

博士論文

胆道閉鎖症におけるオキシステロールの有用性

小西健一郎

目次

1. 要旨	4
2. 略語一覧	5
3. 序文	
3.1 胆道閉鎖症(Biliary Atresia: 以下 BA)の病態	6
3.2 BA の診断	7
3.3 BA の治療および予後	9
3.4 BA とオキシステロール	11
3.5 BA と胆汁酸	14
4. 目的	17
5. 方法	
5.1 研究デザイン	18
5.2 対象	20
5.3 オキシステロールの測定法	21
5.3.1 オキシステロール測定における血清検体の前処理	22
5.3.2 オキシステロール測定における尿検体の前処理	24
5.3.3 LC/MS システムによるオキシステロールの分析方法	26
5.4 胆汁酸の測定法	

5.4.1	胆汁酸測定における血清検体の前処理	33
5.4.2	胆汁酸測定における尿検体の前処理	34
5.5	血液生化学検査	36
5.6	統計学的解析	37
6.	結果	
6.1	患者背景	38
6.2	オキシステロール	
6.2.1	血清オキシステロール	40
6.2.2	尿中オキシステロール	47
6.3	ROC 解析	55
6.4	胆汁酸	
6.4.1	血清胆汁酸	60
6.4.2	尿中胆汁酸	65
6.5	相関解析	70
7.	考察	77
8.	結論	86
9.	引用文献	87
10.	謝辞	100

1. 要旨

小児胆汁うっ滞性疾患の中でも胆道閉鎖症 (Biliary Atresia: 以下 BA) の確定診断には手術が必要であり、非侵襲的な診断マーカーが望まれる。本研究では、生後 6 か月未満の胆汁うっ滞性疾患 24 例 (BA14 例、胆汁うっ滞コントロール (Non-BA) 10 例)、健常児 (HC) 10 例の血清および尿を用い、酸化コレステロールであるオキシステロール 7 種を LC/MS で分析比較した。BA、Non-BA の総オキシステロールは、血清・尿ともに HC より有意に高かった。BA は Non-BA と比較して尿中 22(R)-hydroxycholesterol (HCoI)、25-HCoI、27-HCoI が有意に高かった (中央値 ; 最小-最大、22(R)-HCoI: 36.2; 6.1-155.0 vs. 12.9; 2.7-75.9、 $P < 0.05$ 、25-HCoI: 0.6; 0-5.5 vs. 0; 0-0.5、 $P < 0.01$ 、27-HCoI: 3.6; 0.4-11.1 vs. 0.7; 0-5.6、 $P < 0.01$)。ROC 解析では尿中 27-HCoI の AUC が 0.83 と最も高かった。胆汁うっ滞性疾患の中から BA を診断するうえで、尿中 27-hydroxycholesterol の有用性が示唆された。

2. 略語一覽

BA	Biliary atresia
γ -GTP	γ -glutamyltransferase
MMP-7	Matrix Metalloproteinase-7
CA	cholic acid
CDCA	chenodeoxycholic acid
Non-BA	Non-BA cholestasis
HC	Healthy control
ROC	Receiver operating characteristics
LC/MS	Liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry
MRM	Multiple reaction monitoring
G	Glyco
T	Tauro
3S	3-Sulfate
ALT	alanine aminotransferase
AUC	area under the curve
C4	7 α -Hydroxy-4-choesten-3-one

3. 序文

3.1. 胆道閉鎖症の病態

胆道閉鎖症 (Biliary Atresia: 以下 BA) は、1 万人に 1 人の発生率であり、新生児から乳児早期に不可逆的な胆管閉塞をきたす胆汁うっ滞性疾患である。肝内および肝外の胆管に炎症性変化が起こり、線維性に変性・閉塞する。非常に強い肝線維化をきたすことが知られているが、その病因、病態は不明である。これまで、原因検索として、ウイルス(ロタウイルス・サイトメガロウイルス[1])、環境因子 (ビリアトレズン[2])、発生異常 (胎児期胆管形成における Ductal plate malformation[3])、遺伝子異常 (胆管上皮の繊毛運動異常[4])、免疫異常 (新生児特有の過剰な免疫反応による胆管上皮障害[5]) などの様々な因子が検討されてきた。しかし、原因は明らかになっていない[6,7]。

3.2. BA の診断

BA の確定診断は開腹手術または腹腔鏡手術下の術中胆道造影によってなされ、侵襲性の高い手術を必要とすることが重要な問題点である。欧米では診断に経皮的肝針生検を用いる施設もあるが[7]、本邦では手術による胆道造影で確定診断を行うのが一般的である。患者は新生児・乳児検診や自宅で黄疸や白色便に気付かれることを契機に、病院を受診する。BA の鑑別疾患は多く、一過性新生児乳児胆汁うっ滞症（新生児肝炎）や母乳性黄疸、Alagille 症候群などがある。これらを鑑別するために、血液生化学検査を含む多くの検査を必要とする。血液生化学検査では、直接ビリルビン値、 γ -glutamyltransferase (γ -GTP) 値、リポプロテイン X 値などを評価する。腹部超音波検査で、胆嚢の形態、総胆管・肝管・肝内胆管の有無、肝門部における肝動脈前方の高信号領域である triangular cord sign の有無を評価する。その他の検査として、胆道シンチグラフィによるトレーサーの排泄状況や十二指腸液採取検査によるビリルビン・胆汁酸の十二指腸への排出有無を評価する。しかし、これらの検査を行っても、確定診断に至ることはできず、完全に否定できない場合は手術による胆道造影を行う。そこで、BA を簡便かつ早期に診断できる非侵襲的なバイオマーカーの存在が望まれるが、現状で確立されたものは存在しない。

これまで、血清マーカーとして γ -GTP、hyaluronic acid、apolipoprotein C3、

macrophage inflammatory protein-3 α 、interleukin-6、interleukin-8、interleukin-33、micro RNAs (miR-140-3p、miR-200b/429、miR-4429、miR-4689) など、尿中マーカーとして N-acetyl-D-mannosamine、 α -aminoadipic acid、硫酸抱合型胆汁酸、その他に便中二次胆汁酸、十二指腸液中胆汁酸といった様々な代謝物や蛋白が検討されてきた[8-24]。近年、大規模プロテオミクス手法により、血清 Matrix Metalloproteinase-7 (MMP-7) が BA 診断の新たなバイオマーカーとして報告された。血清 MMP-7 は、BA の診断バイオマーカーとして、北米の population で感度 97%・特異度 91%と報告された[25]。その後、再現性を確認した中国と台湾の population でも、それぞれ感度 98%・特異度 95%、感度 97%・特異度 83%と非常に高く、有用性が報告された[26-28]。しかし、それぞれの報告で cut off 値が大きく異なっており、人種間の違いが示唆されている。現時点で、日本人に使用した報告はなく、実用化においては慎重になる必要がある。血清 MMP-7 の様に有用な可能性が高い診断バイオマーカーの報告はあるものの、本邦において単独で十分に BA と他の胆汁うっ滞性疾患を鑑別でき、現時点で実用化に至っているバイオマーカーは存在しない。本邦で使用できる非侵襲的な BA の診断バイオマーカーの探索が望まれる。

3.3. BA の治療および予後

救命には乳児早期に外科的治療が必要となる。1950 年代に葛西らが考案した肝門部空腸吻合術(葛西手術)が一般的に行われる。葛西手術の術式は、線維性に変性・閉塞した肝外胆管を切除する。そして、肝門部に増生している微小胆管を開放し、胆汁うっ滞の解除を図る。開放された肝門部の微小胆管を空腸で覆うように Roux-Y で吻合する。

日齢 60 以降の手術は予後が悪くなることが知られており、早期診断・早期治療が重要である。また、葛西手術を行っても、自己肝生存率は 30%程度であり、肝移植を必要とする症例が多い。肝移植が行われる前は、葛西手術で減黄が得られない場合、救命することはできなかった。しかし、近年肝移植の普及により、生存率は向上している。

肝移植の適応は、黄疸の持続、繰り返す胆管炎、肝障害に伴う凝固因子欠乏による出血傾向、肝硬変に伴う門脈圧亢進による腹水貯留や静脈瘤からの出血、脾機能亢進、肝肺症候群など様々である[29,30]。葛西手術後一年間で、減黄し自己肝で生存できるのは 60%である。30 歳までの自己肝生存率は 30 %であり、残りの 70 %は肝移植を必要とする[31]。

BA の生存率改善に重要なことは、早期診断・早期治療による治療成績 (自己肝生存率) 向上と、適切に肝移植施行時期を判定し移植後の生存率を向上させる

ことである。そこで、バイオマーカーによって早期診断や適切な肝移植の予測が可能となれば、予後向上につながる。

3.4. BA とオキシステロール

オキシステロールとは酸化コレステロールの総称であり、種々の構造類似化合物が存在する。コレステロールと主なオキシステロールの構造式を図 1 に示す。コレステロール骨格に水酸基が付加することで、オキシステロールは合成される。生体内では異化・代謝の中間生成物、核内レセプターのリガンドとして機能している。近年では Niemann-Pick 病 C 型、非アルコール性脂肪肝炎、動脈硬化やアルツハイマー型認知症などの様々な疾患バイオマーカーとしての可能性が報告されている[32-35]。新生児肝炎や進行性家族性肝内胆汁うっ滞症といった胆汁うっ滞性疾患との関連性は、24(S)-hydroxycholesterol や 27-hydroxycholesterol が報告されているが [36,37]、BA のバイオマーカーとして詳細な検討はなされていない。

オキシステロールは体内では非常に微量しか存在しないことから、抽出および分析が困難とされていた。我々は先行研究により血清と尿検体の 7 種のオキシステロールにおける安定した分析手法を確立し、健常小児の年齢(成長)に伴うオキシステロールの動態変化や、尿中オキシステロール値が小児肝疾患におけるバイオマーカーとして有用である可能性を報告した。健常小児の年齢(成長)に伴うオキシステロールの動態変化については、尿中の総オキシステロールは、新生児期が最高値で年齢と共に低下する一方で、血清の総オキシステロールは、新

生児期が最低値で、乳児期以降は増加している傾向を見出した。小児肝疾患においては、血清ではなく尿中の 22(R)- hydroxycholesterol、24(S)-hydroxycholesterol や 27-hydroxycholesterol が疾患群において、有意に上昇していた。特に、小児急性肝不全の尿中 24(S)-hydroxycholesterol の上昇が顕著であり、バイオマーカーとしての有用性が考えられた [38]。そこで、先行研究データ、 24(S)-hydroxycholesterol や 27-hydroxycholesterol に関する小児を含む肝疾患のバイオマーカーとしての既報[36,37,39]、BA の主たる障害臓器が肝臓および胆管であることから、「オキシステロールは BA の診断バイオマーカーとして有用である」という仮説を立てた。

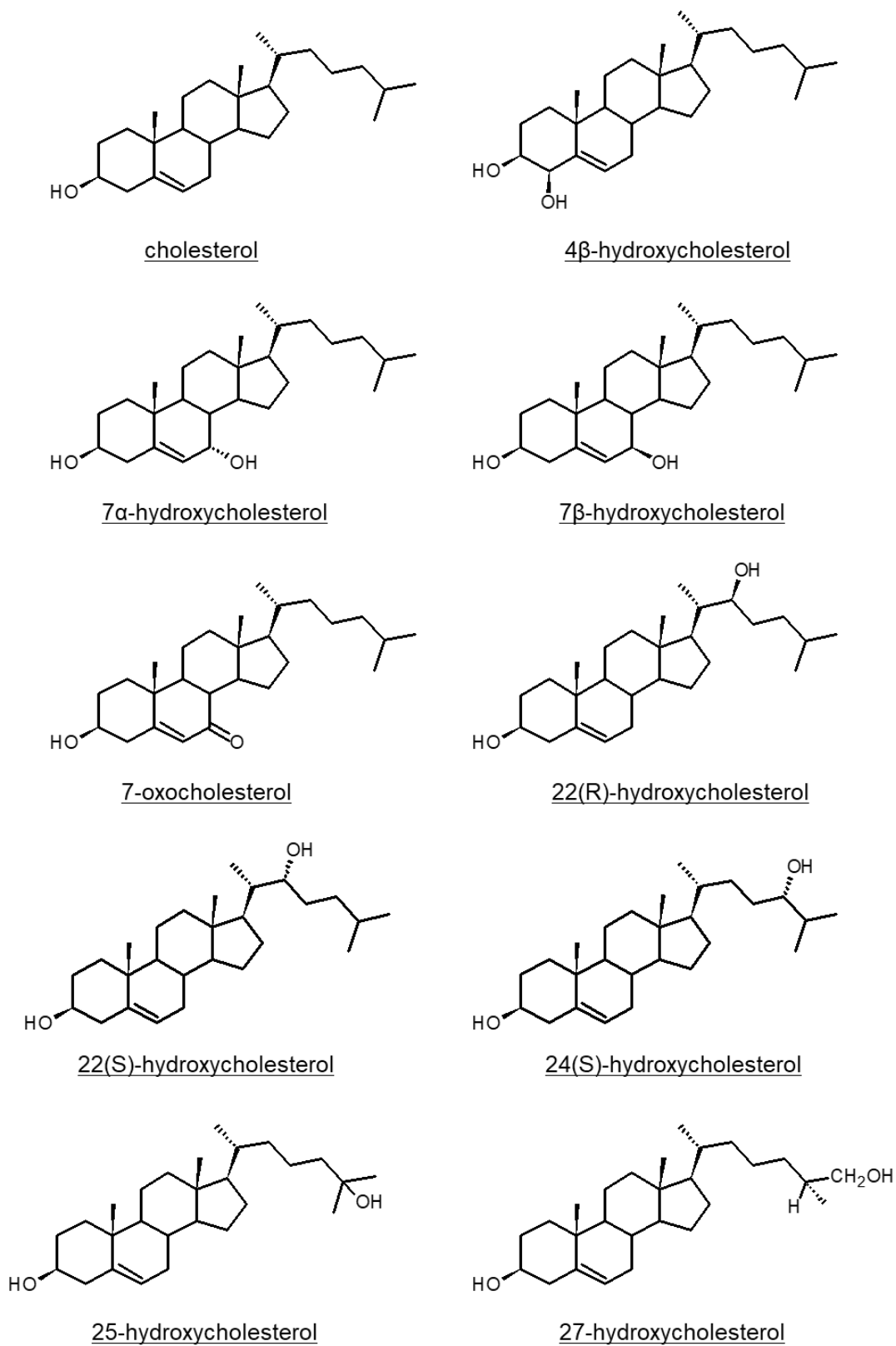


図 1. コレステロールと主なオキシステロールの構造式

コレステロールに水酸基が付加することで、オキシステロールは合成される。

3.5. BA と胆汁酸

胆汁酸は肝臓でコレステロールから生合成されるステロイドの一群である。胆汁酸合成経路には、主たる合成経路である classical pathway と、胎児期に優位な acidic pathway がある。Classical pathway では主に cholic acid (CA)が、acidic pathway では chenodeoxycholic acid (CDCA)が合成される。Classical pathway では、まず母核変換が進み次に側鎖変換が起こる。その代謝過程は、ミクロゾームに存在する cholesterol 7 α -hydroxylase によって、コレステロールから 7 α -hydroxycholesterol への変換から始まり、3 β 位水酸基のケト基への酸化と、2 重結合の Δ^5 位から Δ^4 位への転換が行われる。次に 12 α -hydroxylase によって 12 位に水酸基が付加され、最終的に母核の 3 位、7 位、12 位に水酸基を持つ形態となる。側鎖変換は、ミトコンドリアにある sterol 27-hydroxylase とペルオキシソームでの β 酸化によって、酸化切断が行われる。これらにより合成された CA は、肝細胞内でグリシンもしくはタウリン抱合を受け、胆管へ分泌され、十二指腸へ排出される[40-42]。なお、classical pathway の一部は、12 α -hydroxylase による水酸化を受けず、CDCA が合成される。

Acidic pathway は、狭義の acidic pathway と yamasaki pathway の総称である。最終代謝産物は CDCA である。主な基質は 27-hydroxycholesterol である。27-hydroxycholesterol は、ミトコンドリア内の 27-hydroxylase によってコレステロー

ル側鎖末端が水酸基に変換されて生成される。酸化・側鎖切断を経て、24 位がカルボン酸になる。ミクロゾーム中に存在する 3β -hydroxy- Δ^5 -C₂₇-steroid dehydrogenase/isomerase などにより母核変換が行われる。最終的に 3 位および 7 位に水酸基を持つ形態となり、CDCA が合成される。

これまで、BA と他の胆汁うっ滞性疾患鑑別するために、多くの胆汁酸が研究されてきた。しかし、BA を十分に診断できる胆汁酸は同定されていない [11,43,44]。

前述したオキシステロールのうち、 7α -hydroxycholesterol は CA と一部の CDCA に、 27 -hydroxycholesterol は CDCA に変換される。生体中には、その中間代謝産物となる胆汁酸が存在する (図 2)。我々が測定可能な胆汁酸合成経路の中間代謝産物は、acidic pathway においては、 Δ^5 - 3β -ol と Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -diol であり、classical pathway においては、 Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -triol である。

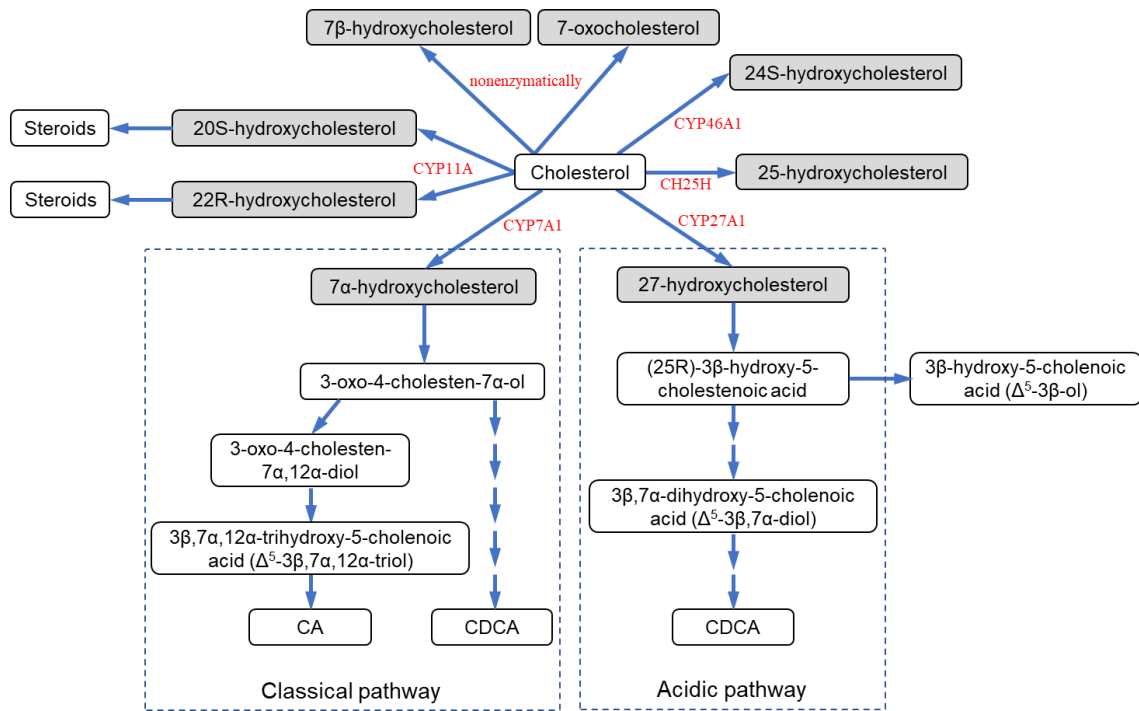


図 2. オキシステロールと胆汁酸の代謝図

オキシステロールは、コレステロールから合成される胆汁酸やステロイドの間代謝産物である他、単独で存在するものもある。

4. 目的

BA を早期診断できる非侵襲的なバイオマーカーの存在が望まれるが、現状ではまだない。前述のように、我々は小児における肝疾患児および健常児の血清と尿のオキシステロールを分析、比較検討し、小児肝疾患のバイオマーカーとしての有用性を検討してきた[38]。血清と尿という低侵襲で容易に採取できる検体を用いて BA を診断できるバイオマーカーがみつければ、臨床現場での実用性や診断、治療に対する貢献度は非常に高いと考えられる。本研究では、BA の血清と尿のオキシステロールを分析し、BA 診断におけるバイオマーカーとして有用かどうか検討することを目的とした。そして、オキシステロール分析で得られた結果を元に、オキシステロールから代謝される胆汁酸をターゲットとした分析を追加し、検証した。

