関係者などハイリスク群には積極的にHBワクチンの予防接種をすすめる。

2) 母子感染の予防

1985年6月よりHBe抗原陽性妊婦からの出生児に対して母子感染予防事業が始まり、1995年からは予防対象がHBs抗原陽性妊婦からの出生児に拡大されるとともに、健康保険適応に移管された。HBs抗原陽性妊婦からの出生児に対して、出生12時間以内にHBIG（200単位：1ml）筋注および1回目のHBワクチン接種を行う。生後1.6ヵ月に2回目と3回目のHBワクチン接種を行う。出生後のHBIGはできるかぎり出生後早期に投与するのがよい。生後9～12ヵ月時にHBs抗体検査を行い、十分なHBs抗体産生を認めなければ、HBワクチンの追加接種を行う。当科では3歳までは十分な抗体価（HBs抗体価100m IU/ml以上）を保つように追加接種を勧めている。従来のB型肝炎母子感染防止対策の手引きでは生後1ヵ月に抗原検査を行い、HBs抗原陽性の場合にはその後の措置は断念せざるをえないとなっている。しかし1ヵ月時のHBs抗原が陽性であっても、ワクチンは予定通り続行するのがよい。B型肝炎の母子感染予防に関しては、胎内感染の存在（約1%）、HBワクチン反応不良例への対策、HBV変異株の出現などの問題点が残っている。

3) universal vaccination

1992年にWHOからHBVに対するuniversal vaccinationを小児期に行うように勧告があり、2008年までに世界177カ国（91.7%）で全新生児に対するuniversal vaccinationが実施されている¹⁹⁾。日本では1985年からHBVキャリア妊婦からの出生児に対するB型肝炎母子感染予防事業が行われ、大きな成果を上げてきた。母子感染は減少したが、父子感染を含めた水平感染や、STDによる感染、免疫抑制・化学療法における潜伏感染が問題となっており、全出生児に対するuniversal vaccinationの導入が望まれる²⁰⁾。

小児C型肝炎

1. 臨床症状

小児のC型肝炎はB型肝炎と同様、無症候性キャリア、急性肝炎、慢性肝炎など様々な病型がある。しかしB型肝炎と異なり、HCVに対する免疫応答が弱いことから小児期には肝病変が肝硬変、肝癌に進行することはまれである。また通常小児例のほとんどは無症候性であり、C型肝炎ウイルス（HCV）感染後もトランスアミナーゼが正常のことが多い。頻度は低いものの一過性の肝障害、無症候性からの急性増悪などが認められる²¹⁾。

小児C型慢性肝炎の自然経過については報告が少なく不明な点が多い。垂直・水平感染とも頻度は低いものの自然治癒が報告されている。血液、悪性疾患などの基礎疾患をもつ例は自然治癒はまれである。

2. 病因・疫学

血液によって感染し、一過性感染あるいは持続感染をおこす。小児HCV感染者の多くは、かつては輸血などの医療行為によるものであり、血液疾患、悪性腫瘍、先天性心疾患などの治療のため輸血を受けた患者であった。しかし1989年から献血者に対する第1世代HCV抗体による血液のスクリーニングが開始されたことによって輸血関連感染は激減しており²²⁾、現在では新たな感染は母子感染にほぼ限定される。その頻度はHCV RNA陽性妊婦から出生した児では約10%である²³⁾。母子感染成立のリスクファクターは、HIVの重複感染と血中HCV RNA量の高値（10⁶copies/ml以上）が挙げられている。なお母乳を与えても感染率は上昇しない。分娩形式に関して血中HCV RNA高値のハイリスク群であっても予定帝王切開例では感染率が低いとの報告がある。最近のわが国の疫学的調査から、HCV母子感染例は年間約273～341例発生すると推計されている²⁴⁾。感染した児は生後1～3ヵ月頃までにHCV RNA陽性となる。母子感染でHCV RNA陽性となった乳幼児では、しばしば軽度の肝機能の上昇が認められる。母子感染では3歳までに約30%の症例でウイルスが自然排除されるため²⁵⁾、治療開始の時期は早くても3歳以降とする。

3. 新しい検査方法

1) HCV RNA定量

現在保険適応があるHCV RNAのPCR法はreal time PCR法（TaqMan法）のみであり、1.2 log IU/mLから検出可能な高感度定量法である。

2) HCVのgenotype

現在までに10種類以上発見されているが、わが国ではgenotype 1b型が最も多く（約70%）、2a型が約20%、2b型が約10%を占める。まれな1a型は輸入血液製剤の投与を受けた血友病患者に限られる。それ以外の遺伝子型は我が国ではきわめてまれである。

4. 治療

1) 治療開始のタイミングと適応

C型肝炎はトランスアミナーゼ値が正常でも肝組織には炎症や線維化がみられることが多いので、トランスアミナーゼ上昇が持続する症例のみならず、病理診断で慢性肝炎と診断された症例も治療対象とする^{26,27)}。わが国における小児のC型肝炎の肝線維化は新犬山分類F0～F2が大部分であり、免疫機能に異常がなければ肝細胞癌の小児期発症の報告はない。Kageらによると我が国のHCV感染小児のほとんどは軽度の線維化までに留まり、一部中等度の線維化が認められるが肝硬変症例はみられなかったと報告されている²⁸⁾。

2) ペグインターフェロン/リバビリン(Peg-IFN/RVB)併用療法

現在、成人ではシメプレビル/Peg-IFN/RVB併用療法が標準的な治療となっているが、欧米では、小児に対してはPeg-IFN/RVB併用療法が標準的な治療となっている。Genotype 1群の中でも、*IL28B* 遺伝子がTG、GGの症例はTTに比べて治療効果が低い³⁰⁾。小児では、PEG-IFN *a*-2b (1.5 μ g/kg/回週1回) とリバビリンの併用 (15mg/kg/日分2)、PEG-IFN *a*-2a単独投与 (3 μ g/kg/回週1回) などが推奨されている (表1)。2014年版小児C型肝炎に対する初回治療ガイドラインを参照されたい³³⁾。一般に小児では成人より副作用が軽く、治療に対するアドヒアランスが良好であり、成人以上の治療効果が期待できる。小児期に治療することは将来の母子感染や水平感染を未然に防げること、将来の肝移植や慢性肝炎患者に要する医療費を減少させることが証明されている。

Peg-IFNは、IFN *a* にポリエチレングルを結合させたもので、血中半減期が長く、週1回投与で効果が期待できる。市販されているPeg-IFNには、*a*-2a、*a*-2bの二種類があるが、治療効果に差は認められていない。リバビリンは、1972年に開発されたプリン骨格を有する合成核酸アナログで、*in vitro* では広範囲のRNAおよびDNAウイルスに対して抗ウイルス活性を示す経口核酸アナログである。C型肝炎に対しては、単独投与では無効であるがPeg-IFNとの併用により抗ウイルス効果を現す。Genotypeにより治療効果に違いがあるが、小児のC型肝炎ではgenotype 1で46～57% (表2)、genotype 2で80～93% (表3) のウイルスの完全排除が報告されている²⁹⁻³⁶⁾。

Peg-IFNの副作用として、とくにPeg-IFN *a*-2aは白血球減少、貧血、血小板減少を高率に生じるため、Peg-IFN投与前に毎回血液検査を行い、投与量を調整する必要がある。Peg-IFN *a*-2b使用時にも投与開始後8週間は毎週、その後は4週間に1度、血液検査をする必要がある。リバビリンは開発段階の動物実験で催奇形性がみられたため、妊孕性のある女性患者および成人男性患者は、投与中および投与終了後6ヶ月間は避妊がすすめられる。

副作用に関しては成人と基本的には変わらない出現頻度で

表1 小児C型肝炎に対する初回治療ガイドライン

	Genotype 1	Genotype 2
高ウイルス量 5.0 Log IU/mL 以上 300 fmol/L 以上	Peg-IFN <i>a</i> 2a (48 週間) + Ribavirin (48 週間) Peg-IFN <i>a</i> 2b (48 週間) + Ribavirin (48 週間)	Peg-IFN <i>a</i> 2b (24 週間) + Ribavirin (24 週間)
低ウイルス量 5.0 Log IU/mL 未満 300 fmol/L 未満	Peg-IFN <i>a</i> 2a (24 週間)	Peg-IFN <i>a</i> 2a (24 週間)

表2 小児での治療成績：genotype 1 (GT-1)
(患者数が10人以上の報告に限る)

報告年	著者	患者数	年齢	Peg IFN	投与期間	SVR	備考
2005	Wirth et al.	46	10(2-17)	α -2b	48W	48%	
2006	Shawarz et al.	13	4.4(2-8)	α -2a	48W	46%	
2008	Jara et al.	26	10(3-16)	α -2b	48W	46%	
2009	Tajiri et al.	20	17(7-30)	α -2b	48W～72w	80%	4人が72w投与
2010	Schwarz et al.	45	10.7 \pm 3.3	α -2a	48W	47%	
2010	Sokal et al.	47	12.6 \pm 3.6	α -2a	48W	57%	GT-1が45人、GT-4.5も含む
2010	Wirth et al.	72	10(3-17)	α -2b	48W	53%	

表3 小児での治療成績：genotype 2 (GT-2)
(患者数が10人以上の報告に限った)

報告年	著者	患者数	年齢	Peg IFN	投与期間	SVR	備考
2005	Wirth et al.	13	10(2-17)	α -2b	48W	100%	GT-3も含む
2009	Tajiri et al.	13	17(7-30)	α -2b	24W	84%	
2010	Schwarz et al.	10	10.7 \pm 3.3	α -2a	24W	80%	GT-3も含む
2010	Sokal et al.	18	11.3 \pm 3.6	α -2a	24W	88%	GT-3も含む
2010	Wirth et al.	30	10(3-17)	α -2b	24W	93%	

あるが、成人に比べて治療を中止せざるを得ないような副作用は少なく、治療完遂率が高いのが特徴である^{29,32)}。その他の副作用として、小児ではインフルエンザ様症状 (発熱、悪寒、全身倦怠感、頭痛、関節痛など)、熱性けいれん、食欲不振、消化器症状 (腹痛、吐き気、下痢、口内炎など) が多い。肝機能障害 (AST、ALTの上昇)、皮膚 (発疹、かゆみなど)、脱毛なども経験するがほとんどが軽症である。さらには成長障害、甲状腺機能異常に注意する。成人で問題となる精神神経症状 (不眠、不安、躁うつ病)、間質性肺炎、網膜症、循環器症状 (不整脈、心不全など)、糖尿病悪化などは小児ではまれである。

5. 予防対策

現時点では出生児のHCV母子感染を確実に予防する方法はない。選択的帝王切開では、経膈分娩・緊急帝王切開に比してHCV母子感染率が低くなると報告されているが、母体と新生児に対する帝王切開の合併症を考慮すると、妊婦がHCVキャリアという理由で帝王切開の適応とすることは推奨できない³⁷⁾。なお母乳にはHCV RNAが検出されないという報告が多いこと、および母乳哺育児と人工哺育児との間でHCV感染率に差がないことから母乳を禁ずる必要はない。

文 献

- 1) 田尻 仁, 恵谷 ゆり: 非肝炎ウイルス感染による慢性肝炎. 小児科診療, 70: 908-911, 2007
- 2) Tajiri H, Kozaiwa K, Tanaka-Taya K, Tada K, Takeshima T, Yamanishi K, Okada S: Cytomegalovirus hepatitis confirmed by in situ hybridization in 3 immunocompetent infants. Scand J Infect Dis, 33: 790-3, 2001
- 3) Tajiri H, Nose O, Baba K, Okada S: Human herpesvirus-6 infection with liver injury in neonatal hepatitis. Lancet, 7: 335: 863, 1990
- 4) Tajiri H, Tanaka-Taya K, Ozaki Y, Okada S, Mushiake S, Yamanishi K: Chronic hepatitis in an infant, in association with human herpesvirus-6 infection. J Pediatr. 131: 473-5, 1997
- 5) 日本肝臓学会編: 慢性肝炎の治療ガイド. 2008: 4 ページ
- 6) Takano T, Tajiri H, Etani Y, Miyoshi Y, Tanaka Y, Brooks S: Natural history of chronic hepatitis B virus infection in childhood and efficacy of interferon therapy. Scand J Gastroenterol 2014 (in press)
- 7) 田尻仁, 白木和夫, 藤澤知雄, 他: 小児B型肝炎の診療指針, 日本小児科学会雑誌111: 949-958, 2007
- 8) Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M: Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. J Gen Virol, 69: 2575-2583, 1988
- 9) 白木和夫, 谷本要, 岡田隆好: HBV母児感染の疫学, 肝胆臓, 13: 493-501, 1986
- 10) Tajiri H, Tanaka Y, Kagimoto S, Murakami J, Tokuhara D, Mizokami M: Molecular evidence of father-to-child transmission of hepatitis B virus. J Med Virol, 79: 922-926, 2007
- 11) 藤澤 卓爾, 牛島 高介, 大和 靖彦, 中嶋 英輔, 前田 公史, 熊谷 優美, 木村 昭彦: 我が国の小児HBウイルス感染症の現状と予防対策の実態調査, 日本小児科学会雑誌, 109: 363-369, 2005
- 12) 矢橋 弘, 長岡 進矢, 裴 成寛, 阿比留 正剛: HBV感染症の自然史, 臨床消化器内科. 24: 637-644, 2009
- 13) 厚生労働科学研究費補助金「小児期のウイルス性肝炎に対する治療法の標準化に関する研究」平成23-25年度総合研究報告書 1-32ページ 2014年3月
- 14) 沢田 敦, 田尻 仁, 古座岩 宏輔, 他: 小児B型慢性肝炎に対するインターフェロン療法の成績, 日本小児科学会雑誌, 100: 1504-1507, 1996
- 15) Fujisawa T, Komatsu H, Inui A, Sogo T, Miyagawa Y, Fujitsuka S, Sekine I, Kosugi T, Inui M: Long-term outcome of chronic hepatitis B in adolescents or young adults in follow-up from childhood. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 30: 201-206, 2000
- 16) Kurbegov AC, Sokol RJ: Hepatitis B therapy in children. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 3: 39-49, 2009
- 17) Dikici B, Ozgenc F, Kalayci AG, Targan S, Ozkan T, Selimoglu A, Doganci T, Kansu A, Tosun S, Arslan N, et al: Current therapeutic approaches in childhood chronic hepatitis B infection: a multicenter study. J Gastroenterol Hepatol. 19: 127-33, 2004
- 18) Jonas MM, Mizerski J, Badia IB, Areias JA, Schwarz KB, Little NR, Greensmith MJ, Gardner SD, Bell MS, Sokal EM et al: Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B. N Engl J Med. 346: 1706-1713, 2002
- 19) 白木和夫: B型肝炎ワクチン, 小児科診療, 12: 2333-2338, 2009
- 20) 田尻 仁: わが国におけるB型肝炎の現状とユニバーサルワクチネーション, 化学療法の領域 29: 259-265, 2013
- 21) Tajiri H, Etani Y, Mushiake S, Hasegawa Y, Ozono K: Acute exacerbation of hepatitis in a boy with chronic HCV genotype-2 infection after a 9-year period of normal transaminases levels. Eur J Pediatr. 166: 501-2, 2007
- 22) Tada K, Tajiri H, Kozaiwa K, Sawada A, Guo W, Okada S: Role of screening for hepatitis C virus in children with malignant disease and who undergo bone marrow transplantation. Transfusion. 37: 641-4, 1997
- 23) Tajiri H, Miyoshi Y, Funada S, Etani Y, Abe J, Onodera T, Goto M, Funato M, Ida S, Noda C, et al: Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. Pediatr Infect Dis J. 20: 10-4, 2001
- 24) 厚生労働科学研究費補助金「肝炎対策の状況を踏まえたウイルス性肝疾患患者数の動向予測に関する研究」平成23-25年度総合研究報告書, 47-49, 2014
- 25) Sasaki N, Matsui A, Momoi M, Tsuda F, Okamoto H: Loss of circulating hepatitis C virus in children who developed a persistent carrier state after mother-to-baby transmission. Pediatr Res. 42: 263-7, 1997
- 26) Sawada A, Tajiri H, Kozaiwa K, Guo W, Tada K, Etani Y, Okada S, Sako M, Favorable response to lymphoblastoid interferon-alpha in children with chronic hepatitis C. J Hepatol. 1998; 28: 184-8.
- 27) 十河 剛: C型肝炎, 小児科診療, 73巻増刊: 589-592, 2010
- 28) Kage M, Fujisawa T, Shiraki K, Tanaka T, Fujisawa T,