5. 方法

5.1. 研究デザイン

本研究は、前向き多施設共同研究であり、難治性疾患実用化研究事業 (AMED) 仁尾班「胆道閉鎖症診療ガイドライン改定を目指したエビデンス創出研究」をフレームワークとする研究である。検体は共同研究 7 施設 (東京大学、久留米大学、東北大学、九州大学、名古屋大学、順天堂大学、自治医科大学) で収集された。まず、BA 群、胆汁うっ滞疾患コントロール (Non-BA cholestasis: 以下 Non-BA) 群、健常コントロール (Healthy control: 以下 HC) 群の血清と尿の総オキシステロール値を比較検討した。そして、7 種の個々のオキシステロールについて、BA 群と Non-BA 群で比較し、両群と個々のオキシステロール濃度に有意な差があるかを検討した。有意に上昇しているオキシステロールに対し、BA 群と Non-BA 群の鑑別を目的として Receiver operating characteristics (ROC) 解析を用い、BA 群でのオキシステロール濃度の有用性を統計学的に検証した。胆汁酸の測定理由については後述する。オキシステロールおよび胆汁酸の分析は、順伸クリニック胆汁酸研究所の分析器ならびに実験器材を用いた。詳細な分析方法は後述する。

本研究は、ヘルシンキ宣言 (2013 年改訂版) に基づいて対象者の保護に留意

し、説明および同意取得を行った。全ての同意は、対象者の両親から取得した。

また、東京大学を含む全共同研究施設で倫理委員会の承認を得ている（東京大学

大学院医学系研究科・医学部倫理委員会 審査番号：2018087N1）。

5.2. 対象

2016年11月～2019年8月に共同研究7施設を受診した患児を対象とした。

BA群は新規BA患者とした(疾患群)。Non-BA群は、age-matchedとなる生後6か月以下の胆汁うっ滞性疾患症例とした(疾患コントロール群)。HC群は、6か月以下の健常児とした。BAの定義は、手術による胆道造影で胆管が描出されない所見とした。胆汁うっ滞性疾患の定義は、(1)黄疸、白色便や肝腫大といったBAに起こり得る臨床症状から胆汁うっ滞性疾患が疑われ、各種検査でBAの鑑別を要し、遺伝子診断(Alagille症候群における*JAG1*や、新生児Dubin-Johnson症候群における*ABCC2*)などで、最終的にBA以外の胆汁うっ滞性疾患の診断に至り、かつ(2)精査開始時の血清直接ビリルビン値 >1.5 mg/dLとした。なお、具体的な疾患名については、6.1.に詳述する。BA群、Non-BA群ともに、診断時(BA群は手術直前)に血清と尿の検体を採取した。日齢、性別、一般血液生化学検査を含む患者背景および臨床検査データは診療録を用いて集めた。血清および尿検体は、採取後可及的速やかに -20°C で冷凍保存した。

5.3. オキシステロールの測定法

血清と尿のオキシステロール分析法は、液体クロマトグラフエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (Liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry [LC/ESI-MS/MS] : 以下 LC/MS) を用いた。4 β -hydroxycholesterol (cholest-5-en-3 β ,4 β -diol)、20(S)-hydroxycholesterol (cholest-5-en-3 β ,20(S)-diol)、22(S)-hydroxycholesterol (cholest-5-en-3 β ,22(S)-diol)、22(R)-hydroxycholesterol (cholest-5-en-3 β ,22(R)-diol) 、 24(S)-hydroxycholesterol (cholest-5-en-3 β ,24S-diol) 、 25-hydroxycholesterol (cholest-5-en-3 β ,25-diol)、27-hydroxycholesterol (25(R)-cholest-5-en-3 β ,26-diol)、以上7種のオキシステロールを分析した。オキシステロールの分析は図3の前処理を行った。詳細な前処理方法は、5.3.1.、5.3.2 に後述し、LC/MSシステムによる分析方法は、5.3.3 に後述する。 [38,45]。尿中オキシステロール値は Jaffe 法で測定したクレアチニン値で補正した。

5.3.1. オキシステロール測定における血清検体の前処理 (図 3A)

血清検体 10 μ L に、内部標準物質として *d*₆-25-hydroxycholesterol (100 pmol/mL in MeOH) 10 μ L、butylated hydroxytoluene (5 mg/mL in EtOH) 10 μ L を添加した。総オキシステロールを測定するために、1N NaOH 1 mL を加え、37 °C で 1 時間放置し、オキシステロールと脂質のエステル結合を加水分解させ、遊離のオキシステロールを得た。次に、蒸留水 0.5 mL と hexane 1 mL を加えた後、溶液を約 2 分間ボルテックス攪拌した。1000 rpm で 5 分間遠心分離し、ステロールを含むヘキサン層を分取した。再び hexane 1 mL でステロール類を抽出してヘキサン層を合わせ、蒸発乾固後に、残渣を hexane 0.5 mL で再構成した。コレステロールなどの非極性ステロールを除去する aminopropyl SPE カラムは、InertSep NH₂ 固相抽出カートリッジ (size, 100mg/ 1mL; GL Sciences、Tokyo、Japan) を用いた [46]。カラムは予め CHCl₃/MeOH(1:1) 1 mL で洗浄し、hexane 3 mL で平衡化した。再構成液を SPE カラムに移し、hexane 1 mL で洗浄した後、CHCl₃/MeOH (20:1) 1 mL を加えて SPE カラムからステロールを溶出させ、溶出液を蒸発乾固した。測定感度を上昇させるためのニコチン酸エステル誘導体化は、既報に従って行った [47]。蒸発乾固物に 100 μ L の誘導体化試薬 (nicotinic acid 80 mg、N,N-dimethyl-4-aminopyridine 30 mg、1-[3-dimethylaminopropyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride 100 mg、N,N-dimethylformamide 1 mL) を添加し、60°C で 1 時間加熱した。蒸留

水 1 mL と hexane 1 mL を添加し、混合物を 2 分間ボルテックス攪拌した。1000 rpm で 5 分間遠心分離し、ニコチン酸エステル誘導体を抽出したヘキサン層を蒸発乾固させ、acetonitrile 200 μ L で溶解して LC/MS 分析用試料液とした。そして、試料液 10 μ L を LC/MS システムで分析した[38]。

5.3.2. オキシステロール測定における尿検体の前処理 (図 3B)

尿中オキシステロールは、硫酸やグルクロン酸などとの抱合型で存在している。オキシステロールを遊離型とするために、これらの抱合体を酵素加水分解により調整した[36,38,48,49]。今回、抱合体の酵素加水分解には、株式会社日本バイオテスト研究所の「グルファターゼ セット」を用いた。尿検体 200 μL に試薬 A 40 μL と試薬 B 10 μL を加え、混合物を 10 秒間ボルテックス攪拌し、5 分間静置した。1500 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清 200 μL を新しいガラス試験管に移し、*d*₆-25-hydroxycholesterol 1 pmol を添加した。酢酸緩衝液 20 μL 、Glufatase 酵素 5 μL と sulfatase type H-2 (Sigma 社) 5 μL を加え、37°C16 時間インキュベートとして酵素加水分解を行った。遊離型となったオキシステロールは、血清での前処理と同様にヘキサンで抽出した後、ニコチンエステルへの誘導体化を行った[47]。但し、尿中にはコレステロール等の非極性脂質は少ないので、NH₂ 固相抽出カートリッジによる精製は省略した。誘導体化反応から試料液の調整は血清の前処理法に準じた。

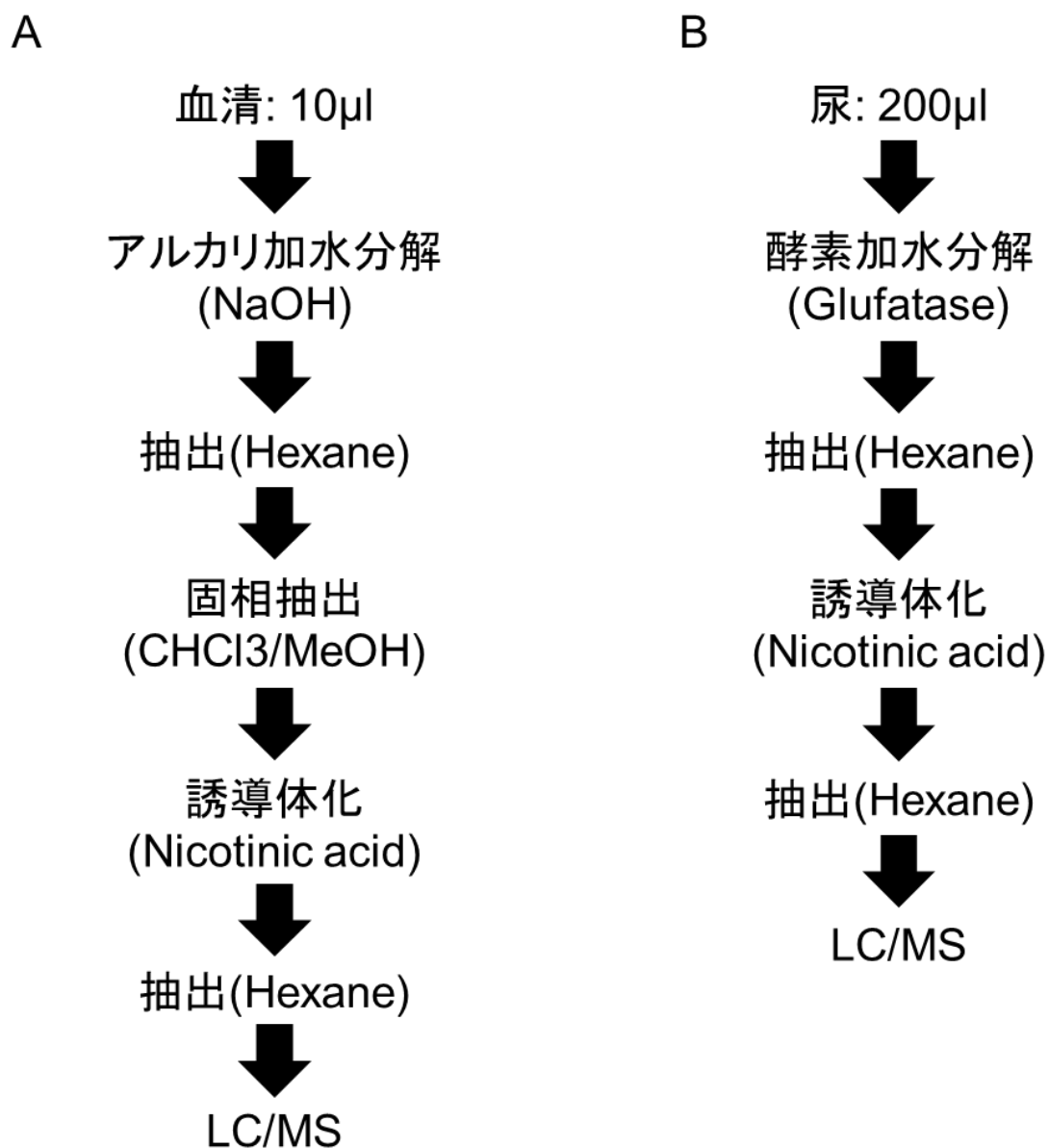


図 3. オキシステロール測定における前処理

血清の前処理は、オキシステロールと脂質のエステル結合を加水分解するために、アルカリ加水分解 (NaOH) を行った。また、尿の前処理は、硫酸やグルクロン酸抱合体を脱抱合するために酵素加水分解 (Glufatase) 処理を行った。

LC/MS : Liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry

5.3.3. LC/MS によるオキシステロールの分析方法

前処理した試料液は、LC/MS システムを用いて分析した。LC/MS システムは、質量分析計 LCMS-8050 (島津製作所、Kyoto, Japan) と高速液体クロマトグラフ Nexera X2 (島津製作所、Kyoto, Japan) を連結して構成した。高速液体クロマトグラフでのオキシステロール誘導体の分離には、SunShell C30 (粒径：2.6 μ m、内径：2.1mm、長さ：100mm、株式会社クロマニックテクノロジー、Osaka, Japan) カラムを使用した。カラムオープン温度は 40° C にセットし、グラジエント分離の条件は、溶離液 A (pH 3.5, 10 mM ammonium acetate, 0.1%ギ酸) と溶離液 B (アセトニトリル：イソプロパノール=2：3) を用い、流量：0.30 ml/min に設定した。溶離液組成は、以下のグラジエント条件とした。溶液 A-B (46:54, v/v) のアイソクラティック 2 分で開始し、溶液 A-B(32:68, v/v)を 2-5 分, 溶液 A-B(28:72, v/v)を 5-14 分, 溶液 A-B (18:82, v/v) を 14-16 分, 溶液 A-B (4:96, v/v) を 16-18 分, 溶液 A-B (4:96, v/v) を 18-22 分で保持, 溶液 A-B (46:54, v/v) を 22.1-28 分アイソクラティックで初期条件に戻した。エレクトロスプレーイオン化の条件は、陽イオンモード、イオン化電圧: 4000 V、ネブライザーガス流量：3L/min、ヒーティングガス流量：3L/min、インターフェイス温度：300°C、DL 温度：250°C、ヒーティングガス流量：3L/min、インターフェイス温度：300°C、DL 温度：250°C、ヒーティングガス流量：3L/min、ドライイングガス流量：10L/min、コリジョンガス：270kPa に設定した。各オキシステロールの LC/MS パラメータを表 1 に示す。本

条件で検出されたオキシステロール標準液ならびに尿検体の Multiple reaction monitoring (MRM) 分析チャートの波形を図 4 に示す。

各検体のオキシステロール濃度は回帰曲線から求めた。すなわち、検体の前処理と同様に誘導体化したオキシステロール標準溶液 (0、0.1、0.3、1.0、3.0、10 pmol/ml) 6 濃度を横軸に、その MRM 波形の面積値を縦軸にプロットすると、いずれのオキシステロールも回帰曲線は良好な直線性 (相関係数 $r=0.9991\sim 0.9998$) を示した。各オキシステロール濃度は、保持時間の一致する ($\pm 0.1\text{min}$ 以内) mass spectrometry の面積値を回帰曲線式から換算することで求めた。なお、この濃度換算は内部標準物質の補正も含め、島津製作所 LCMS-8050 附属の Lab Solution ソフトに因った。

表 1. オキシステロールの LC/MS 分析パラメータ

	RT (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	CE (eV)	<i>r</i>
4 β -hydroxycholesterol	19.0	613.5	124.1	-26	0.9997
7 α -hydroxycholesterol	17.4	613.4	124.1	-24	0.9991
7 β -hydroxycholesterol	17.8	613.5	367.4	-19	0.9994
7-oxo-cholesterol	16.9	547.4	383.2	-23	0.9992
20S-hydroxycholesterol	14.6	508.4	124.1	-26	0.9996
22R-hydroxycholesterol	15.4	654.4	613.3	-15	0.9998
22S-hydroxycholesterol	15.9	654.4	613.3	-15	0.9995
24S-hydroxycholesterol	16.7	613.5	124.0	-33	0.9998
25-hydroxycholesterol	13.3	508.4	124.0	-24	0.9996
27-hydroxycholesterol	18.1	613.4	490.2	-20	0.9998
<i>d</i> ₆ -25-hydroxycholesterol	13.2	514.5	124.1	-26	

RT, retention time; CE, collision energy; *r*, correlation coefficient

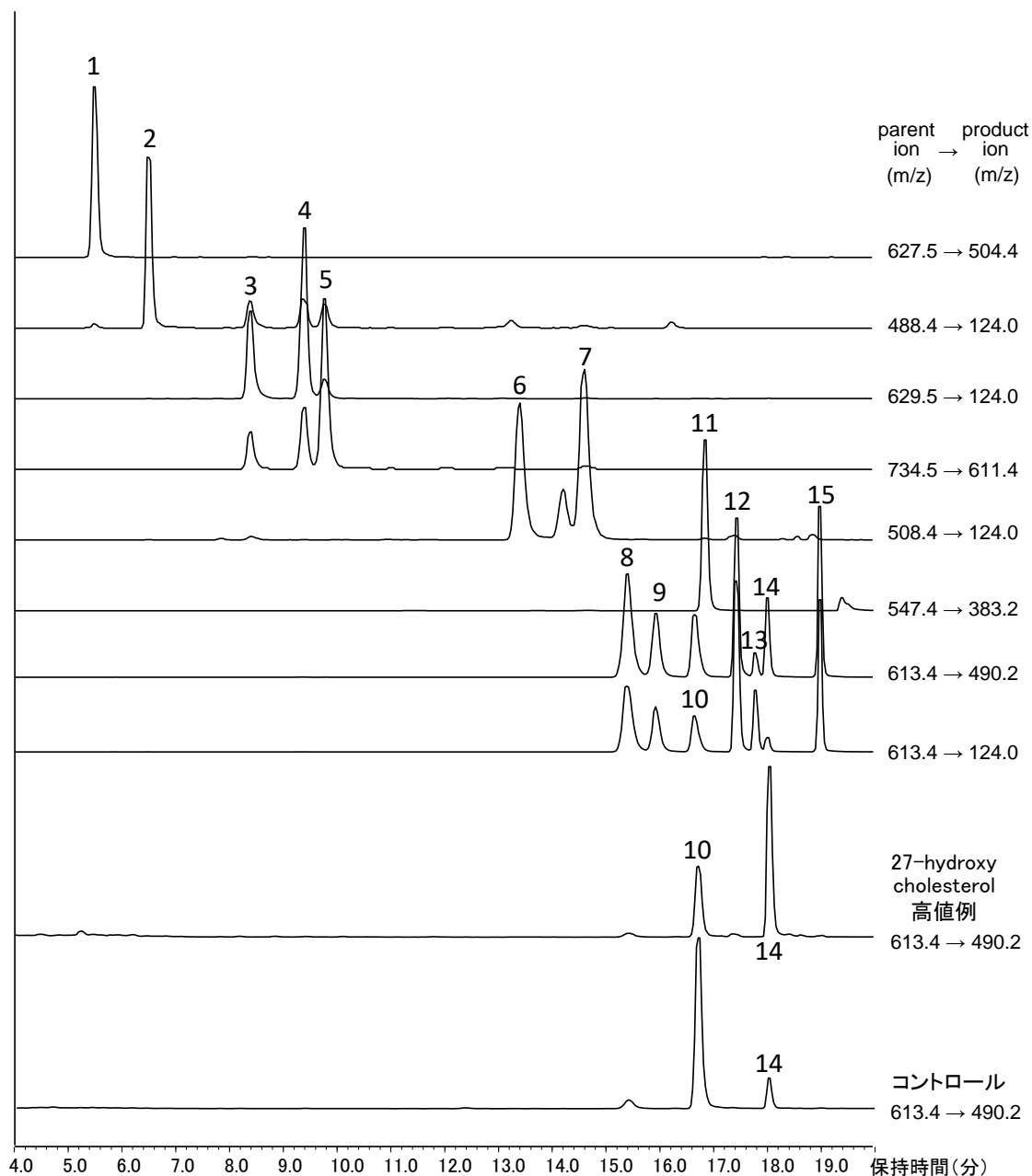


図 4. オキシステロール内部標準物質および尿検体の **Multiple Reaction**

Monitoring 分析チャート

1. 7 α ,27-dihydroxy-4-cholestene-3-one; 2. 7 α ,24S-dihydroxycholesterol; 3. 7 α ,25-dihydroxycholesterol; 4. 7 α ,27-dihydroxycholesterol; 5. 24S,27-dihydroxycholesterol; 6. 25-hydroxycholesterol; 7. 20S-hydroxycholesterol; 8. 22R-hydroxycholesterol; 9. 22S-

hydroxycholesterol; 10. 24S-hydroxycholesterol; 11. 7-oxocholesterol; 12. 7 α -hydroxycholesterol; 13. 7 β -hydroxycholesterol; 14. 27-hydroxycholesterol; 15. 4 β -hydroxycholesterol

No. 6 から 15 の 10 種のオキシステロールは、誘導体化をしても分子量は同一である。そこで、HPLC 分離カラムによってこれらのオキシステロールを注意深く分離し、また、イオンの検出には各オキシステロールに特異的なペアレントイオンとプロダクトイオンを選択した。これにより、下段から 2 段目や最下段のような検体分析においても、標準品と同様に検体に含まれる夾雑物の影響が少ない分析を行うことができた。

5.4. 胆汁酸の測定法

今回我々は、120 種類の胆汁酸 (CA、 Glyco(G)CA、 Tauro(T)CA、 CA-3sulfate(3S)、 GCA-3S、 TCA-3S、 CDCA、 GCDCA、 TCDCA、 CDCA-3S、 GCDCA-3S、 TCDCA-3S、 Δ^5 -3 β -ol、 G- Δ^5 -3 β -ol、 T- Δ^5 -3 β -ol、 Δ^5 -3 β -ol-3S、 G- Δ^5 -3 β -ol-3S、 T- Δ^5 -3 β -ol-3S、 Δ^5 -3 β ,7 α -diol、 G- Δ^5 -3 β ,7 α -diol、 T- Δ^5 -3 β ,7 α -diol、 Δ^5 -3 β ,7 α -diol-3S、 G- Δ^5 -3 β ,7 α -diol-3S、 T- Δ^5 -3 β ,7 α -diol-3S、 Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol、 G- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol、 T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol、 Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol-3S、 G- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol-3S、 T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol-3S など) を分析した。分析は図 5 の前処理を行い、LC/MS システムで測定した。27-hydroxycholesterol は胆汁酸経路の acidic pathway で合成される胆汁酸の前駆体である。そこで、acidic pathway のみで合成される胆汁酸 (Δ^5 -3 β -ol、 Δ^5 -3 β ,7 α -diol) と classical pathway のみで合成される胆汁酸 (CA、 Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol) の血清中及び尿中濃度を BA 群と Non-BA 群で比較し、オキシステロール分析で得られた結果を裏付ける結果が得れるかどうか検証した (図 2)。 Δ^5 -3 β -ol には各抱合型が存在しているので、 Δ^5 -3 β -ol、 G- Δ^5 -3 β -ol、 T- Δ^5 -3 β -ol、 Δ^5 -3 β -ol-3S、 G- Δ^5 -3 β -ol-3S、 T- Δ^5 -3 β -ol-3S の和を Δ^5 -3 β -ol group とし、解析した。同様の方法で、CA group、 Δ^5 -3 β ,7 α -diol group、 Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol group も解析した。

<注>胆汁酸表記の略語

CA: cholic acid、CDCA: chenodeoxycholic acid、 Δ^5 -: 5-cholenoic acid を示す。また、
接頭語に G が付いたものはグリシン抱合体 (Glyco)、T が付いたものはタウリン
抱合体 (Tauro)、接尾に 3S が付いたものは 3 位硫酸抱合体 (Sulfate)を表す。

5.4.1. 胆汁酸測定における血清検体の前処理 (図 5A)

標識内部標準物質 (d_4 -CA、 d_4 -GCA、 d_4 -TCA、 d_4 -GCDCA、 d_4 -TCDCA、 d_5 -CDCA-3S、 d_5 -GCDCA-3S、 d_5 -TCDCA-3S 各 1 nmol/ml 混合液) 20 μ L を血清検体 50 μ L に添加した。次に、除蛋白を行うために 90%EtOH 450 μ L を加え 1 分間攪拌後、10 分間遠心後、上清を回収し、蒸発乾固した。乾固物に蒸留水 1 mL を加え、超音波洗浄機にて十分に溶解させた液を MeOH 1 mL と蒸留水 3 mL で前処理した固相カラム (InertSep C18-B; 100 mg / 1 mL) に検体をアプライ後、蒸留水 1 mL で洗浄し、90%EtOH 1 mL で胆汁酸類を溶出した。溶媒を蒸発乾固させた後、残留物を 50%EtOH 1 mL に溶解し、試料液 20 μ L を LC/MS システムで分析した。

5.4.2. 胆汁酸測定における尿検体の前処理 (図 5B)

標識内部標準物質 (d_4 -CA、 d_4 -GCA、 d_4 -TCA、 d_4 -GCDCA、 d_4 -TCDCA、 d_5 -CDCA-3S、 d_5 -GCDCA-3S、 d_5 -TCDCA-3S) 20 μ L を尿検体 50 μ L に添加した。MeOH 1 mL と蒸留水 3 mL で前処理した固相カラム (InertSep C18-B; 100 mg / 1 mL) に検体を注入し、カラムを蒸留水 1 mL で洗浄し、90%EtOH 1 mL で胆汁酸類を溶出した。溶媒を蒸発乾固させた後、残留物を 50%EtOH 1 mL に溶解し、試料液 20 μ L を LC/MS システムで分析した。個々の尿中胆汁酸濃度は、クレアチニンで補正した[50,51]。

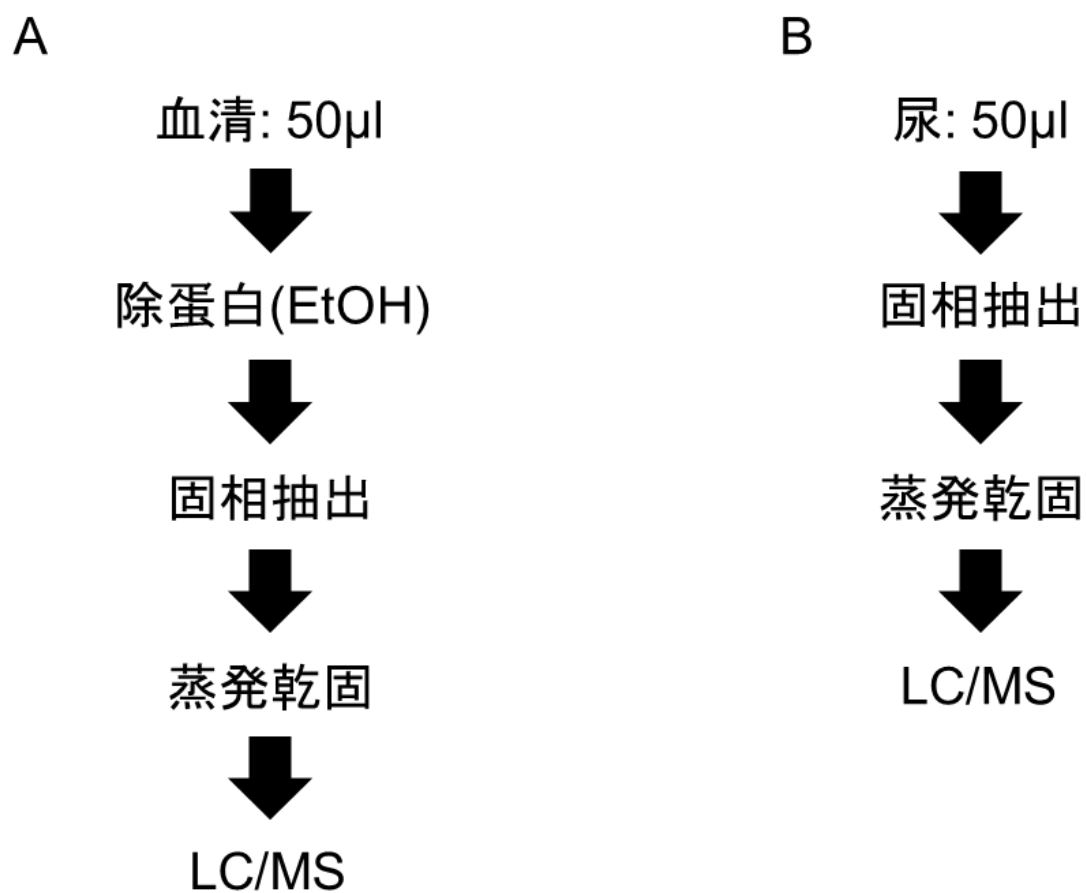


図 5. 胆汁酸測定における前処理

血清の前処理は、EtOH を使用して除蛋白を行った。

LC/MS : Liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry

5.5. 血液生化学検査

BA 群と Non-BA 群における、血液生化学検査値を測定した。各施設で診療に用いられている方法で測定した。血液検査項目は、alanine aminotransferase (ALT)、 γ -GTP、総ビリルビン値、直接ビリルビン値、総胆汁酸値 (3 α -hydroxysteroid dehydrogenase enzyme method)、総コレステロール値とし、両群間で比較検討した。

5.6. 統計学的解析

統計学的解析は、統計解析ソフトウェア JMP[®] version 14 (SAS Institute、Cary、NC) を用いて Fisher の正確検定、Mann-Whitney U 検定を行った。GraphPad Prism version 6.05 (GraphPad Software、San Diego、CA) を用いて Kruskal-Wallis 検定、Dunn の多重比較検定、Spearman の順位相関解析を行った。ROC 解析を行い、area under the curve (AUC) を算出した。p<0.05 を有意差ありとした。

6. 結果

6.1. 患者背景

BA 群 14 例、Non-BA 群 10 例、健常コントロール (HC) 群は 10 例だった。

Non-BA 群内訳はシトリン欠損による新生児肝内胆汁うっ滞症 3 例、Alagille 症候群 2 例、原因不明 2 例、新生児白血病 1 例、新生児 Dubin-Johnson 症候群 1 例、甲状腺機能低下症 1 例だった。HC 群は 10 例が対象となったが、血液採取は侵襲を伴うため、3 例において同意が得られず、血清検体は 7 検体となった。

BA 群と Non-BA 群の血液検査所見を表 2 に示した。血清 γ -GTP は Non-BA 群比較して、有意に BA 群で高かった。性別、日齢、ALT 値、総ビリルビン値、直接ビリルビン値、総コレステロール値には有意差は見られなかった (表 1)。なお、日齢は HC 群を含む 3 群間でも有意差を認めなかった (日齢: BA 群 67.5、non-BA 群 59、HC 群 57)。

表 2. BA 群と Non-BA 群の患者背景

	BA	Non-BA	<i>P</i> value
症例数	14	10	
性別 (男/女)	6/8	6/4	0.68
日齢	67.5 (26-170)	59 (14-162)	0.98
Alanine aminotransferase, U/L	100.5 (17-238)	68.5 (26-208)	0.36
γ -glutamyltranspeptidase, U/L	619.5 (329-1175)	158 (47-279)	<0.001
総ビリルビン, mg/dL	7.8 (4.6-13.1)	6.8 (3.3-22.7)	0.60
直接ビリルビン, mg/dL	5.2 (2.7-8.9)	3.7 (1.7-16.5)	0.33
総胆汁酸, μ mol/L	109.2 (54.4-141.6)	181.5 (51.9-342.6)	0.31
総コレステロール, mg/dL	194 (109-313)	172.5 (120-224)	0.58

値は数もしくは中央値（範囲：最小値 - 最大値）で示した。統計学的解析は、性別については Fisher の正確検定を行い、その他の因子については、Mann-Whitney U 検定を行った。

6.2. オキシステロール

6.2.1. 血清オキシステロール

血清総オキシステロールは HC 群と比較して、BA 群と Non-BA 群で有意に高かった (BA 群 vs. HC 群 : 中央値 0.825 $\mu\text{mol/L}$; 範囲 (最小値-最大値) 0.124-1.328 vs. 0.251; 0.049-0.979、 $P < 0.05$ 、 Non-BA 群 vs. HC 群 : 0.783; 0.324-1.519 vs. 0.251; 0.049-0.979、 $P < 0.05$) (図 6A)。次に、7 種類の血清オキシステロールを測定した。4 β -hydroxycholesterol、22(R)-hydroxycholesterol、24(S)-hydroxycholesterol および 25-hydroxycholesterol は BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった (4 β -hydroxycholesterol: BA 群 vs. Non-BA 群、中央値 0.13 $\mu\text{mol/L}$; 範囲 (最小値-最大値) 0.03-0.3 vs. 0.14; 0.04-0.36、 $P = 0.70$ 、22(R)-hydroxycholesterol: 0.033; 0.006-0.056 vs. 0.026; 0-0.046、 $P = 0.62$ 、24(S)-hydroxycholesterol: 0.202; 0.03-0.68 vs. 0.222; 0.039-0.728、 $P = 0.98$ 、25-hydroxycholesterol: 0.197; 0.021-0.264 vs. 0.19; 0.026-0.275、 $P = 0.88$) (図 6B-E)。BA 群の 27-hydroxycholesterol は、Non-BA 群と比較して有意に低かった (27-hydroxycholesterol: BA 群 vs. Non-BA 群、0.116; 0.03-0.196 vs. 0.170; 0.043-0.411、 $P < 0.05$) (図 6F)。20(S)-hydroxycholesterol と 22(S)-hydroxycholesterol はいずれの群でも検出されなかった。

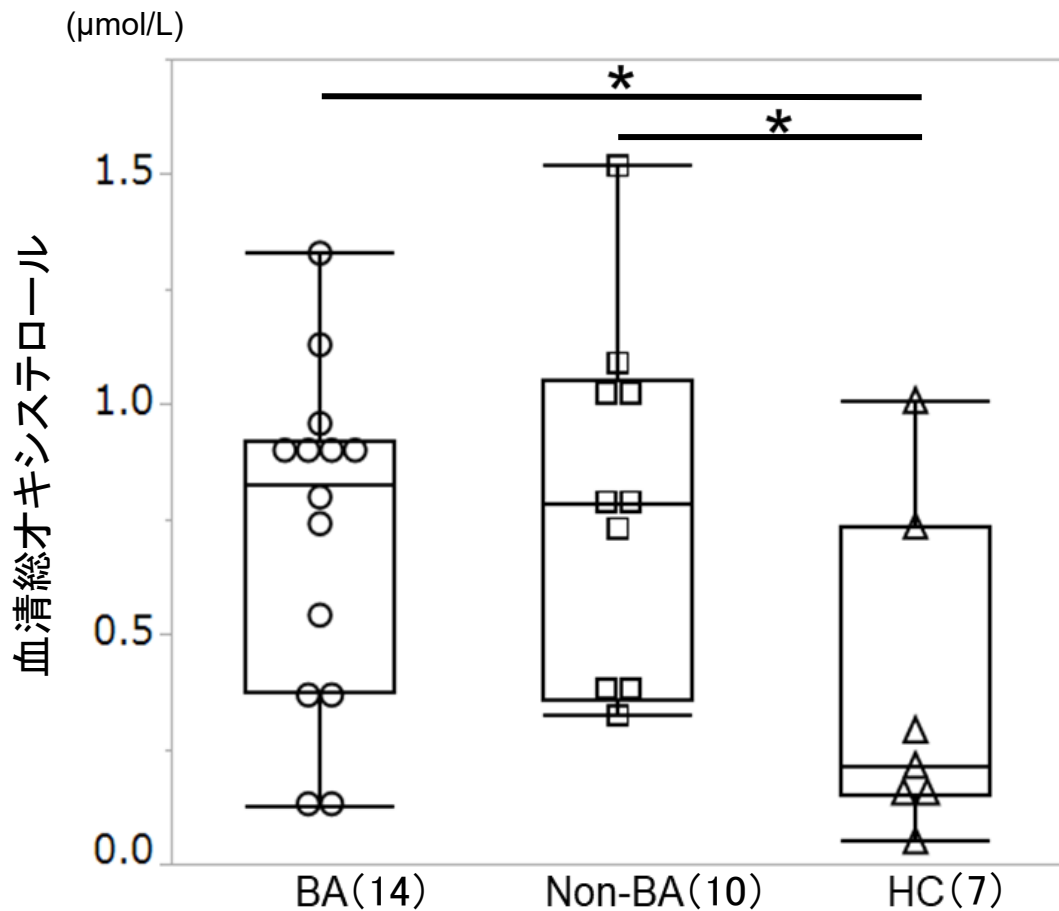


図 6A. 血清総オキシステロール

箱の中央の水平線は中央値を示し、箱の上部および底部は四分位を示す。箱の上下の水平線はそれぞれ最大値と最小値を示す。HC 群と比較して、BA 群と Non-BA 群で有意に高かった (BA 群 vs HC 群 : $P < 0.05$ 、 Non-BA 群 vs HC 群 : $P < 0.05$)。統計学的解析は、Kruskal-Wallis 検定および Dunn の多重比較検定を行った。*, $P < 0.05$ 。