- Kimura A, Shimamatsu K, Nakashima E, Kojiro M, Koike M, et al : Pathology of chronic hepatitis C in children. *Hepatology*. 26 : 771-5, 1997
- 29) Wirth S, Pieper-Boustani H, Lang T, Ballauff A, Kullmer U, Gerner P, Wintermeyer P, Jenke A: Peginterferon alfa-2b plus ribavirin treatment in children and adolescents with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 41 : 1013-8, 2005
- 30) Tajiri H, Tanaka Y, Takano T, Suzuki M, Abukawa D, Miyoshi Y, Shimizu T, Brooks S : Association of IL28B polymorphisms with virological response to peginterferon and ribavirin therapy in children and adolescents with chronic hepatitis C. *Hepatology Res*. 44 : E38-E44, 2014
- 31) Schwarz KB, Mohan P, Narkewicz MR, Molleston JP, Nash SR, Hu S, Wang K, Gries JM : Safety, efficacy and pharmacokinetics of peginterferon alpha 2 a (40 kd) in children with chronic hepatitis C. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 43 : 499-505, 2006
- 32) Jara P, Hierro L, de la Vega A, Diaz C, Camarena C, Frauca E, Miños-Bartolo G, Díez-Dorado R, de Guevara CL, Larrauri J, et al : Efficacy and safety of peginterferon-alpha2b and ribavirin combination therapy in children with chronic hepatitis C infection. *Pediatr Infect Dis J*. 27 : 142-8, 2008
- 33) Tajiri H, Inui A, Kiyohara Y, Suzuki M, Kagimoto S, Etani Y, Shimizu T, Fujisawa T: Peginterferon alpha-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in Japanese pediatric and young adult patients: a survey of the Japan Society of Pediatric Hepatology. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 21 : 1256-60, 2009
- 34) Schwarz KB, Gonzalez-Peralta RP, Murray KF, Molleston JP, Haber BA, Jonas MM, Rosenthal P, Mohan P, Balistreri WF, Narkewicz MR, et al: The Combination of Ribavirin and Peginterferon Is Superior to Peginterferon and Placebo for Children and Adolescents Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 140 : 450-458, 2011
- 35) Sokal EM, Bourgois A, Stéphenne X, Silveira T, Porta G, Gardovska D, Fischler B, Kelly D : Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in children and adolescents. *J Hepatol*. 52 : 827-31, 2010
- 36) Wirth S, Ribes-Koninckx C, Calzado MA, Bortolotti F, Zancan L, Jara P, Shelton M, Kerkar N, Galoppo M, Pedreira A, et.al: High sustained virologic response rates in children with chronic hepatitis C receiving peginterferon alfa-2b plus ribavirin. *J Hepatol*. 52 : 501-7, 2010
- 37) 白木和夫 : HCV感染妊婦と出生児の管理指導. *小児科診療*, 70 : 889-893, 2007

Case Report

Neonatal liver failure owing to gestational alloimmune liver disease without iron overload

Tomoyuki Tsunoda,¹ Ayano Inui,¹ Manari Kawamoto,¹ Tsuyoshi Sogo,¹ Haruki Komatsu,² Mureo Kasahara,³ Atsuko Nakazawa⁴ and Tomoo Fujisawa¹

¹Department of Pediatric Hepatology and Gastroenterology, Saiseikai Yokohama Eastern Hospital, Yokohama,

²Department of Pediatrics, Toho University Medical Center Sakura Hospital, Sakura, and Departments of

³Transplant Surgery and ⁴Pathology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

Although neonatal hemochromatosis (NH) is a well-known cause of liver failure during the neonatal period and iron deposition in extrahepatic tissues is considered essential in the diagnosis of NH, there is no consensus regarding the pathology or diagnostic criteria of NH. Recent studies of immunohistochemical assays have shown that the C5b-9 complex (the terminal membrane attack complement complex) is strongly expressed in the liver of NH cases, suggesting that a gestational alloimmune mechanism is the cause of liver injury. The patient was a low birthweight primiparous male born at 37 weeks of gestation by vaginal delivery. Blood tests 3 h after birth showed signs of liver failure, including high transferrin saturation, resembling the clinical characteristics of NH. However, magnetic resonance imaging and a lip biopsy showed no obvious iron deposition outside the liver.

The patient was refractory to exchange transfusion and immunoglobulin therapy but was successfully treated by liver transplantation. Histologically, the explanted liver showed established cirrhosis, with large amounts of human C5b-9 in the residual hepatocytes, suggesting the alloimmune mechanism of liver injury was the cause of his liver failure. Liver failure caused by a gestational alloimmune mechanism should be considered in patients with antenatal liver failure, even without obvious extrahepatic siderosis.

Key words: C5b-9, gestational alloimmune liver disease, liver failure, liver transplantation, membrane attack complex, neonatal hemochromatosis

INTRODUCTION

THE ETIOLOGY OF neonatal hemochromatosis (NH) is often difficult to determine, resulting in high mortality rates. Although NH is an important cause of neonatal liver failure, its pathogenic mechanism remains unclear. Among the diagnostic criteria for NH is the demonstration of extrahepatic iron deposition.¹ Recent findings suggested that a maternal gestational alloimmune disease mechanism may cause NH.² We

describe a patient with neonatal liver failure but without extrahepatic iron deposition resulting from maternal alloimmune liver injury.

CASE REPORT

THE MOTHER OF the patient was a 26-year-old woman with no history of miscarriage. She and her husband were not consanguineous, with neither having a relevant past medical history, except that her husband had chronic hepatitis B. Fetal ultrasound showed intra-uterine growth retardation, beginning at week 34 of gestation. The newborn, a male, was born at 37 weeks and 5 days of gestation by spontaneous delivery as a primiparous baby. He was of low birthweight (2122 g), with no abnormalities on physical examination. However, a blood test 3 h after birth revealed hypoglycemia (10 mg/dL), a low platelet count ($8.3 \times 10^4/\mu\text{L}$), cholestasis (5.3 mg/dL total bilirubin [T-Bil], 2.3 mg/dL direct bilirubin [D-Bil], 27 IU/L γ -glutamyltransferase

Correspondence: Dr Tomoyuki Tsunoda, 3-6-1 Shimosueyoshi, Tsurumi, Yokohama 230-8765, Japan. Email: ttsunoda1982@yahoo.co.jp

Conflict of interest: A. I. received lecture fees from Merck Sharp and Dohme. T. F. received lecture fees from Merck and Astellas Pharma. We have no other conflicts of interest and no financial relationships to disclose.

Received 16 April 2014; revision 18 June 2014; accepted 23 June 2014.

[γ -GT]) and mildly elevated transaminases (142 IU/L aspartate aminotransferase [AST], 15 IU/L alanine aminotransferase [ALT]). Cholestasis progressively worsened and, on day 5, he was referred to our hospital.

On admission, our 5-day-old patient showed mild lethargy and poor sucking. His liver and spleen were palpable 2 cm under the costal margin. Blood tests on admission showed 2.1 g/dL albumin, $8.3 \times 10^4/\mu\text{L}$ platelets, 151 IU/L AST, 25 IU/L ALT, 15.2 mg/L T-Bil, 4.0 mg/dL D-Bil, 27 IU/L γ -GT, 53.9 μM total bile acids and 1.66 prothrombin time international normalized ratio. Transferrin saturation was high, at 95%, with ferritin and total iron-binding capacity concentrations of 1521 ng/mL and 152 $\mu\text{g}/\text{dL}$, respectively. Metabolic screening by tandem mass spectrometry was used to determine the composition of plasma/urine organic acids and amino acids and his acylcarnitine profile. The only abnormality detected was an elevated serum tyrosine concentration (684.3 nmol/mL). Succinylacetone, however, was absent from urine, excluding a diagnosis of tyrosinemia. Cultures of blood and urine were negative. TORCH (toxoplasmosis, other [syphilis], rubella, cytomegalovirus, herpes simplex virus) and other viral infections (hepatitis B virus, hepatitis C virus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 6, enterovirus, adenovirus and parvovirus B19) were excluded serologically and/or by real-time polymerase chain reaction. Bone marrow examination was normal, excluding hemo-

phagocytic syndrome and hematological malignancy. Bile acid assays of plasma and urine revealed increased levels of Δ^4 -3-oxo-type bile acids in urine (53.5%) and their presence in serum, indicating reduced activity of the enzyme Δ^4 -3-oxo-steroid 5 beta-reductase, consistent with findings in other patients with NH.³ However, sequencing of the *SRD5B1* gene in genomic DNA from peripheral lymphocytes showed no known mutations.⁴ Liver ultrasound showed slightly irregular surfaces and dull edges. The internal structure was rough and liver and kidney contrast was normal. Ascites was detected. Although NH was highly suspected, computed tomography and magnetic resonance imaging (MRI) failed to demonstrate iron deposition in the liver or extrahepatic tissue (Fig. 1). Lip biopsy revealed no iron deposition in the salivary glands. Liver biopsy could not be performed because of coagulopathy.