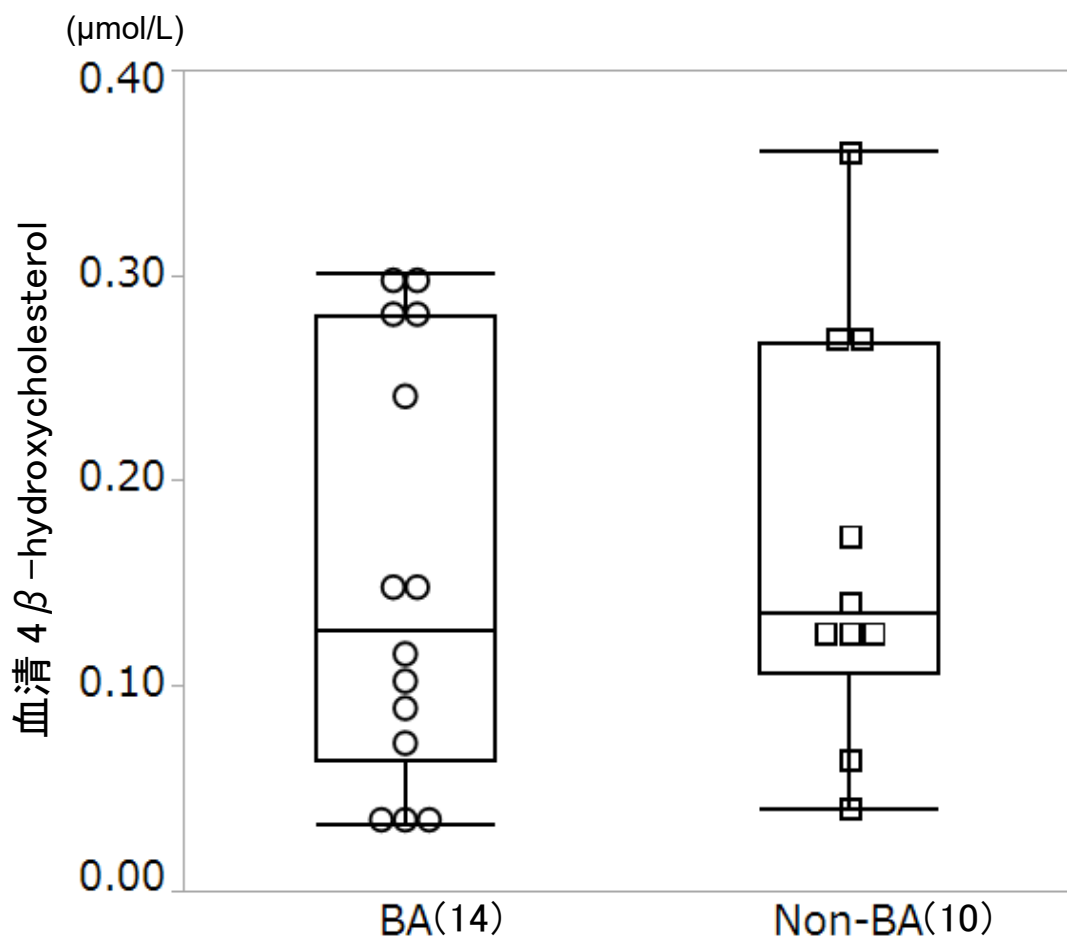


図 6B. 血清 4β-hydroxycholesterol

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

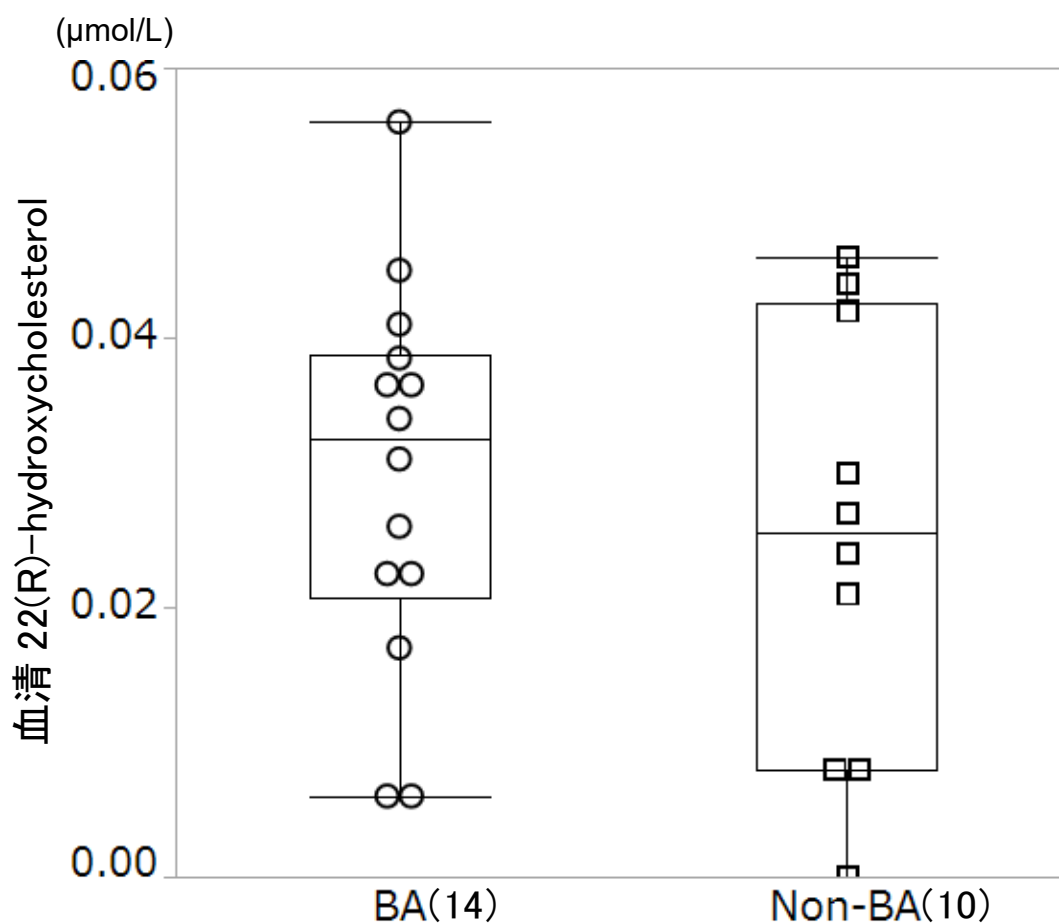


図 6C. 血清 22(R)-hydroxycholesterol

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

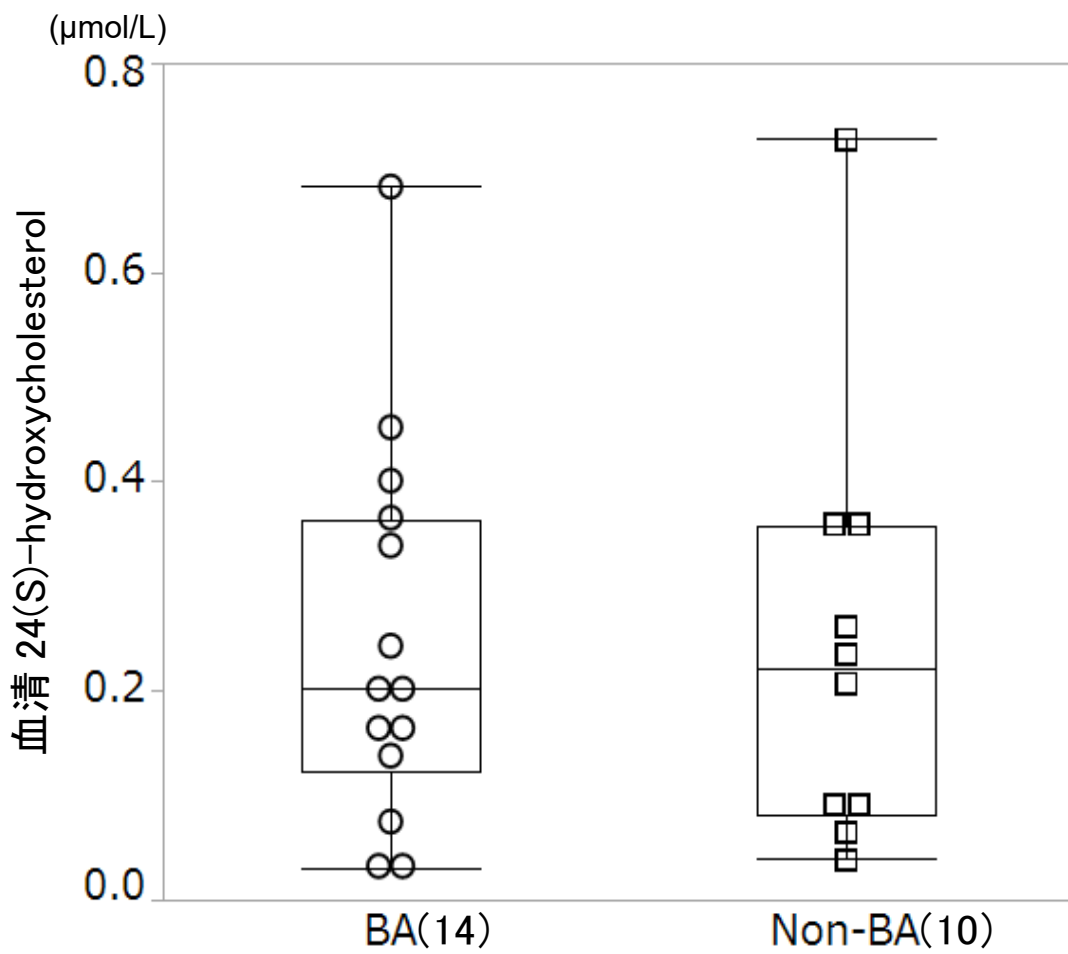


図 6D. 血清 24(S)-hydroxycholesterol

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

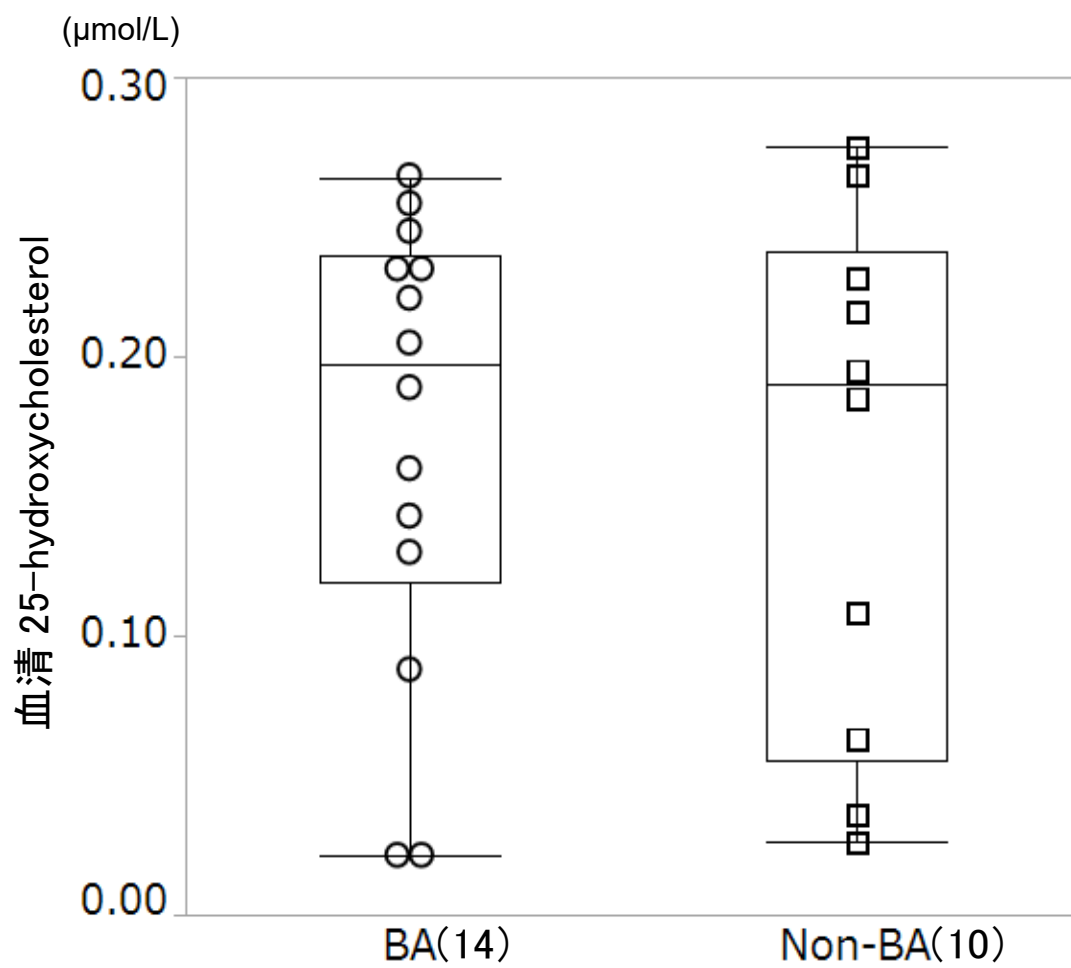


図 6E. 血清 25-hydroxycholesterol

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

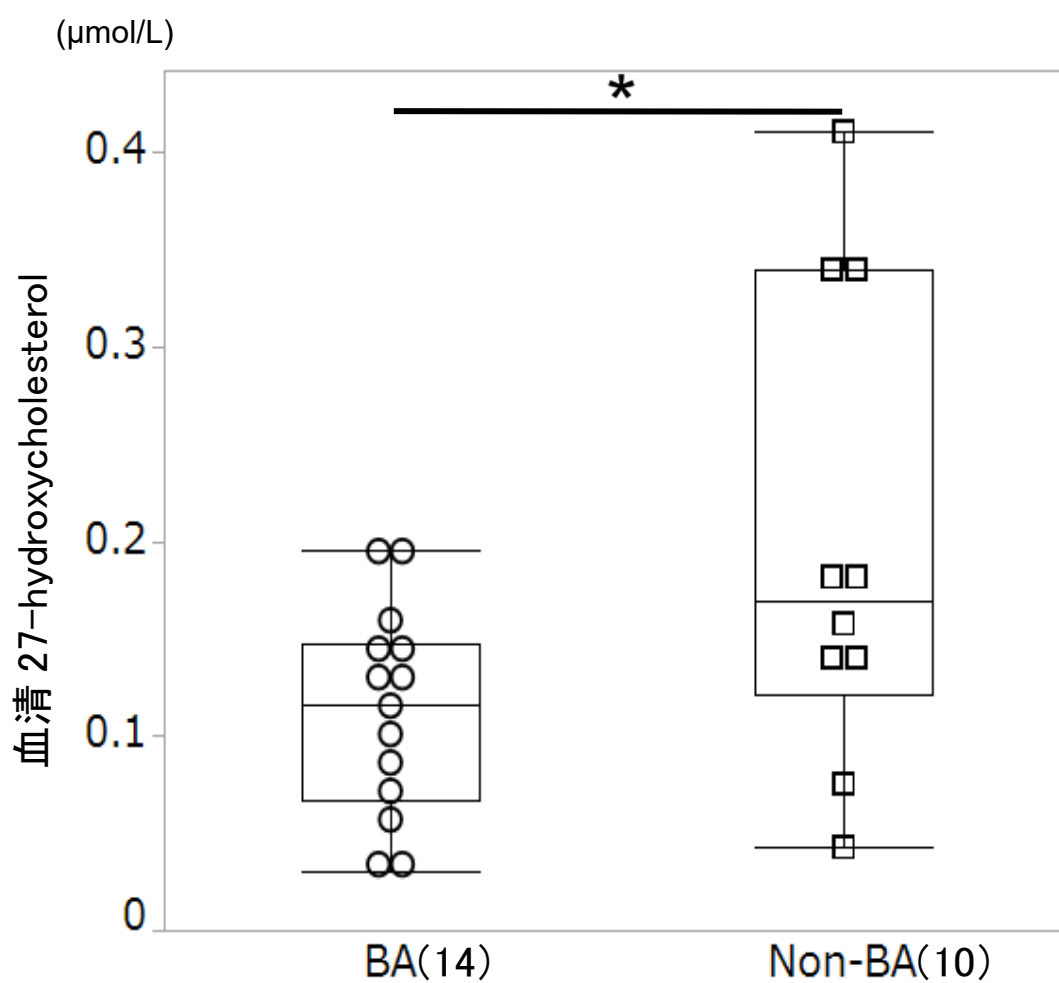


図 6F. 血清 27-hydroxycholesterol

BA 群の 27-hydroxycholesterol は、Non-BA 群と比較して有意に低かった ($P < 0.05$)。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

*, $P < 0.05$.

6.2.2. 尿中オキシステロール

尿中総オキシステロールは HC 群と比較して、BA 群と Non-BA 群で有意に高かった (BA 群 vs. HC 群: 中央値 153.0 $\mu\text{mol/mol creatinine}$; 範囲 (最小値-最大値) 24.1-486.7 vs. 2.7; 0.8-7.6、 $P<0.001$ 、 Non-BA 群 vs. HC 群: 36.2; 5.8-411.3 vs. 2.7; 0.8-7.6、 $P<0.05$) (図 7A)。 BA 群と Non-BA 群で比較すると、有意差はなかったが、BA 群でやや高い傾向にあった (BA 群 vs. Non-BA 群: 153.0; 24.1-486.7 vs. 36.2; 5.8-411.3、 $P=0.07$)。

次に、7 種類の尿中オキシステロールを測定した。BA 群の 22(R)-hydroxycholesterol、 25-hydroxycholesterol および 27-hydroxycholesterol は、Non-BA 群と比較して有意に高かった (22(R)-hydroxycholesterol: BA 群 vs. Non-BA 群、中央値 36.2 $\mu\text{mol/mol creatinine}$; 範囲 (最小値-最大値) 6.1-155.0 vs. 12.9; 2.7-75.9、 $P<0.05$ 、 25-hydroxycholesterol: 0.6; 0-5.5 vs. 0; 0-0.5、 $P<0.01$ 、 27-hydroxycholesterol: 3.6; 0.4-11.1 vs. 0.7; 0-5.6、 $P<0.01$) (図 7C、7E、7F)。尿中 4 β -hydroxycholesterol および 24(S)-hydroxycholesterol は BA 群と Non-BA 群の間に、有意な差はみられなかった (4 β -hydroxycholesterol: BA 群 vs. Non-BA 群、中央値 0.2 $\mu\text{mol/mol creatinine}$; 範囲 (最小値-最大値) 0-2.7 vs. 0.04; 0-2.5、 $P=0.27$ 、 24(S)-hydroxycholesterol: 96.9; 11.8-313.0 vs. 19.4; 2.6-354.5、 $P=0.08$) (図 7B、7D)。