Although iron deposition in extrahepatic tissue was not demonstrated, evidence of antenatal liver failure, intrauterine growth retardation and high serum ferritin concentrations strongly suggested that NH was the cause of liver failure. Moreover, none of our findings suggested any other condition, such as infection, metabolic or hematological diseases. He was treated for 15 days with exchange blood transfusion, consisting of high-dose (1 g/kg) i.v. immunoglobulin (IVIg), 100 mg/kg acetylcysteine i.v., 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ selenium, 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per h prostaglandin-E1 and 25 IU/kg vitamin E, but his liver



Figure 1 Computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) findings in our patient. Attenuation of the liver was not increased on CT and the intensity of the liver signal was not low on MRI T₂-weighted images. Neither suggested iron deposition in the liver or extrahepatic tissue. (a) CT plain. (b) CT contrasted. (c) MRI T₁-weighted image. (d) MRI T₂-weighted image.

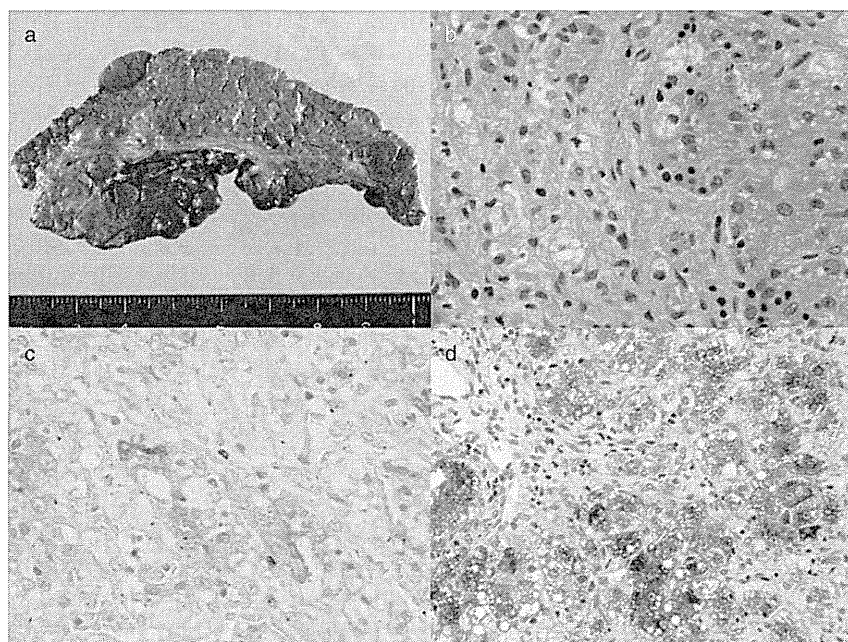


Figure 2 Histopathology of the explanted liver from our patient. (a) Multiple nodules on the liver surface and a divided face. (b) Disturbance of the lobular architecture, with severe fibrosis and marked loss of hepatocytes. Inflammation was minimal (hematoxylin–eosin, original magnification $\times 400$). (c) Faint iron staining of hepatocytes (Berlin blue, $\times 400$). (d) Residual hepatocytes were strongly positive for the Cb5-9 complex immunohistochemically ($\times 400$).

function did not improve. At age 19 days, a liver transplant was performed. The liver was obtained from a deceased 30-year-old male, with 138 g (graft/recipient weight ratio, 5.1 %) of the split allograft transplanted to the patient.

Pathological examination of the explanted liver showed cirrhosis with the formation of multiple micro- and macronodules. The liver architecture was deformed with marked pseudo-lobular formation and smaller numbers of hepatocytes were isolated with massive fibrous septa. Regenerative nodules were present. Inflammatory cell infiltration was minimal. Bile pigments and plugs were observed in all areas, indicating severe cholestasis. Granules faintly positive for Berlin blue staining were scattered among a few hepatocytes. Immunohistochemical staining with murine monoclonal anti-human SC5b-9 (QUIDEL, San Diego, CA, USA) showed strong staining for the C5b-9 complex in 80% of the residual hepatocytes (Fig. 2d). The activities of the mitochondrial respiratory chain complexes in the explanted liver tissue were normal, and congenital mitochondrial respiratory chain disorders were excluded.

Postoperatively, the patient received immunosuppressive therapy with prednisolone and tacrolimus. Acute cellular rejection was not observed. His liver chemistry tests were normal, and he was discharged 82 days after transplantation.

DISCUSSION

ACUTE LIVER FAILURE in the neonatal period is rare, but its etiology is diverse. Early diagnosis and treatment is essential but limitations of examinations due to neonatal physical immaturity can be an obstacle for adequate evaluation and management, and therefore the mortality rate is still high. Causes of neonatal liver failure include infections, metabolic defects, NH and hematological disorders. NH is a rare antenatal liver failure, associated with secondary iron deposition in liver and extrahepatic tissues such as the pancreas and heart. Its unique pattern of high recurrence in siblings of the same mother, not the father, suggests a maternofetal alloimmune mechanism rather than a hereditary condition.⁵ Hereditary hemochromatosis (HH) also causes iron deposition in tissue but HH is caused by defects of iron metabolism with autosomal recessive inheritance, and is therefore an entirely different disease from NH. Treatments for NH are IVIG, exchange transfusion and cocktail therapy containing an iron chelator and antioxidants.^{1,6} Liver transplant is performed on those who fail to respond to medical therapy. Recent accumulating data demonstrates that IVIG administration for women during pregnancy with proven NH of recent gestation can prevent severe recurrence of NH.⁷ This preventive method is based on the hypothesis of a gestational

alloimmune mechanism of NH; therefore, the efficacy of this treatment supports the hypothesis.

At birth, our patient showed signs of liver failure, including cholestasis, hypoglycemia and thrombocytopenia, suggesting that the onset of disease was antenatal. NH is one well-known cause of antenatal liver failure.⁸ One of the most important diagnostic criteria for NH is the demonstration of extrahepatic iron deposition.¹ However, the mechanism underlying iron deposition remains unclear. Recent findings have shown that iron overload does not result from an inborn error of iron metabolism but from fetal liver injury.^{9,10}

Whittington *et al.* proposed an alloimmune mechanism of NH.¹¹ A maternal immunoglobulin G alloantibody against an alloantigen expressed by fetal hepatocytes may pass through the placenta, with the subsequent antigen–antibody reaction activating the classical complement pathway in fetuses. This, in turn, produces the membrane attack complex (C5b-9 immune complex), which causes hepatocyte injury. Immunohistochemical staining with antibody against the C5b-9 immune complex is strongly positive in the hepatocytes of patients with NH, indicating that congenital alloimmune hepatitis is the etiology in most or all patients with NH.²

In our patient, neither MRI nor lip biopsy demonstrated extrahepatic tissue siderosis. The MRI and lip biopsy each have approximately 60% sensitivity for detecting extrahepatic siderosis and negative tests do not exclude NH.⁵ However histopathology of liver showed only weak iron deposition in hepatocytes, atypical in patients with NH. In contrast, the finding of the C5b-9 complex in hepatocytes strongly indicates that an alloimmune disease process was the cause of liver failure. Debra *et al.* reported a similar case of neonatal liver cirrhosis.¹² This case showed no iron deposition in both liver and extrahepatic tissue, C5b-9 was strongly positive in hepatocytes. C5b-9 complex was initially demonstrated as a specific histological marker of NH and proposed the gestational alloimmune mechanism of its pathogenesis.² Therefore, these cases without extrahepatic iron deposition suggested that siderosis of the liver or extrahepatic tissue may be a phenotypic difference within the same spectrum of gestational alloimmune liver diseases.

Whittington *et al.* suggested a term “gestational alloimmune liver disease” (GALD) for liver injury due to this alloimmune mechanism and the term “gestational alloimmune liver injury” should replace the term “neonatal hemochromatosis”.^{5,12} Our case also demonstrated that GALD can occur even in cases of neonatal liver

failure without extrahepatic iron deposition. The iron deposition in extrahepatic tissue is just a phenotypic difference of GALD and those who show strong iron deposition in the extra hepatic tissue may have been diagnosed with NH among GALD cases. Therefore, as Whittington *et al.* pointed out, NH is a phenotype-based terminology and neonatal liver injury due to a gestational alloimmune mechanism is to be comprehensively called GALD.

In patients who present with antenatal liver failure but who do not meet the criteria for NH, gestational alloimmune liver disease should be differentiated as a cause of liver failure. C5b-9 staining of liver tissue is helpful for diagnosis but often difficult because of coagulopathy. Treatment should be initiated concurrently with diagnosis and exchange transfusion or immunoglobulin is theoretically effective for alloimmune diseases.^{5,6} Our patient did not respond well to exchange transfusion or immunoglobulin therapy but was successfully treated with liver transplantation.

In conclusion, gestational alloimmune liver disease should be suspected in neonates with antenatal liver disease, even in the absence of obvious iron deposition. Liver transplantation is indicated in a patient refractory to exchange transfusion and immunoglobulin therapy. Additional studies are needed to understand how fetal hepatocytes are recognized as an antigen in the maternal immune system and to identify the causes of phenotypical clinical differences.

ACKNOWLEDGMENTS

WE THANK DR Takayanagi for investigation of metabolic abnormalities and Dr Nittono for bile acid analysis of the patient. We also thank the parent of the patient for allowing the publication of this case report.

REFERENCES

- 1 Rodrigues F, Kallas M, Nash R *et al.* Neonatal hemochromatosis – medical treatment vs. transplantation: the King’s experience. *Liver Transpl* 2005; 11: 1417–24.
- 2 Pan X, Kelly S, Melin-Aldana H, Malladi P, Whittington PF. Novel mechanism of fetal hepatocyte injury in congenital alloimmune hepatitis involves the terminal complement cascade. *Hepatology* 2010; 51: 2061–8.
- 3 Shneider BL, Setchell KD, Whittington PF, Neilson KA, Suchy FJ. Delta 4-3-oxosteroid 5 beta-reductase deficiency causing neonatal liver failure and hemochromatosis. *J Pediatr* 1994; 124: 234–8.

- 4 Ueki I, Kimura A, Chen HL *et al.* SRD5B1 gene analysis needed for the accurate diagnosis of primary 3-oxo-Delta4-steroid 5beta-reductase deficiency. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 776–85.
- 5 Whittington PF. Gestational alloimmune liver disease and neonatal hemochromatosis. *Semin Liver Dis* 2012; 32: 325–32.
- 6 Rand EB, Karpen SJ, Kelly S *et al.* Treatment of neonatal hemochromatosis with exchange transfusion and intravenous immunoglobulin. *J Pediatr* 2009; 155: 566–71.
- 7 Whittington PF, Hibbard JU. High-dose immunoglobulin during pregnancy for recurrent neonatal haemochromatosis. *Lancet* 2004; 364: 1690–8.
- 8 Durand P, Debray D, Mandel R *et al.* Acute liver failure in infancy: a 14-year experience of a pediatric liver transplantation center. *J Pediatr* 2001; 139: 871–6.
- 9 Hoogstraten J, de Sa DJ, Knisely AS. Fetal liver disease may precede extrahepatic siderosis in neonatal hemochromatosis. *Gastroenterology* 1990; 98: 1699–701.
- 10 Whittington PF. Fetal and infantile hemochromatosis. *Hepatology* 2006; 43: 654–60.
- 11 Whittington PF, Malladi P. Neonatal hemochromatosis: is it an alloimmune disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 544–9.
- 12 Debray FG, deHalleux V, Guidl O *et al.* Neonatal liver failure without iron overload caused by gestational alloimmune liver disease. *Pediatrics* 2012; 129: e1076–9.

乳児難治性下痢症

intractable diarrhea of infancy

虫明聡太郎 近畿大学教授・小児科学(奈良病院)

病態

- ・狭義には、生後3か月未満で発症し、便培養で原因菌が検出されず、治療を行っても2週間以上下痢が遷延して栄養発育が損なわれ、明らかな原因が特定されないものが乳児難治性下痢症とされる。
- ・現在では、乳児早期に頻回の下痢をもって発症し、経腸栄養(EN)・経静脈栄養(PN)による管理を必要とする重症な下痢を「遷延性下痢症」とよび、さらに長期にわたりPNからの離脱が困難なケースに対して「難治性下痢症」が用いられる。
- ・原因としては、感染性腸炎を契機とする腸炎後症候群が多い。その基本病態は二次性の二糖類分解酵素活性低下や食物抗原に対するアレルギーが関与して起こる浸透圧性下痢である。
- ・糖質や電解質のトランスポート障害や消化酵素の欠損、腸管上皮の形成異常による先天性下痢症、免疫、内分泌・代謝異常に伴う症候性下痢の鑑別が重要である(表1)。

治療方針

難治性下痢症の治療は、初期の腸管安静と経静脈栄養、それに続く確な経腸栄養の併用と移行にある。難治性下痢症では刷子縁酵素の活性低下や粘膜上皮の障害が進んでいるため、回復には腸管の完全な安静期間が必要である。数日の絶食期間をとって、この間に便性を観察し便電解質や浸透圧の評価を行う。重症例では絶食期間を1週間以上とるべきである。分泌性下痢の病態では絶食による便性の改善が得られない。この間は脱水・電解質異常や低血糖をきたさないよう経静脈的な補助管理に努める。

A 経腸栄養

二糖類分解酵素による消化を経て吸収され

表1 先天性・症候性下痢の成因

1. 吸収・輸送障害
 - 先天性クロール下痢症
 - 先天性ナトリウム下痢症
 - グルコース・ガラクトース吸収不全症
 - 果糖吸収不全症
 - 脛嚢胞性線維症
2. 消化酵素の異常
 - 乳糖不耐症(先天性)
 - ショ糖・麦芽糖吸収不全症
 - エンテロキナーゼ欠損症
 - リパーゼ欠損症
3. 形成異常
 - 微絨毛封入体病(microvillus inclusion disease)
 - 小腸上皮異形成症(tufting enteropathy)
4. 免疫異常
 - 自己免疫性腸症
 - IPEX 症候群
5. 内分泌・代謝異常
 - 消化管カルチノイド, VIP 産生腫瘍
 - ミトコンドリア呼吸鎖異常症

る乳糖やショ糖は下痢を悪化させるが、糖質としてブドウ糖のみを使用した経口補水飲料(OS-1 など)は悪化させないため、一定の評価を終えたあとは絶食期間中にも与えてよい(白湯 500 mL に塩 1.5 g, ブドウ糖 10 g で代替できる)。

腸管安静で下痢の改善が得られたら、乳糖除去・蛋白加水分解乳(ニュー MA-1, ミルフィー HP, ペプディエットなど)を1/2程度の濃度で少量から摂取させ、便性をみながら濃度・量を上げていく。再び下痢の悪化がみられる場合は、再度腸管安静期間をとって成分栄養剤(ED; エレンタール P, エレメンタールダイエット)を使用する。EDは通常濃度では浸透圧負荷となるため、経鼻胃管(嘔吐しやすい場合は経腸チューブ)を用いて低濃度・低流量で持続注入を開始する。経静脈輸液を併用し、必須脂肪酸補給とカロリーアップのため脂肪乳剤の静注を週2回程度行う。便回数と便性をみながら数日ごとに経腸栄養の濃度、流速を交互に漸増する。4~8週かけて20%調製, 0.75 kcal/mL, 110~

130 kcal/kg/日を目標に増量し、その過程で体重増加が得られ、便性が安定すれば間欠的投与に移行する。

その後は蛋白加水分解乳への移行を考慮してもよいが、下痢を再燃させる可能性がある。月齢によっては初期離乳食(重湯、粥、野菜裏ごし)を進めるほうが無難である。

Px 処方例 体重 5 kg の場合。下記①、②を併用する。

(経腸栄養の導入と増量)

- ① エレンタール P (10%調製, 0.38 kcal/mL)
1日 150 mL (6 mL/時) 24 時間かけて持続注入から開始。調製濃度は 1~2%, 流速は 5 mL/時から漸増

(脂肪乳剤)

- ② 10%イントラリピッド注(10%) 5~10 mL/kg 3~5 時間かけて静注 週 2~3 回

B 経静脈栄養

高度の栄養障害を呈している症例や、経腸栄養による必要十分な蛋白・アミノ酸の摂取が得られない状態が続く難治例では、中心静脈カテーテルを留置して間欠的高カロリー輸液を行う。

C 薬物療法

腸内細菌叢の補助を目的としてプロバイオティクスの併用を行う。止痢薬としてはアドソルビン、ロペラミドが有用なことがある。ロペラミドは生後 6 か月未満の乳児には禁忌である。

Px 処方例

(プロバイオティクス)

- ① ミヤ BM 顆粒, ビオラクチス散, ビオフェルミン配合散のいずれか いずれも 1日 0.1~0.2 g/kg (成分量として) 1日 3 回に分けて

(止痢薬)

- ② アドソルビン末 1日 0.1 g/kg (成分量として) 1日 3 回に分けて
③ ロペミン小児用細粒 1日 0.03~0.06 mg/kg (成分量として) 1日 3 回に分けて

蛋白漏出性胃腸症

protein losing enteropathy

萩原真一郎 埼玉県立小児医療センター・総合診療科医長

病態

・蛋白が腸管壁から管腔内へ漏出し、低蛋白血症をきたす症候群である。原因は、次の 3 つに大別される。

a) 粘膜びらんや潰瘍による炎症性滲出〔炎症性腸疾患、消化管悪性腫瘍、偽膜性腸炎、胃潰瘍、化学療法後、移植片対宿主病 (GVHD) など〕。

b) リンパ管閉塞によるリンパ液喪失〔腸管リンパ管拡張症、右心不全、リンパ管腫瘍、Fontan (フォンタン) 手術後など〕。

c) びらんや潰瘍を伴わない粘膜病変による透過性亢進〔セリアック病、Menetrier (メネトリエ) 病、消化管感染症、膠原病、消化管アレルギー、好酸球性胃腸症、アレルギー性紫斑病、里吉病など〕。