20(S)-hydroxycholesterol と 22(S)-hydroxycholesterol はいずれの群でも検出され
なかった。

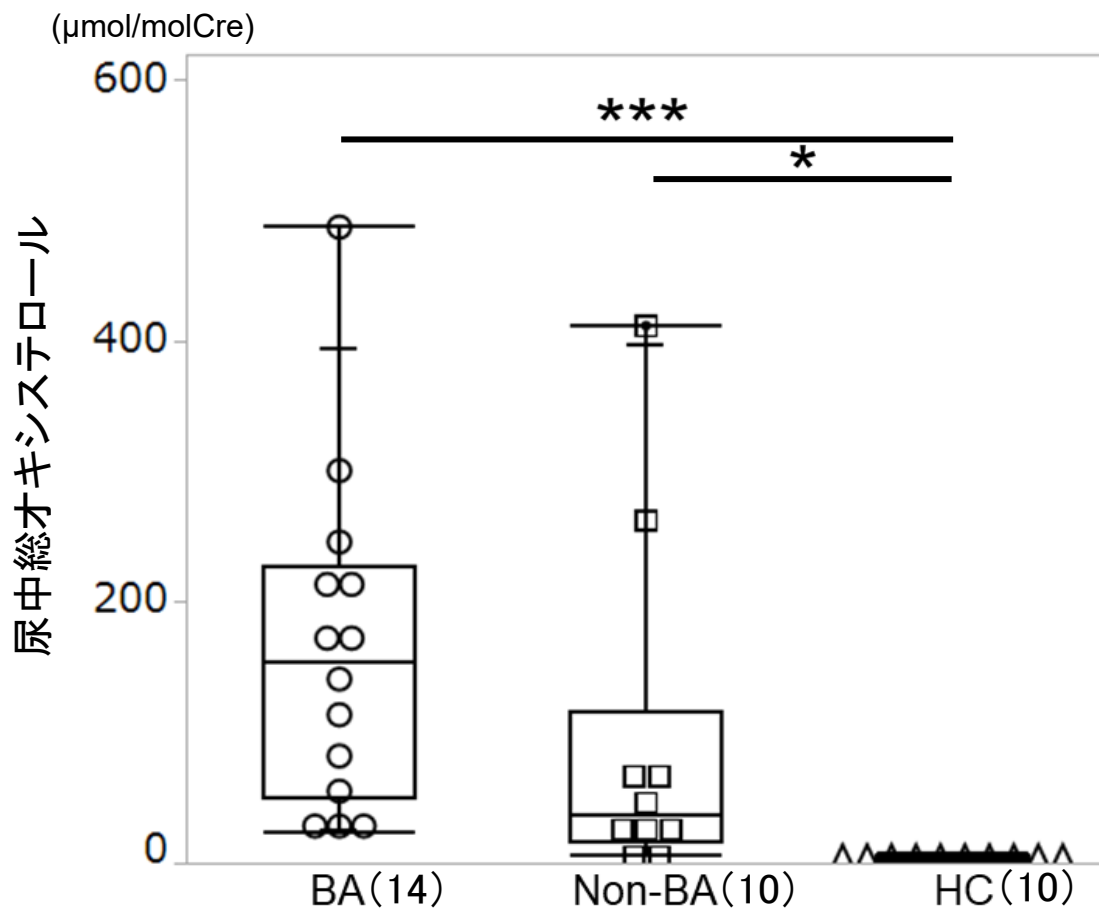


図 7A. 尿中総オキシステロール

箱の中央の水平線は中央値を示し、箱の上部および底部は四分位を示す。箱の上下の水平線はそれぞれ最大値と最小値を示す。HC 群と比較して、BA 群と Non-BA 群で有意に高かった (BA 群 vs HC 群 : $P < 0.001$ 、 Non-BA 群 vs HC 群 : $P < 0.05$)。統計学的解析は、Kruskal-Wallis 検定および Dunn の多重比較検定を行った。

*, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

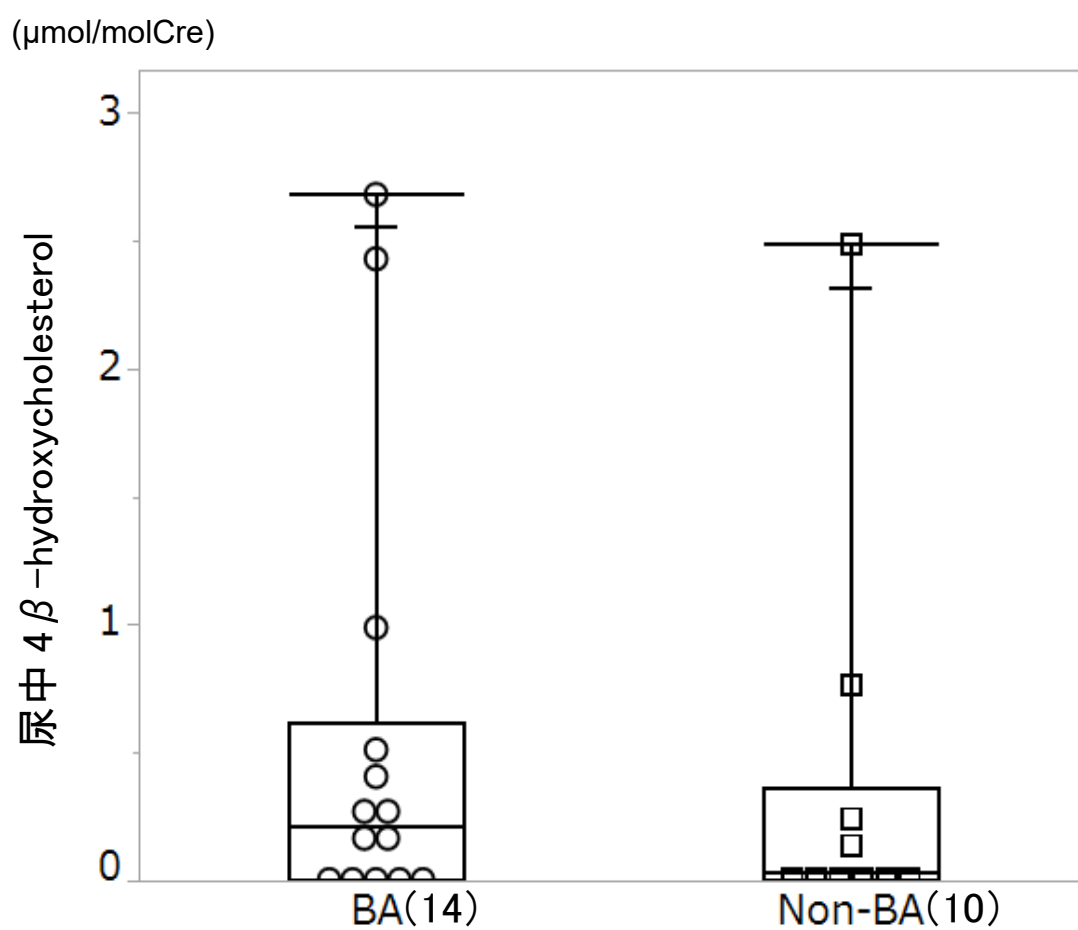


図 7B. 尿中 4β -hydroxycholesterol

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

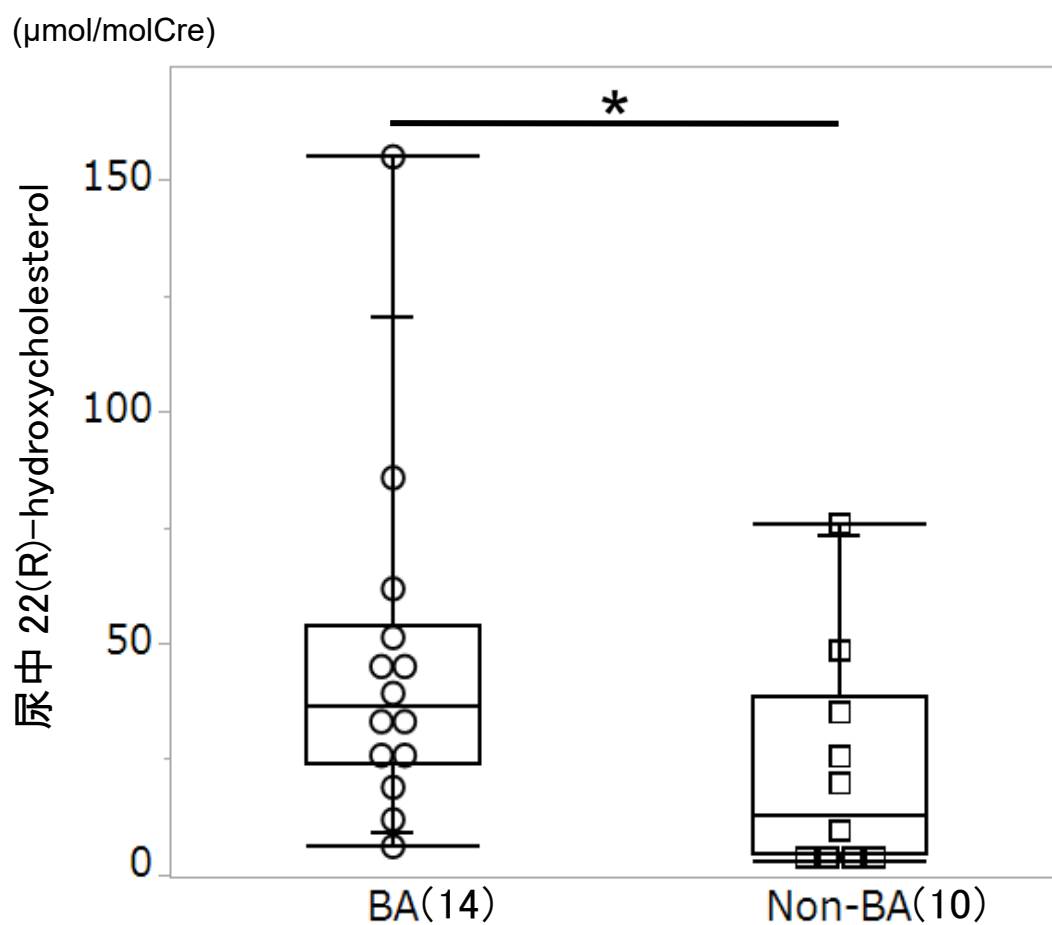


図 7C. 尿中 22(R)-hydroxycholesterol

BA 群は、Non-BA 群と比較して有意に高かった ($P < 0.05$)。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

*, $P < 0.05$.

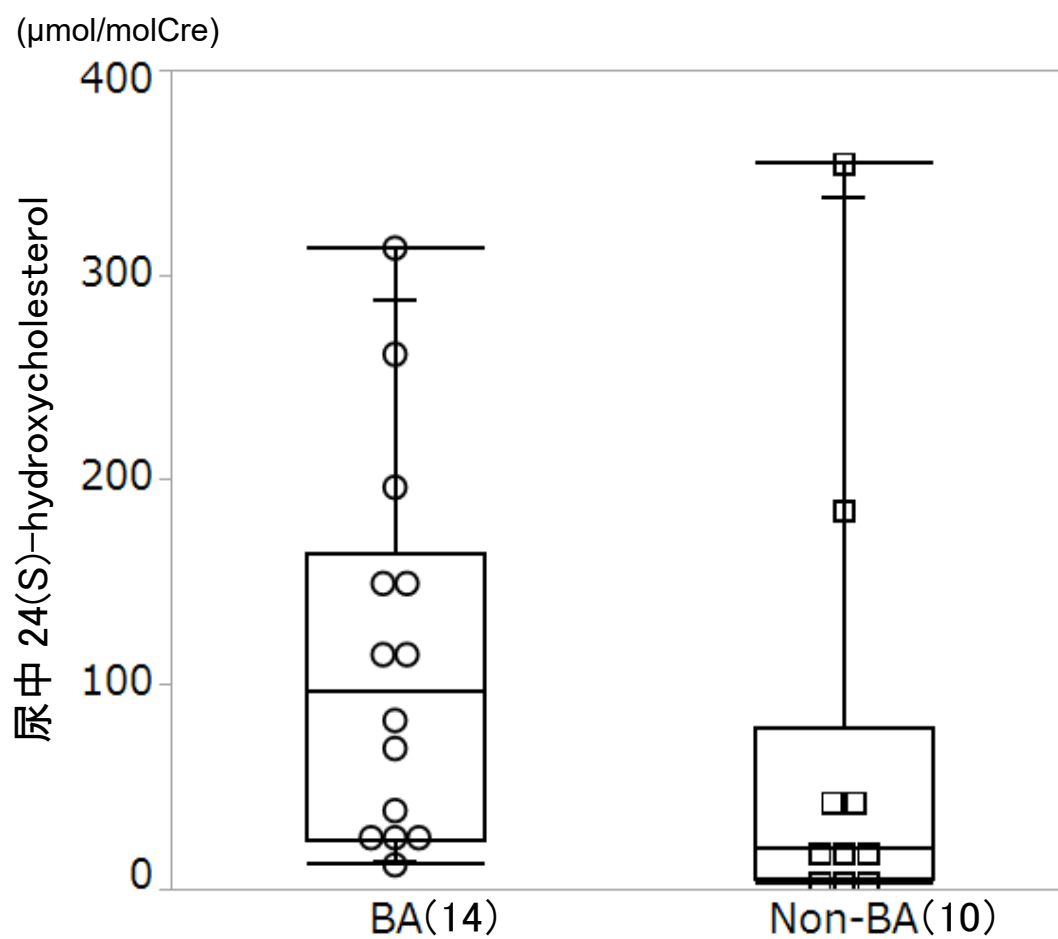


図 7D. 尿中 24(S)-hydroxycholesterol

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

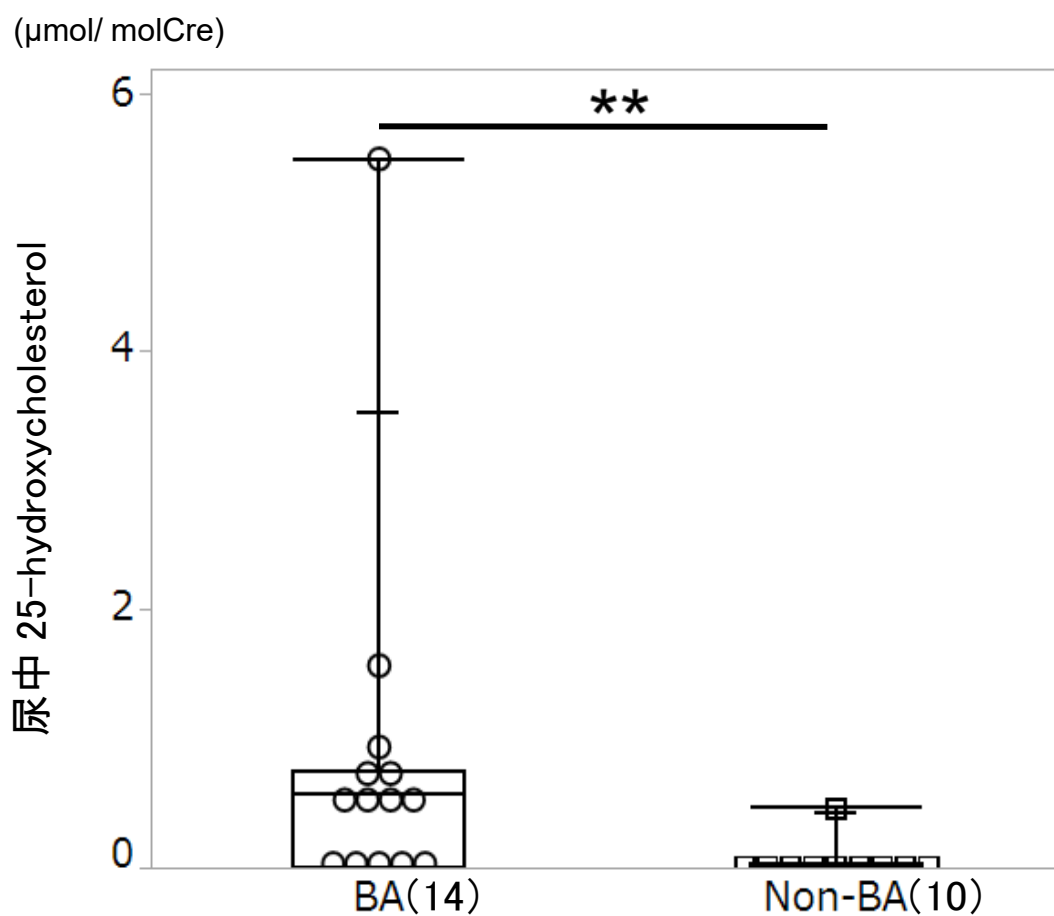


図 7E. 尿中 25-hydroxycholesterol

BA 群は、Non-BA 群と比較して有意に高かった ($P < 0.01$)。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

*, $P < 0.01$.

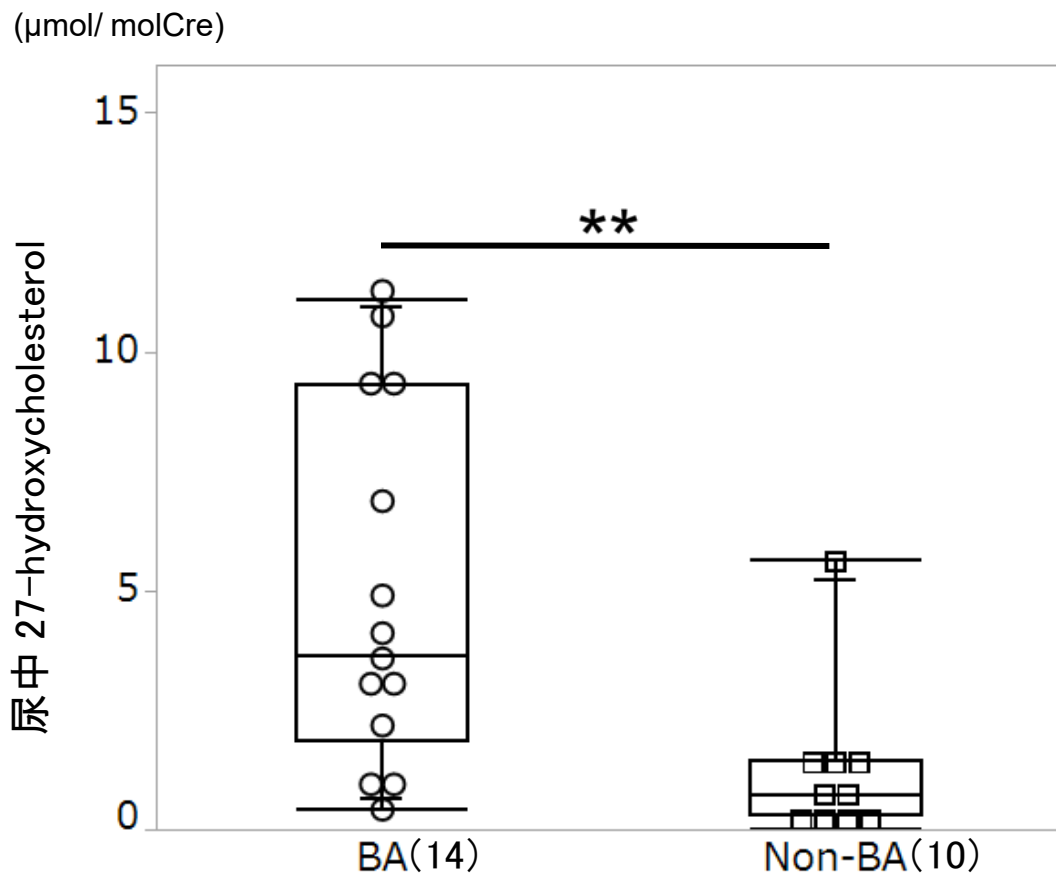


図 7F. 尿中 27-hydroxycholesterol

BA 群は、Non-BA 群と比較して有意に高かった ($P < 0.01$)。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

** , $P < 0.01$.

6.3. ROC 解析

Non-BA 群よりも BA 群で有意に高値だった尿中 22(R)-hydroxycholesterol、25-hydroxycholesterol および 27-hydroxycholesterol に対し、ROC 解析を行った。BA 群と Non-BA 群の鑑別を目的として、解析は BA 群および Non-BA 群の結果を用いて行った。AUC は、22(R)-hydroxycholesterol は 0.75 (95%信頼区間、0.54-0.96)、25-hydroxycholesterol は 0.81 (0.64-0.99)、27-hydroxycholesterol は 0.83 (0.66-1.00) であり、27-hydroxycholesterol が最も高かった (図 8A-C)。ROC 解析で算出した尿中 27-hydroxycholesterol の最適 cut off 値は、2.2 $\mu\text{mol/mol creatinine}$ だった。その cut off 値での感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率は、それぞれ 79%、90%、92%、75%だった。