低蛋白血症により、浮腫・腹水・胸水がみられる。時に、下痢や腹痛などの消化器症状や免疫グロブリン喪失による易感染性などの症状が出現する。

治療方針

疾患ごとに病態が異なるため、原因疾患に応じた治療、対症療法が基本となる。

A 栄養療法

経口摂取が可能な場合は低脂肪・高蛋白食を与える。リンパ流の異常がある場合、中鎖脂肪酸 (MCT) が、門脈に直接入りリンパ内圧上昇をきたさないことから有用である。消化管安静が必要な場合や低栄養が著明な場合は、成分栄養剤や高カロリー輸液を使用する。長期例では、必須脂肪酸の欠乏予防のため経静脈的な脂肪製剤 (イントラリポス 0.4~2 g/kg/日) を行う。また微量元素製剤の投与も考慮する。

B 薬物療法

病態に応じて下記の薬物を適宜投与する。

Original Article

Successful treatment with 4-phenylbutyrate in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 refractory to biliary drainage and bilirubin absorption

Hisamitsu Hayashi,^{1*} Sotaro Naoi,^{1*} Yu Hirose,^{1*} Yusuke Matsuzaka,¹ Ken Tanikawa,² Koji Igarashi,³ Hironori Nagasaka,⁴ Masayoshi Kage,² Ayano Inui,⁵ and Hiroyuki Kusunaga¹

¹Laboratory of Molecular Pharmacokinetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, ²Department of Diagnostic Pathology, Kurume University Hospital, Kurume, ³Bioscience Division, Reagent Development Department, TOSOH, Ayase, ⁴Department of Pediatrics, Takarazuka City Hospital, Takarazuka, and ⁵Department of Pediatric Hepatology and Gastroenterology, Saiseikai Yokohamashi Tobu Hospital, Yokohama, Japan

Aim: Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 (BRIC2) is caused by mutations in *ABCB11*, a gene encoding the bile salt export pump (BSEP) that mediates biliary bile salt secretion, and presents with repeated intermittent cholestasis with refractory itching. Currently, no effective medical therapy has been established. We previously provided experimental and clinical evidence suggesting the therapeutic potential of 4-phenylbutyrate (4PB) for the cholestatic attacks of BRIC2.

Methods: After examining the potential therapeutic use of 4PB treatment by *in vitro* studies, a patient with BRIC2 was treated p. o. with 4PB at gradually increasing doses (200, 350, and 500 mg/kg per day) for 4 months. Biochemical, histological and clinical data were collected.

Results: The patient was diagnosed with BRIC2 because he had non-synonymous mutations (c.1211A>G [p.D404G] and 1331T>C [p.V444A]) in *ABCB11*, reduced hepatocanalicular expression of

BSEP and low biliary bile salt concentrations. *In vitro* analysis showed that 4PB treatment partially restored the decreased expression of BSEP caused by p.D404G mutation. During the first 2 months of 4PB therapy at 200 and 350 mg/kg per day, the patient had no relief from his symptoms. No beneficial effect was observed after additional treatment with bilirubin absorption and endoscopic nasobiliary drainage. However, after starting treatment at a dose of 500 mg/kg per day, the patient's liver function tests and intractable itching were markedly improved. No apparent side-effects were observed during or after 4PB therapy. The symptoms relapsed within 1.5 months after cessation of 4PB therapy.

Conclusion: 4PB therapy would have a therapeutic effect on the cholestatic attacks of BRIC2.

Key words: benign recurrent intrahepatic cholestasis, bile salt export pump, intrahepatic cholestasis, 4-phenylbutyrate

INTRODUCTION

FAMILIAL CHOLESTATIC LIVER disease comprises a variety of clinically and genetically heterogeneous

Correspondence: Dr. Hisamitsu Hayashi, Laboratory of Molecular Pharmacokinetics, Department of Medical Pharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. Email: hayapi@mol.f.u-tokyo.ac.jp
*These authors contributed equally to this work.

Author contribution: H. H. designed and supervised all of the research and took a lead role in writing the manuscript. S. N., Y. H. and Y. M. carried out the *in vitro* experiments and contributed to data interpretation. A. I. recruited and enrolled the patient, collected specimens from the patient, carried out clinical assessment and follow up and revised the manuscript for intellectual content. K. T. and M. K. performed histological analysis. K. I. measured ATX concentration. H. N. and H. K. revised the manuscript for intellectual content.

Received 15 May 2015; revision 10 July 2015; accepted 21 July 2015.

disorders. Benign recurrent intrahepatic cholestasis (BRIC), a rare inherited autosomal recessive liver disease, is characterized by intermittent episodes of intrahepatic cholestasis with normal serum γ -glutamyltransferase (γ -GT) activity, refractory pruritus and jaundice.^{1–3} In contrast to progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC), which progresses to severe cholestasis with sustained intractable itching, jaundice, diarrhea and failure to thrive, leading to liver failure in the first year of life,^{1–3} in most cases of BRIC, the symptoms last from weeks to months, but resolve spontaneously without progressing to liver failure.² However, a reduction in the number and duration of the attacks is highly desirable, because intractable itching accompanied by cholestasis disrupts patients' activities of daily living and their ability to sleep, making the patients disabled and depressed, and consequently decreases their

quality of life and that of their families. There are case studies of medical therapy for cholestatic attacks in BRIC patients with rifampicin, cholestyramine and corticosteroids, and of invasive therapy with nasobiliary drainage (NBD).⁴⁻⁹ However, all of these treatments are symptomatic therapy only, because of the lack of understanding of the molecular mechanism underlying intrahepatic cholestasis in BRIC, and inconsistent results have been reported for each treatment.²⁻⁴

Benign recurrent intrahepatic cholestasis is subdivided into BRIC type 1 (BRIC1) and BRIC type 2 (BRIC2) based on the causal genes. BRIC1 and BRIC2 are caused by mutations in *ATP8B1* and *ABCB11*, respectively, which encode a member of the P4 subfamily of P-type adenosine triphosphatases and the bile salt export pump (BSEP).^{10,11}

BSEP is an adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette transmembrane transporter located on the canalicular membrane (CM) of hepatocytes, which mediates the biliary excretion of monovalent bile salts.¹²⁻¹⁵ Therefore, although no direct evidence has been provided, it is suspected that during the cholestatic episodes in BRIC2 patients, biliary bile salt secretion and the resultant bile flow formation are impaired because of the decreased function of BSEP, leading to accumulation in the body of bile constituents, probably including pruritogens.

We have published experimental evidence that 4-phenylbutyrate (4PB), a drug used to treat ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD), has an additional newly identified pharmacological effect that increases the hepatocanalicular expression of BSEP and the capacity for biliary excretion of bile salts by hepatocytes.¹⁶⁻¹⁸ Furthermore, our group and Gonzales *et al.* reported recently that 4PB therapy restored decreased BSEP expression, improved liver functions and relieved intractable pruritus in patients with PFIC2, a subtype of PFIC caused by mutations in *ABCB11*.^{19,20} These results indicate the possibility that 4PB therapy may also be effective for the cholestatic attacks in a majority of BRIC2 patients, because all BRIC2-type mutations studied so far reduce the cell surface expression of BSEP, but not the transport activity of BSEP per se.^{21,22}

The present study provides the first direct clinical evidence that a patient with BRIC2 actually presented with impaired bile salt secretion into bile during a cholestatic attack because of lessened expression of BSEP at the CM of hepatocytes. To test the therapeutic potency of the 4PB therapy, the patient was treated p.o. with 4PB at gradually increasing doses (200, 350 and 500 mg/kg per day) for 4 months and then followed for 8 months after the therapy. We collected and analyzed data on serum liver tests, histology and the clinical course for this patient. This is

the first report to investigate the therapeutic effect of the 4PB treatment on cholestatic attack in a patient with BRIC2.

METHODS

WE OBTAINED APPROVAL for the study from the institutional ethics review boards. Informed consent was provided by the patient's parents before assessment because the patient was under 18 years of age. All materials and methods used standard techniques and commercially available reagents. A detailed description of the materials and methods is presented in the online supporting information.

Case report

The patient, a Japanese boy who is currently aged 16 years old, was born normally to healthy parents with no clinically documented consanguinity. He had no cholestatic episode in the newborn period, was entirely healthy and developed normally. He experienced the first cholestatic episode with jaundice and intractable itching at the age of 9 months, which was preceded by the appearance of cutaneous pruritus. No apparent symptomatic relief was provided by treatment with ursodeoxycholic acid (UDCA), cholestyramine, phenobarbital and fat-soluble vitamins. Parameters of liver function tests were elevated except for normal γ -GT activity. Those values 6 months after onset of the cholestatic attack were 110 U/L aspartate aminotransferase (AST), 71 U/L alanine aminotransferase (ALT), 49.6 μ M total bilirubin (T-Bil), 37.6 μ M direct bilirubin (D-Bil), 20 U/L γ -GT, and 164.8 μ M total bile acids. The cholestatic episode lasted for 8 months, then gradually improved and liver function tests were normalized completely. Percutaneous liver biopsy was performed after the relief of cholestasis. Histological analysis showed intact hepatic lobular architecture, no lobular inflammation and near absence of cholestasis (data not shown). Immunohistochemical analysis showed reduced immunosignal of BSEP at the CM of hepatocytes (Fig. 1b). At age 15 years, his second cholestatic episode occurred. Blood tests on admission showed 74 U/L AST, 83 U/L ALT, 265.1 μ M T-Bil, 188.1 μ M D-Bil, 16 IU/L γ -GT and 426.1 μ M total bile acids. The clinical course in this patient is similar to that in previously reported cases, who experienced more than two cholestatic episodes and initially no signs of liver damage.¹¹

Genomic sequencing analysis of all encoding exons and flanking areas of *ABCB11* was performed and identified a heterozygous c.1211A>G (p.D404G) mutation and homozygous c.1331T>C (p.V444A) mutation in *ABCB11*

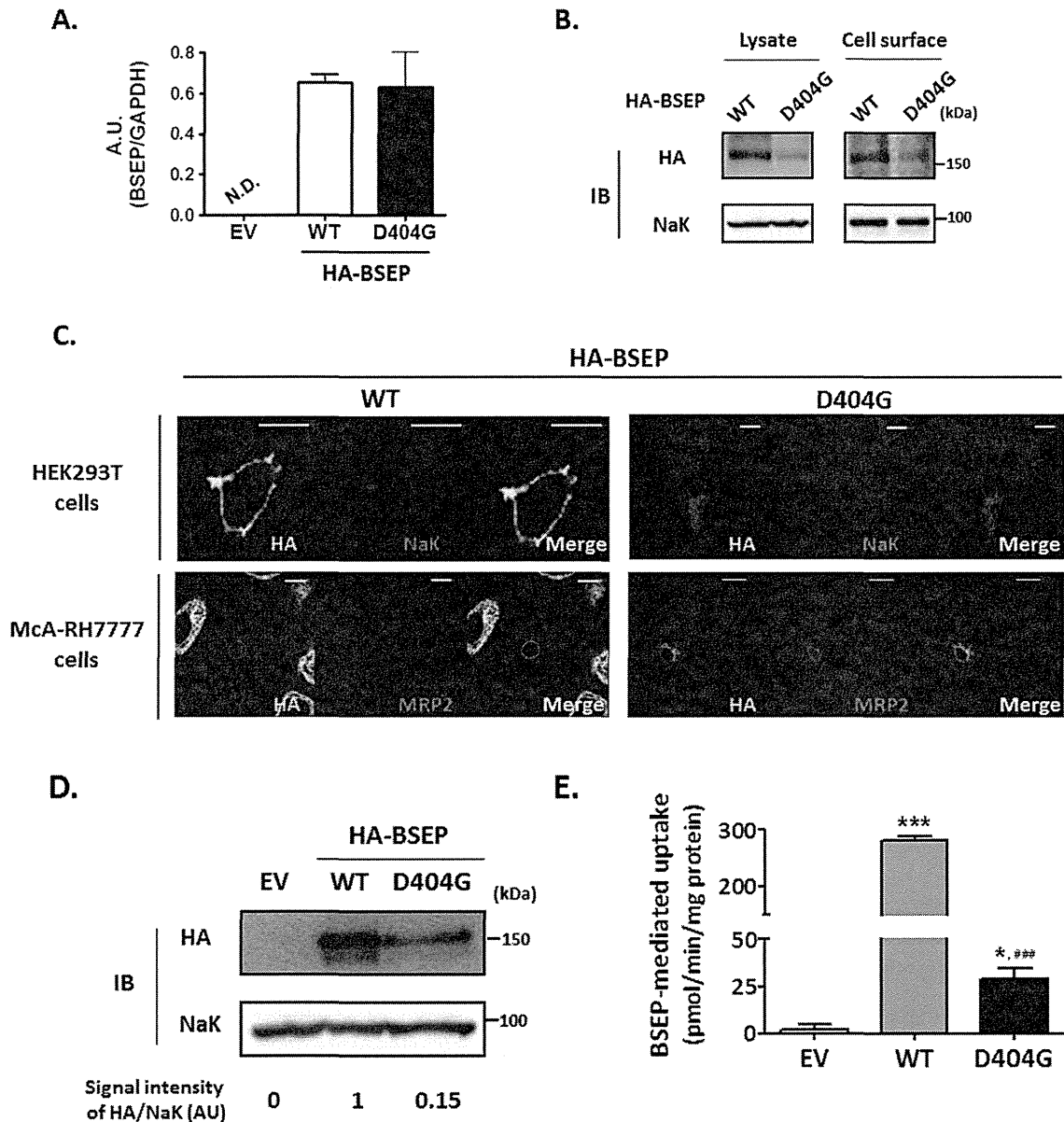


Figure 2 Characterization of c.1211A>G (p.D404G) mutation in *ABCB11*. (a,b) Determination of mRNA and protein expression levels of BSEP^{D404G}. EV, HA-BSEP^{WT} or HA-BSEP^{D404G} HEK293T cells were subjected to (a) quantitative polymerase chain reaction and (b) cell surface biotinylation, and then analyzed as described in Methods. (c) Cellular localization of BSEP^{D404G}. HEK293T cells (top) and McA-RH7777 cells (bottom) expressing HA-BSEP^{WT} (left) or HA-BSEP^{D404G} (right) were fixed and stained with the plasma membrane markers and analyzed by confocal immunofluorescence microscopy as described in Methods (scale bar, 10 μm). (d,e) BSEP^{D404G}-mediated uptake of [³H]-TC. Membrane vesicles (30 μg in [d] and 10 μg in [e]) prepared from EV, HA-BSEP^{WT} and HA-BSEP^{D404G} HEK293T cells were subjected to (d) immunoblotting and (e) an uptake assay. In (d), Image Gauge software was used to quantify the ratio of band intensities of HA-BSEP^{WT} and HA-BSEP^{D404G} relative to that of NaK. For the uptake assay, membrane vesicles were incubated at 37°C with [³H]-TC (1 μM) for 5 min in the presence of 5 mmol/L ATP or AMP. The uptake of ligand was obtained by subtracting the value in the absence of ATP from that in its presence. A representative result of two or three independent experiments is shown. Bars represent the mean ± SEM of each experiment in triplicate. **P* < 0.05 vs EV; ****P* < 0.001 vs EV; and ****P* < 0.001 vs WT. [³H]-TC, [³H]-taurocholate; AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; A.U., arbitrary units; BSEP, bile salt export pump; EV, empty vector; IB, immunoblotting; NaK, Na⁺, K⁺-ATPase α1 subunit; N.D., not detected because of low expression levels; SEM, standard error of the mean; WT, wild type.

The ATP-dependent uptake of [³H]-taurocholate ([³H]-TC) into membrane vesicles isolated from HA-BSEP^{WT} and HA-BSEP^{D404G} HEK293T cells was almost linear up to 5 min (data not shown). Its uptake value per minute was approximately 118- and 12.1-times higher in vesicles from HA-BSEP^{WT} and HA-BSEP^{D404G} HEK293T cells, respectively, than in vesicles from EV-HEK293T cells (Fig. 2e). Normalizing the BSEP expression levels in the membrane vesicles based on the results of the immunoblotting, which indicated that the expression of HA-BSEP^{WT} was 6.7-times higher than that of HA-BSEP^{D404G} (Fig. 2d), showed that the transport activity of [³H]-TC mediated per unit mass of HA-BSEP^{D404G} molecules did not differ significantly from that mediated by HA-BSEP^{WT}. Treatment for 24 h with 1 mM 4PB, a clinically relevant concentration in patients with OTCD,^{17,18,20,24} increased the cell surface expression of HA-BSEP^{WT} and HA-BSEP^{D404G} by 2.6- and 2.1-times, respectively, in HEK293T cells (Fig. 3b), without significantly changing the expression level of either mRNA (Fig. 3a). These results suggest that 4PB treatment at a clinically relevant dose for humans could increase BSEP

expression at the CM in BRIC2 patients with the c.1211A>G (p.D404G) mutation in *ABCB11* and, consequently, expand their capacity to secrete bile salts into bile. Therefore, the patient was enrolled in the intervention study to examine the therapeutic effect of 4PB on a BRIC2 patient.