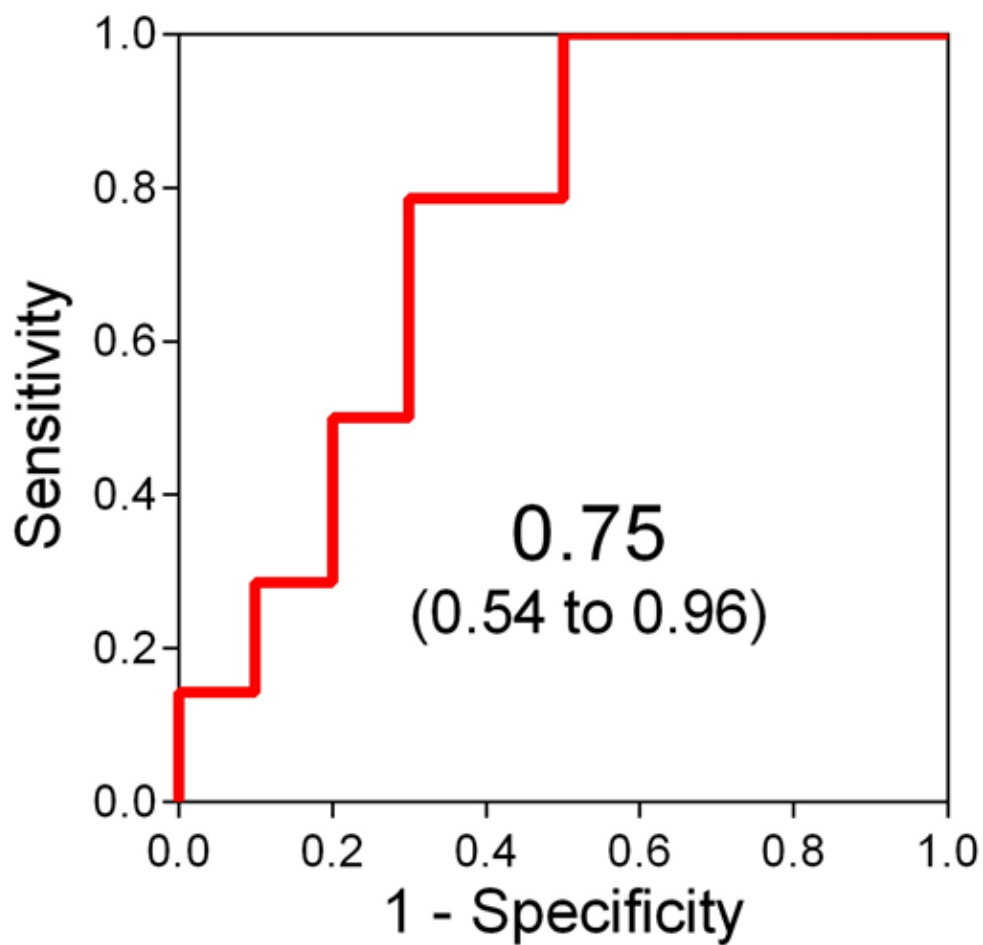


図 8A. 尿中 22(R)-hydroxycholesterol の ROC 解析

尿中 22(R)-hydroxycholesterol の cut off 値で、感度および特異度をプロットし、ROC 曲線を作成した。解析は、BA 群および Non-BA 群の結果を用いて算出した。曲線下に、AUC(95%CI)を示した。

AUC : Area under the curve、 95%CI : Confidence interval (信頼区間); ROC, receiver operating characteristics

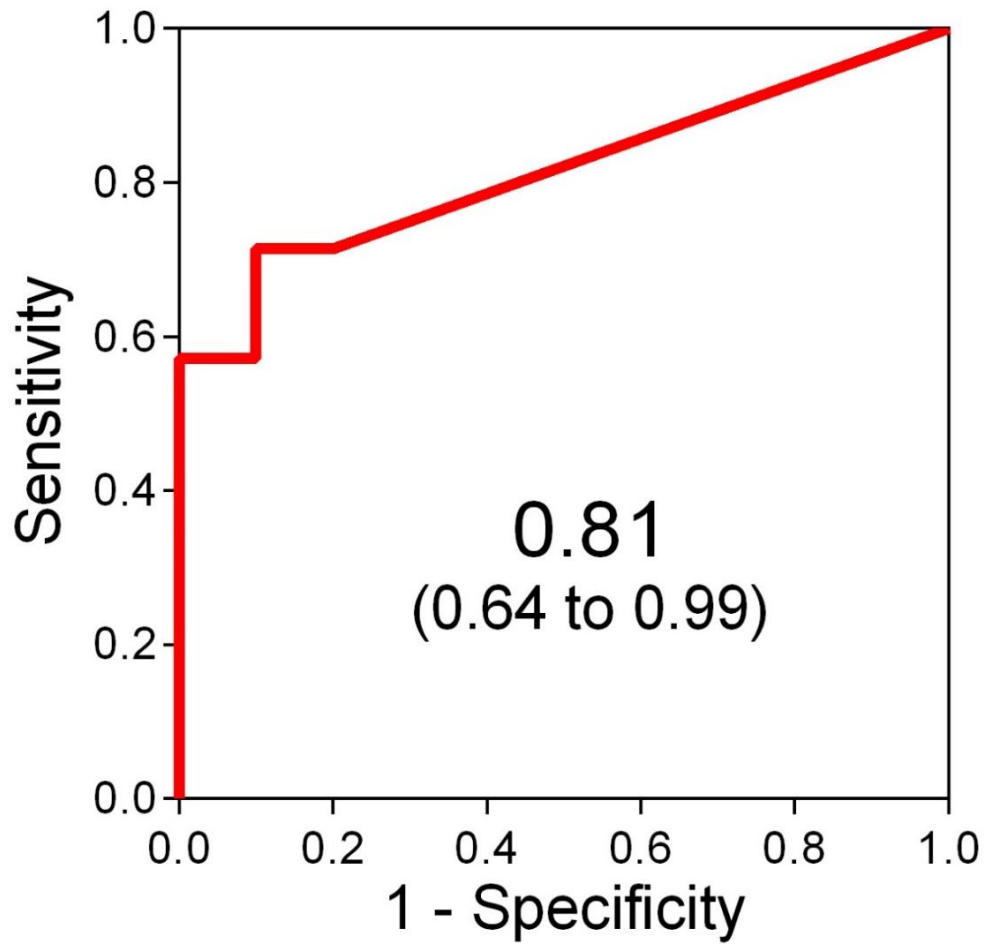


図 8B. 尿中 25-hydroxycholesterol の ROC 解析

尿中 25-hydroxycholesterol の cut off 値で、感度および特異度をプロットし、ROC 曲線を作成した。

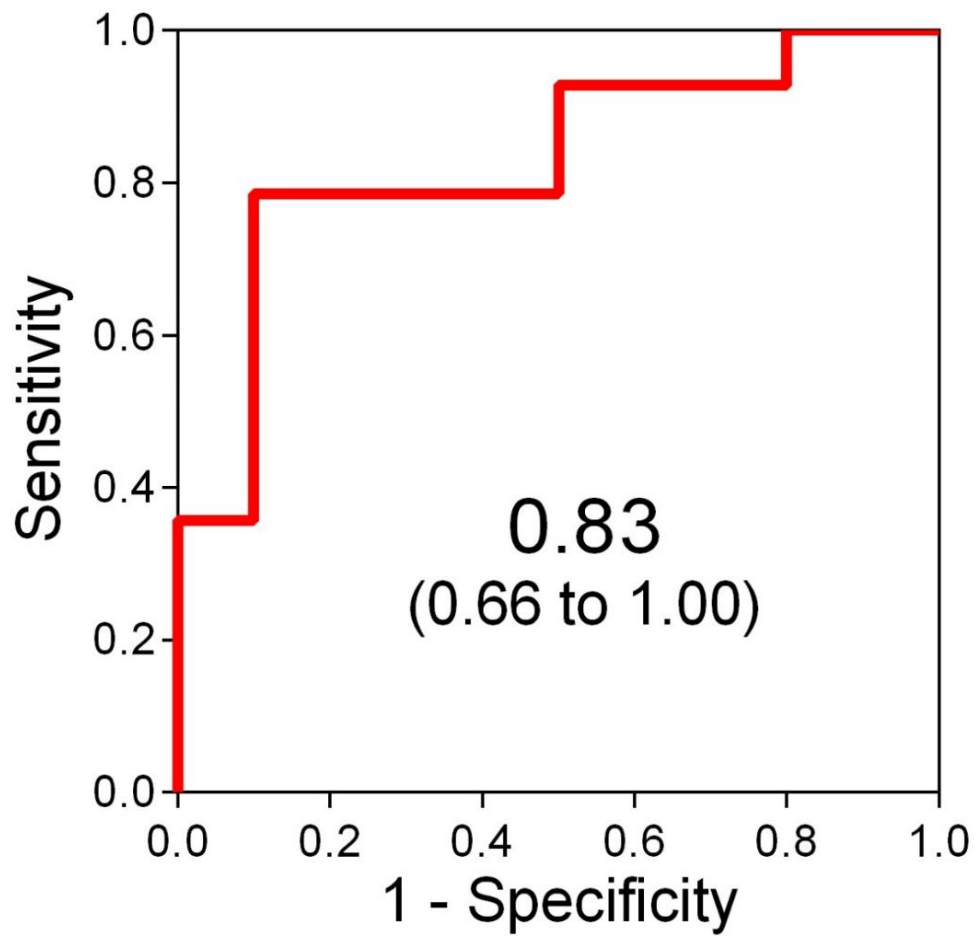


図 8C. 尿中 27-hydroxycholesterol の ROC 解析

尿中 27-hydroxycholesterol の cut off 値で、感度および特異度をプロットし、ROC 曲線を作成した。

6.4. 胆汁酸

5.3 の結果から、尿中 27-hydroxycholesterol が BA のバイオマーカーとして最も有用な可能性が示唆された。27-hydroxycholesterol は、胆汁酸合成経路の acidic pathway で合成される胆汁酸の前駆物質である。そこで、acidic pathway のみで合成される Δ^5 -3 β -ol group と Δ^5 -3 β ,7 α -diol group の血清中及び尿中濃度を BA 群と Non-BA 群で比較した。また、同様に classical pathway のみで合成される CA group および Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol group についても比較した。

6.4.1. 血清胆汁酸

Acidic pathway のみで合成される Δ^5 -3 β -ol group および Δ^5 -3 β ,7 α -diol group は BA 群と Non-BA 群の間に、有意な差はみられなかった (Δ^5 -3 β -ol group: BA 群 vs. Non-BA 群、中央値 8.2 μ mol/L; 範囲 (最小値-最大値) 0.5-17.6 vs. 11.6; 6.0-67.5、 $P=0.07$ 、 Δ^5 -3 β ,7 α -diol group: 0.7; 0.03-1.5 vs. 0.8; 0.3-2.6、 $P=0.17$) (図 9A、B)。Classical pathway のみで合成される CA group および Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol group も、BA 群と Non-BA 群の間に、有意な差はみられなかった (CA group: BA 群 vs. Non-BA 群、38.9; 2.8-68.9 vs. 40.1; 10.3-122.3、 $P=0.62$ 、 Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol group: 0.09; 0-3.5 vs. 1.9; 0-5.0、 $P=0.30$) (図 9C、9D)。

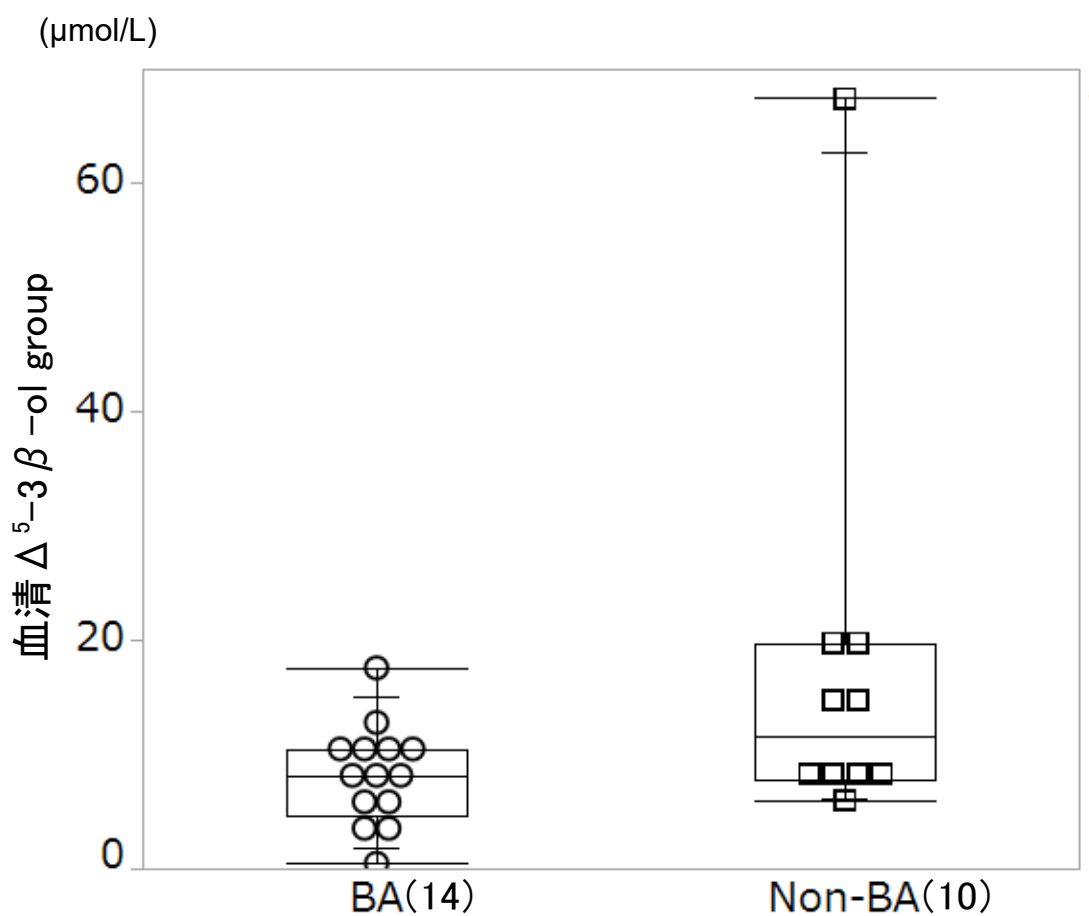


図 9A. 血清 $\Delta^5-3\beta\text{-ol}$ group

箱の中央の水平線は中央値を示し、箱の上部および底部は四分位を示す。箱の上下の水平線はそれぞれ最大値と最小値を示す。BA 群は Non-BA 群と比較して、有意差はなかったが低い傾向にあった ($P=0.07$)。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