Oral administration of 4PB (AMMONAPS; Swedish Orphan, Stockholm, Sweden) was started at a daily dose of 200 mg/kg per day divided into four doses. After 1 month, the dose was increased to 350 mg/kg per day and this was maintained for an additional month. Bilirubin absorption and endoscopic NBD were performed during treatment at the doses of 200 and 350 mg/kg per day, respectively. In bile specimens collected by NBD, concentrations of phosphatidylcholine and total cholesterol as well as of total bile acids in the BRIC2 patient was much lower than that of two control patients whose values were within or close to the reference range (Table 1),^{8,25} supporting the diagnosis of BRIC2 in the patient enrolled in this study. Because neither any therapeutic effect on serum liver tests and the itching score nor any side-effects were observed, the dose was increased to 500 mg/kg per day, which is a clinically

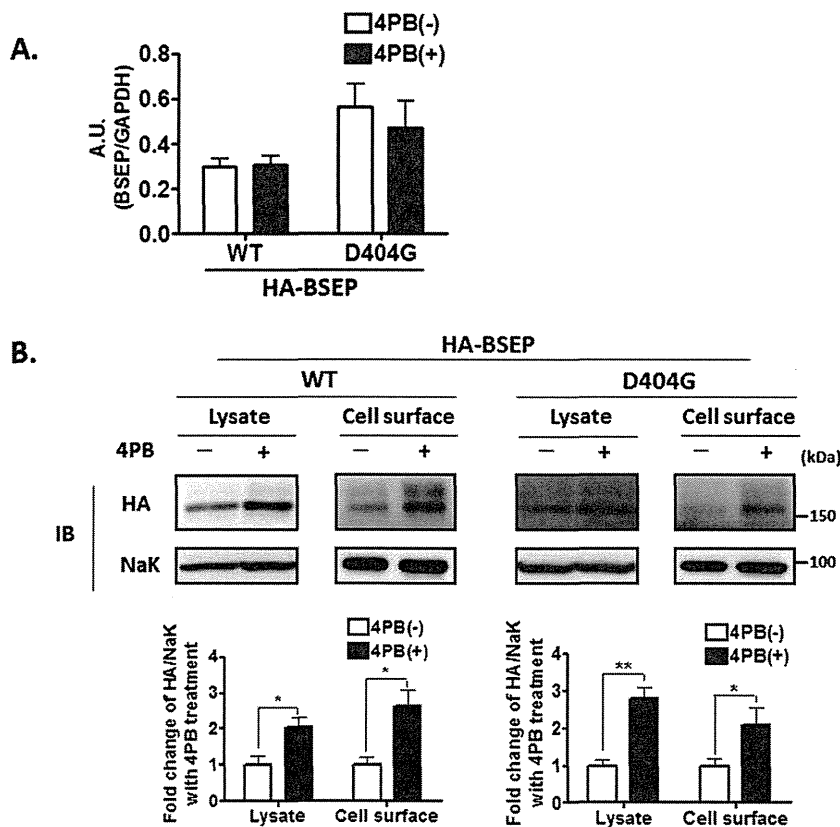


Figure 3 Effect of 4PB treatment on mRNA and protein expression levels of BSEP^{D404G}. HA-BSEP^{WT} and HA-BSEP^{D404G} HEK293T cells were treated with or without 1 mM 4PB for 24 h, subjected to (a) quantitative polymerase chain reaction and (b) cell surface biotinylation, and analyzed as described in Fig. 2(a,b). At the bottom of (b), the ratio of band intensities of HA-BSEP^{WT} and HA-BSEP^{D404G} relative to that of NaK was determined as described in Methods is shown. A representative result from two or three independent experiments is shown. Bars represent the mean ± SEM of triplicate determinations. **P* < 0.05; ***P* < 0.01. 4PB, 4-phenylbutyrate; A.U., arbitrary units; BSEP, bile salt export pump; IB, immunoblotting; NaK, Na⁺, K⁺-ATPase α1 subunit; SEM, standard error of the mean; WT, wild type.

Table 1 Biochemical analysis of bile specimens from NBD.

	Disease	BA (mM)	PC (mM)	Ch (mM)	BA (mol%)	PC (mol%)	Ch (mol%)
Patient	BRIC2	0.18	0.01	<0.04	N.D.	N.D.	N.D.
Control 1	Cholecystolithiasis	15.8	3.8	2.1	72.7	17.6	9.7
Control 2	Choledochal Cyst	20.6	4.4	1.8	76.8	16.5	6.7
	Reference values (8, 25)	21.3 ± 3.1	8.0 ± 1.8	1.1 ± 0.3	69 ± 2	22 ± 1	9 ± 1

BA, bile acids; BRIC2, benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2; Ch, cholesterol, NBD, nasobiliary drainage; N.D., not determined (because PC and CH concentrations are close to and below limit of detection, respectively); PC, phosphatidylcholine.

relevant dose for OTCD, and this dose was maintained for the next 2 months. The serum levels of AST and ALT started to decline when the dose was increased to 500 mg/kg per day. These values finally reached close to the reference range (AST, <55 U/L; ALT, <40 U/L) (Fig. 4a, upper). Consistent with the decrease in AST and ALT levels, the concentrations of T-Bil and D-Bil decreased significantly after the start of 4PB treatment at 500 mg/kg per day. Two months after this dose was started, both parameters were almost normalized to within the reference range (T-Bil, <18 μ M; D-Bil, <5 μ M) (Fig. 4a, lower). In contrast, the concentration of serum bile acids (BA) also declined, but remained above the reference range (BA, <10 μ M), probably because of the co-administration of UDCA (600 mg/day). The itching score decreased during 4PB treatment at 350 mg/kg per day (Fig. 4b). Almost complete and persistent relief of pruritus helped improve the patient's ability to sleep and thus increased his quality of life. However, the itching score did not correlate significantly with the serum levels of autotaxin (ATX) and BA (Fig. 4b), both of which have been proposed as potential pruritogens in cholestasis.²⁶

The patient was followed up after the 4PB therapy. The liver tests and itching score remained unchanged for 1.5 months after the end of 4PB therapy but gradually returned to values almost equal to those before his enrollment in this intervention study. Four months after the cholestatic attack relapsed, the liver tests and pruritus spontaneously improved (Fig. 4). No severe side-effects were observed during or after 4PB therapy. The administration of the original drugs, UDCA and fat-soluble vitamins, was maintained during and after the course of 4PB treatment.

DISCUSSION

ALL OF THE treatments currently available for the cholestatic episodes in BRIC patients are symptomatic therapy because the mechanism responsible for the intrahepatic cholestasis during the attacks is poorly

understood. Therefore, the development of a new mechanism-based medical therapy for this disease is highly desirable. Here, we provide the first direct clinical evidence that a patient with BRIC2, a subtype of BRIC caused by mutations in *ABCB11* that encodes BSEP, presented with impaired bile salt secretion into bile because of lessened expression of BSEP at the hepatocanicular membrane (Fig. 1b, Table 1) and that 4PB therapy at 500 mg/kg per day, a clinically relevant dose used in OTCD patients, markedly improved liver function tests and relieved intractable itching refractory to bilirubin absorption and NBD (Fig. 4). *In vitro* analysis in the current and previous studies showed that the patient harbored two mutations, c.1211A>G (p.D404G) and c.1331T>C (p.V444A), both of which decreased the cell surface expression and transport function of BSEP (Fig. 2)²³ and that 4PB treatment partly relieved the effect of the p.D404G mutation on BSEP (Fig. 3b). Together, these suggest that 4PB is the first mechanism-based drug that may be effective against the cholestatic attacks in patients with BRIC2. All BRIC2-type *ABCB11* mutations that have been studied decrease BSEP expression at the CM, but have less impact on the transport activity of BSEP per se (Fig. 2).^{21,22} Therefore, 4PB therapy should be effective for the cholestatic episodes in the majority of BRIC2 patients.

We cannot completely exclude the possibility that the symptomatic relief in the patient was due to spontaneous resolution rather than to the 4PB therapy. However, the fact that the liver tests and itching score exacerbated immediately after the end of the 4PB therapy and that, in general, asymptomatic periods in BRIC patients last from months to years² strongly suggests that 4PB therapy relieved the cholestatic episode in this patient with BRIC2, which was refractory to the medical and invasive therapy proposed by previous studies as optional treatments for BRIC.^{4,7,9}

How the 4PB therapy improved the results of liver function tests in this study is not fully understood. We previously provided experimental evidences indicating that 4PB treatment decreased the ubiquitination of cell