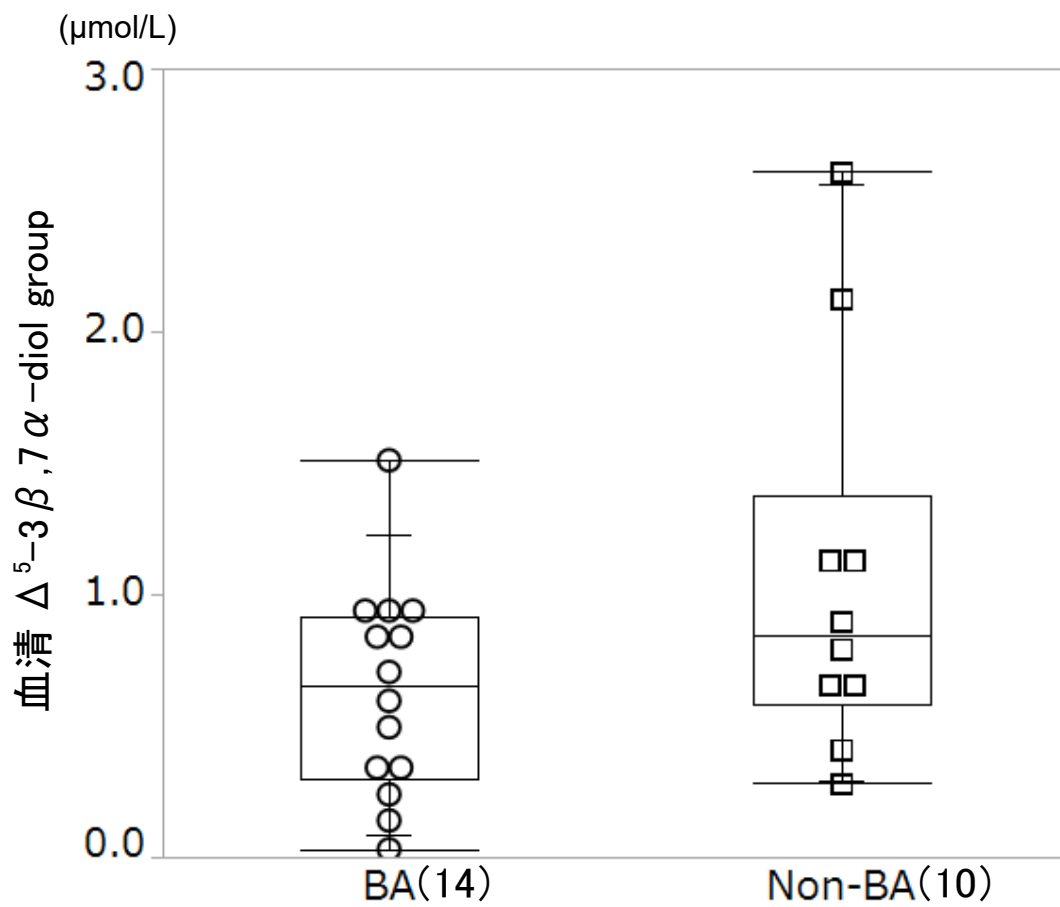


図 9B. 血清 $\Delta^5-3\beta,7\alpha$ -diol group

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

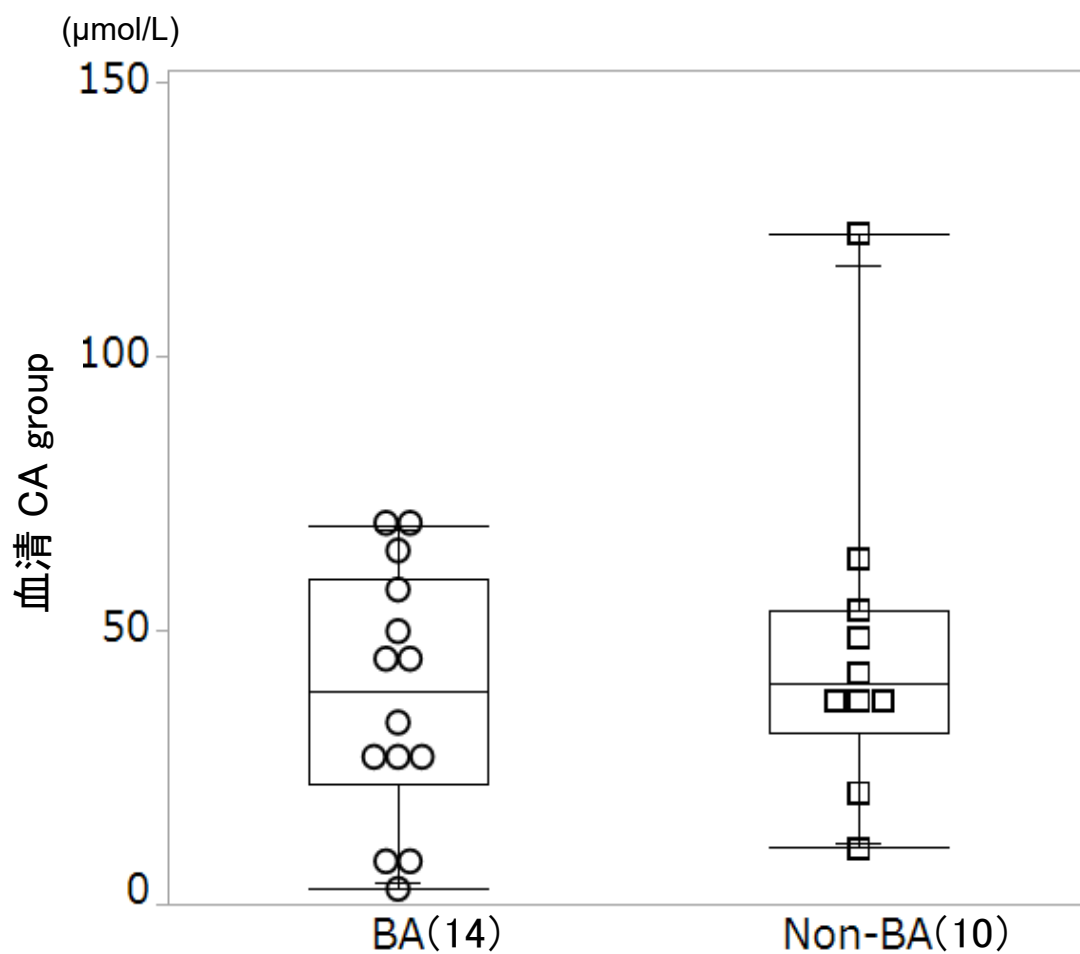


図 9C. 血清 CA group

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

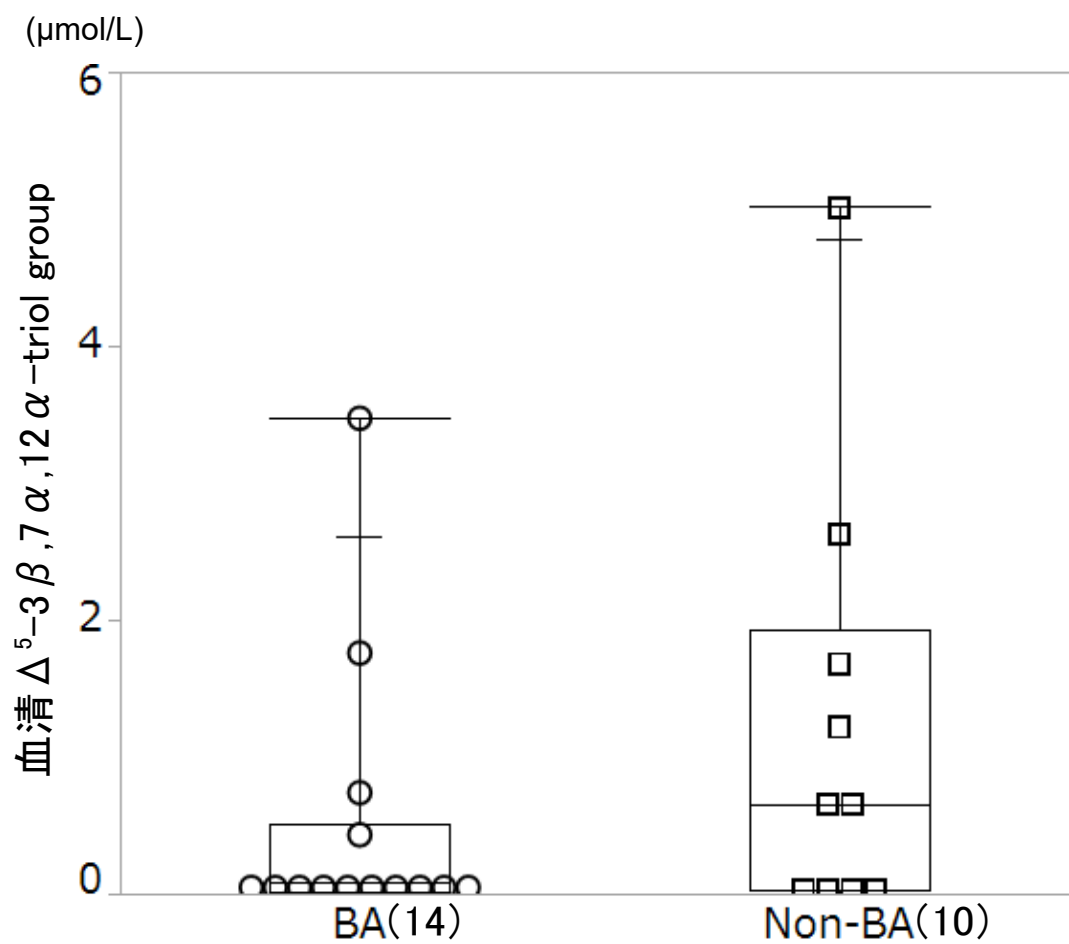


図 9D. 血清 $\Delta^5\text{-}3\beta,7\alpha,12\alpha\text{-triol group}$

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

6.4.2. 尿中胆汁酸

BA 群の Acidic pathway のみで合成される Δ^5 -3 β -ol group と Δ^5 -3 β ,7 α -diol group は Non-BA 群と比較して、有意差はなかったが、やや高い傾向にあった (Δ^5 -3 β -ol group: BA 群 vs. Non-BA 群、中央値 6.3 μ mol/mol creatinine; 範囲 (最小値-最大値) 1.0-7.8 vs. 4.5; 0.4-6.3、 $P=0.09$ 、 Δ^5 -3 β ,7 α -diol group: 0.8; 0.1-1.1 vs. 0.5; 0.1-1.3、 $P=0.07$) (図 10A、10B)。一方で、Classical pathway のみで合成される CA group および Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol group は、BA 群と Non-BA 群の間に、有意な差はみられなかった (CA group: BA 群 vs. Non-BA 群、27.4; 3.7-46.2 vs. 7.1; 0.3-50.9、 $P=0.15$ 、 Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol group: 0.2; 0.1-0.3 vs. 0.1; 0-0.9、 $P=0.14$) (図 10C、10D)。

($\mu\text{mol/mol creatinine}$)

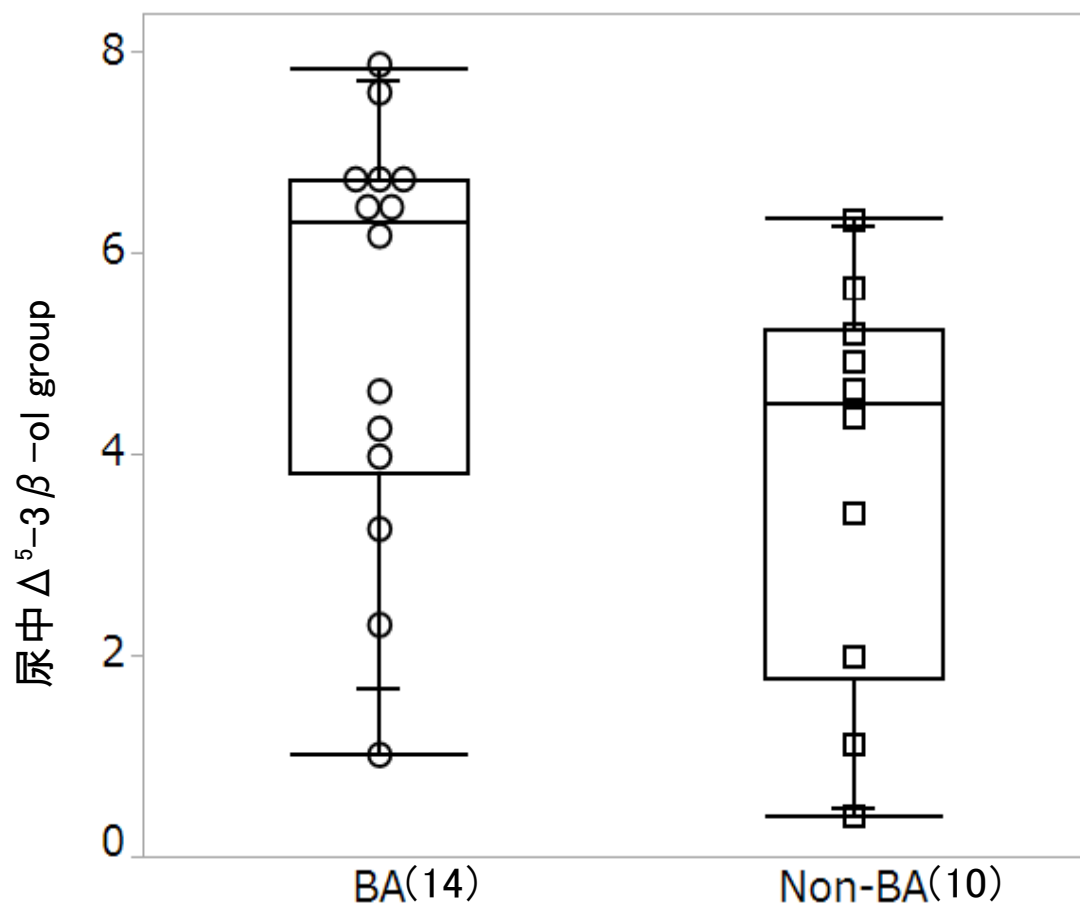


図 10A. 尿中 Δ^5 - 3β -ol group

箱の中央の水平線は中央値を示し、箱の上部および底部は四分位を示す。箱の上下の水平線はそれぞれ最大値と最小値を示す。BA 群は Non-BA 群と比較して、有意差はなかったがやや高い傾向にあった ($P=0.09$)。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

($\mu\text{mol/mol creatinine}$)

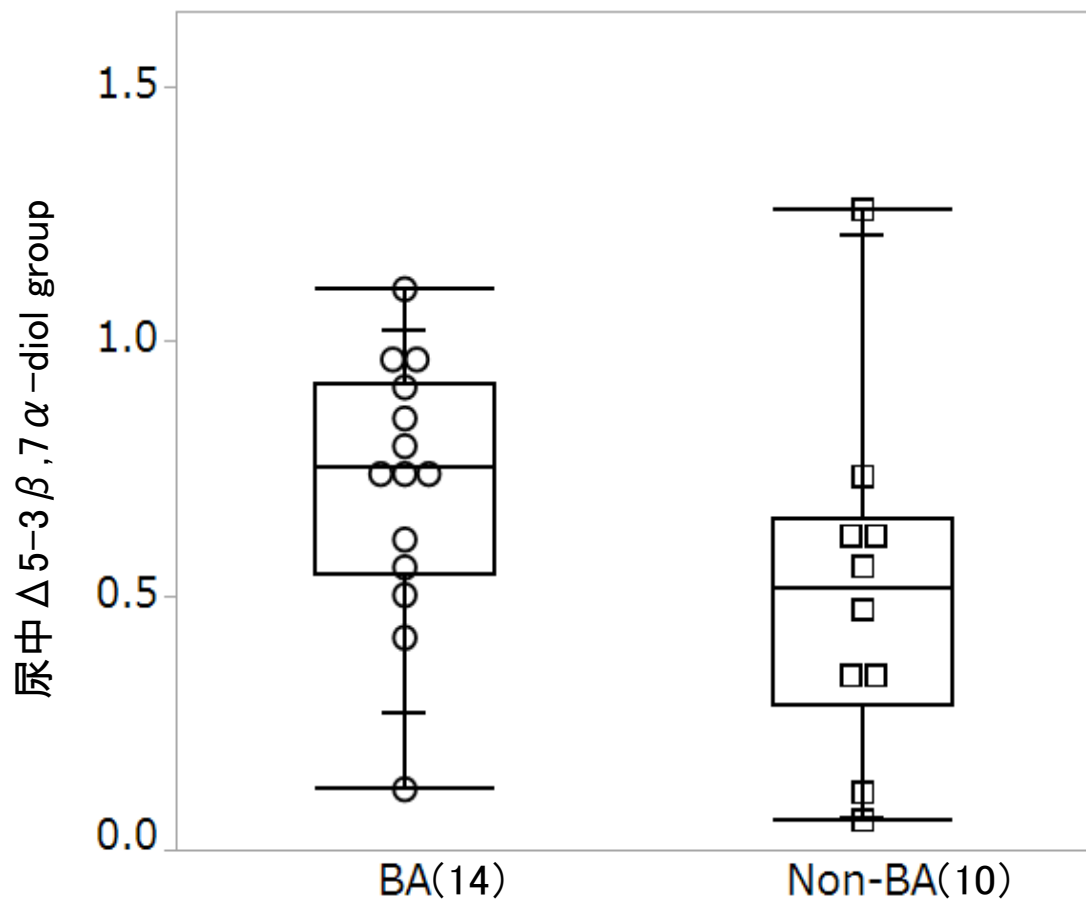


図 10B. 尿中 $\Delta^5-3\beta,7\alpha$ -diol group

BA 群は Non-BA 群と比較して、有意差はなかったが高い傾向にあった

($P=0.07$)。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

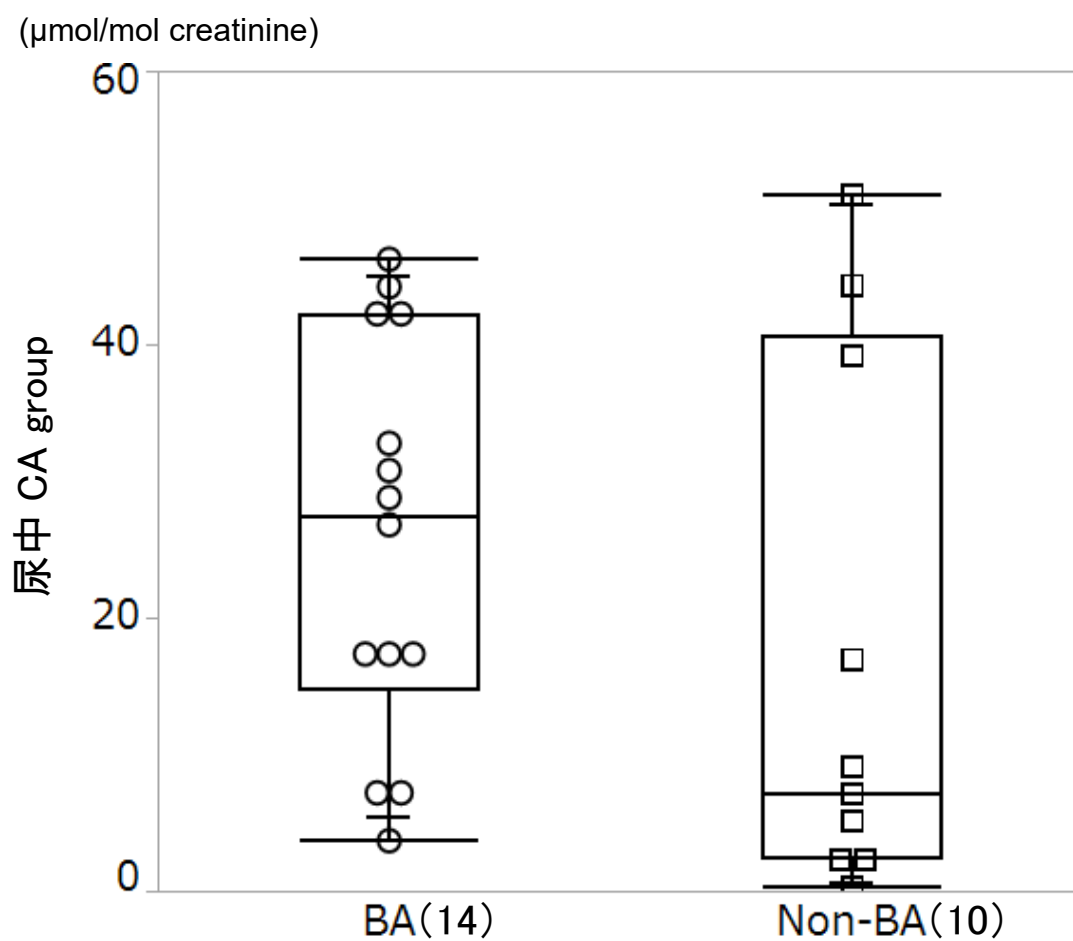


図 10C. 尿中 CA group

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

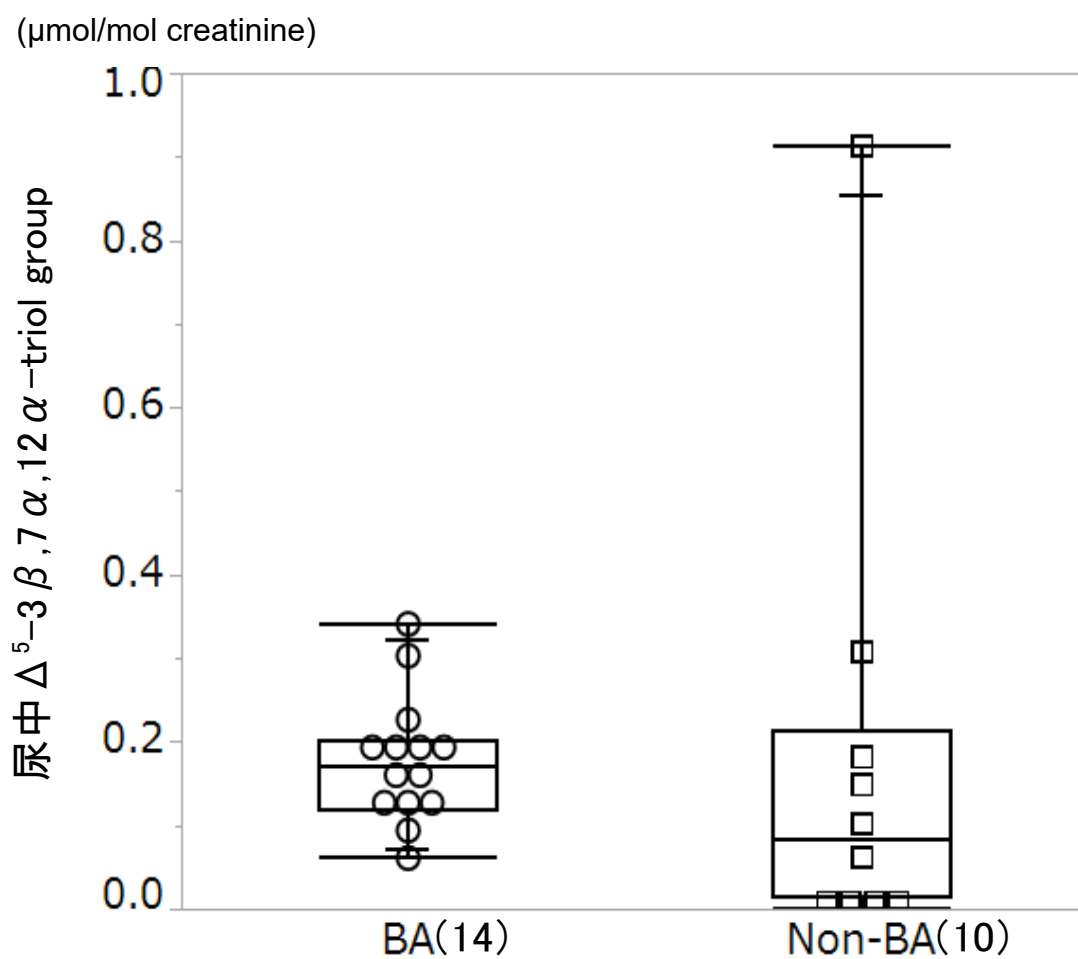


図 10D. 尿中 $\Delta^5\text{-}3\beta,7\alpha,12\alpha\text{-triol group}$

BA 群と Non-BA 群の間に、有意差は認めなかった。統計学的解析は、Mann-Whitney U 検定を行った。

6.5. 相関解析

BA 群において、尿中 27-hydroxycholesterol へ影響する因子を評価するために、相関解析を行った。日齢、ALT 値、 γ -GTP 値、総ビリルビン値、直接ビリルビン値およびコレステロール値に相関はみられなかった (図 11A-F)。

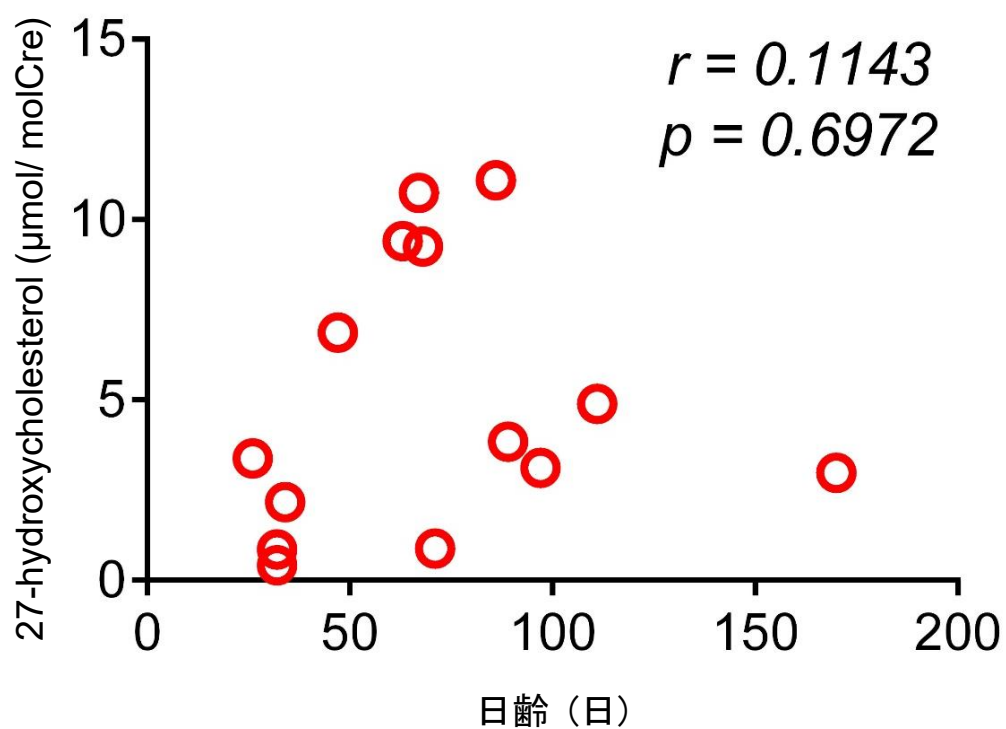


図 11A. 尿中 27-hydroxycholesterol と日齢の相関関係

有意な相関関係は認めなかった。統計解析は、Spearman の順位相関解析を行った。

r : 相関係数、 p : p 値

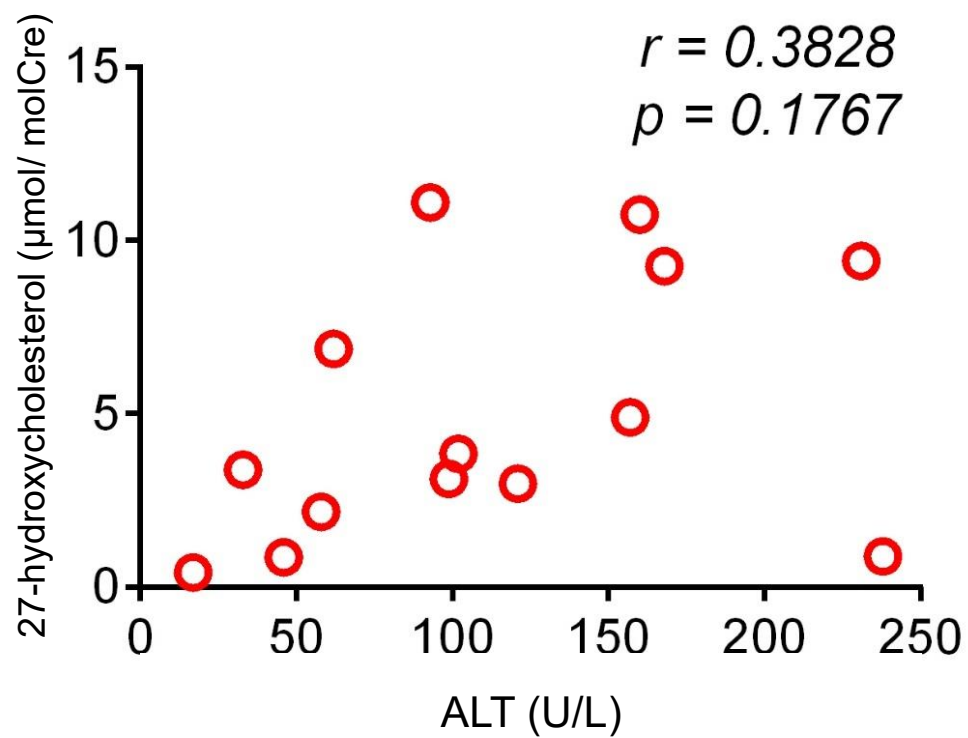


図 11B. 尿中 27-hydroxycholesterol と ALT 値の相関関係

有意な相関関係は認めなかった。統計解析は、Spearman の順位相関解析を行った。

r : 相関係数、 p : p 値

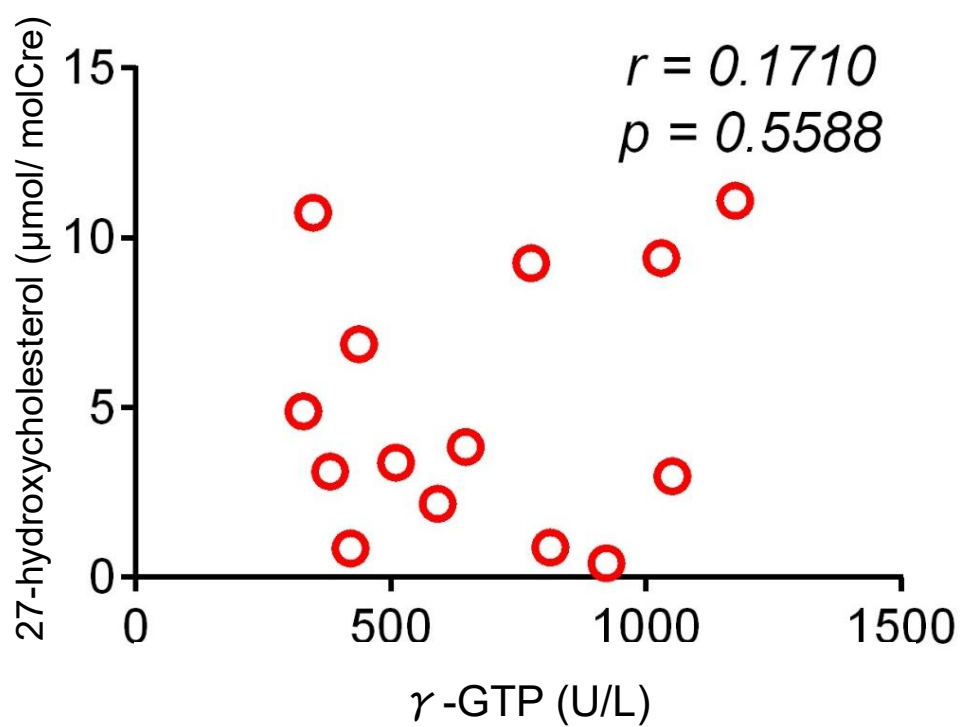


図 11C. 尿中 27-hydroxycholesterol と γ -GTP 値の相関関係

有意な相関関係は認めなかった。統計解析は、Spearman の順位相関解析を行った。

r : 相関係数、 p : p 値

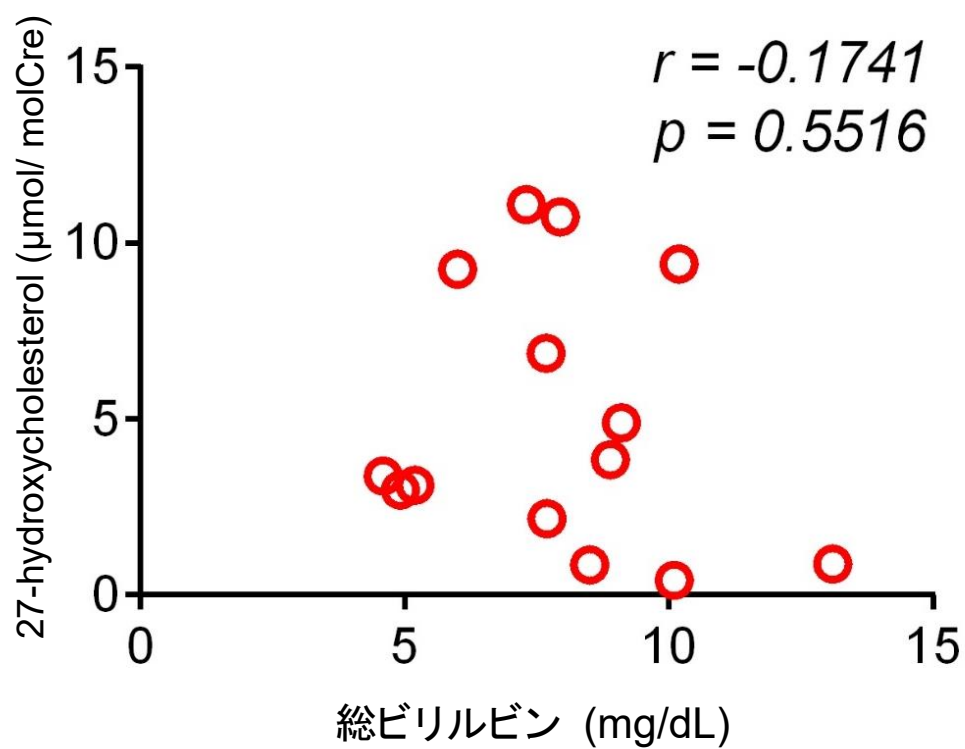


図 11D. 尿中 27-hydroxycholesterol と総ビリルビン値の相関関係

有意な相関関係は認めなかった。統計解析は、Spearman の順位相関解析を行った。

r : 相関係数、 p : p 値

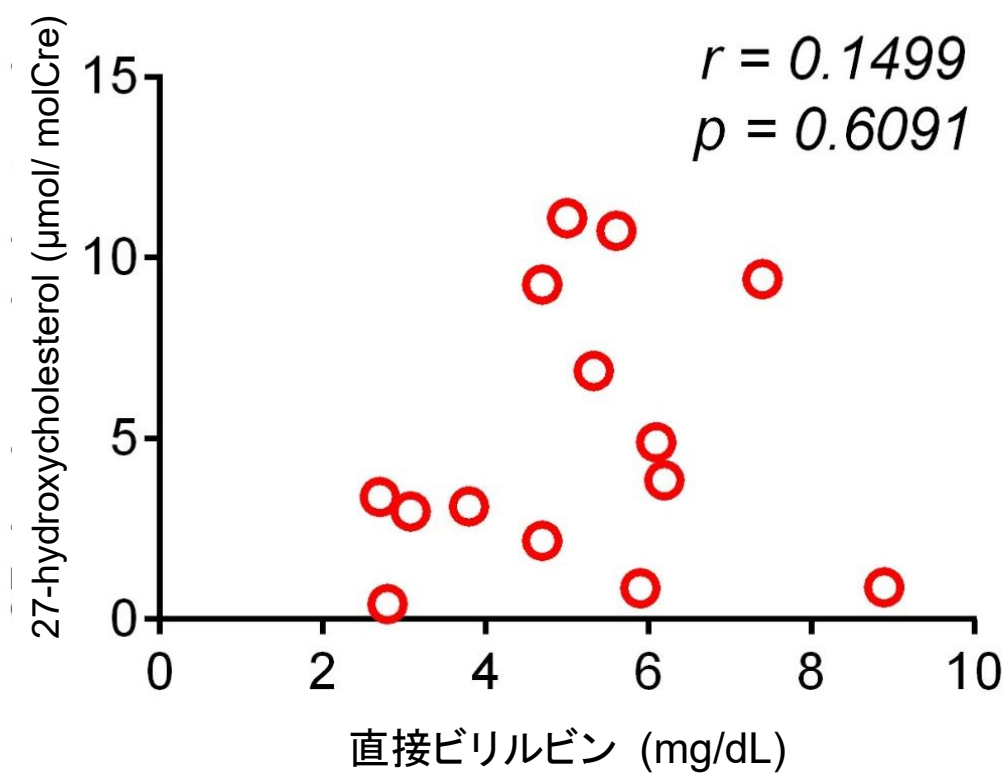


図 11E. 尿中 27-hydroxycholesterol と直接ビリルビン値の相関関係

有意な相関関係は認めなかった。統計解析は、Spearman の順位相関解析を行った。

r : 相関係数、 p : p 値

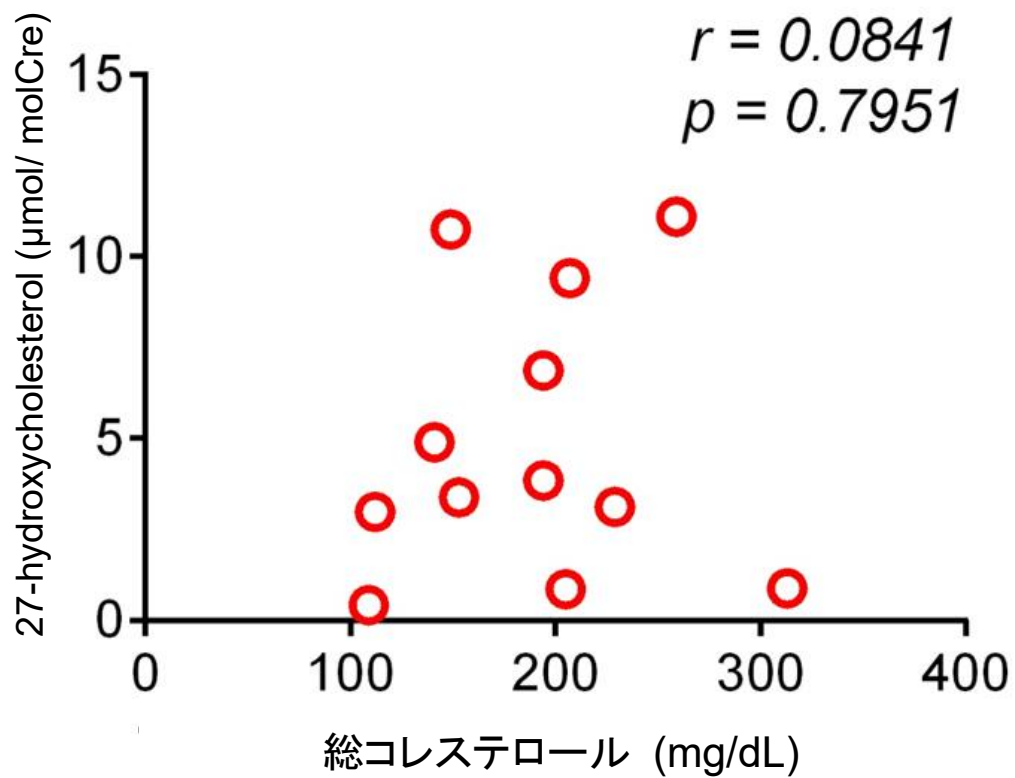


図 11F. 尿中 27-hydroxycholesterol と総コレステロール値の相関関係

有意な相関関係は認めなかった。統計解析は、Spearman の順位相関解析を行った。

r : 相関係数、 p : p 値

7. 考察

オキシステロールの内、BA 群の尿中 22(R)-hydroxycholesterol、尿中 25-hydroxycholesterol、尿中 27-hydroxycholesterol の 3 種が、Non-BA 群と比較し、有意に高値 ($p=0.05$) であった。ROC 解析を行うと、尿中 27-hydroxycholesterol の AUC が 0.83 と最も優れていた。本研究で、尿中 27-hydroxycholesterol が BA 診断に有用なバイオマーカーである可能性が示唆された。

これまで、BA に対して様々な診断マーカーやスクリーニングマーカーが検討されてきた。しかし、血清 MMP-7 の様に有用な可能性が高い診断バイオマーカーの報告はあるものの、本邦において単独で十分に BA と他の胆汁うっ滞性疾患を鑑別でき、現時点で実用化に至っているバイオマーカーは存在しない。実臨床に使用できるバイオマーカーの探索は、BA 研究において重要な課題である。今回我々は、オキシステロールに着目した。

BA の診断バイオマーカーとして、オキシステロールが有用かどうか評価するために、BA 群、Non-BA 群、および HC 群の血清と尿中オキシステロールを分析した。その結果、尿中 22(R)-hydroxycholesterol、25-hydroxycholesterol、27-hydroxycholesterol で、BA 群が Non-BA 群に比べて有意に高かった。詳細は後述するが、血清オキシステロールに関しては、27-hydroxycholesterol が BA 群で有意に低い値を示していた。しかし、後に血清の分析方法に、追加処理が必要であ

る可能性が判明した。血清の測定結果については現在検証中であり、本論文では尿中オキシステロールに重点をおいて検討した。

尿中 22(R)-hydroxycholesterol と尿中 27-hydroxycholesterol はすべての BA 患者で検出されたが、尿中 25-hydroxycholesterol は一部の患者で検出されなかった。尿中 25-hydroxycholesterol は生体内においては、非常に微量な物質であることが知られている[52,53]。尿中 27-hydroxycholesterol の方が濃度は高く、安定して検出されたことから、バイオマーカーとして適当であると考えた。また、ROC 解析では、尿中 27-hydroxycholesterol は尿中 22(R)-hydroxycholesterol よりも高い AUC だった。以上から、尿中 27-hydroxycholesterol は、尿中 22(R)-hydroxycholesterol と尿中 25-hydroxycholesterol よりも、BA の診断マーカーとして有用な可能性があると考えた。

27-hydroxycholesterol は、Cytochrome P450 Family 27 Subfamily A Member 1(CYP27A1)によって、コレステロール骨格側鎖の 27 位が水酸化されて合成される[54]。この水酸化が胆汁酸合成経路における *acidic pathway* の第一のステップとなる[55,56]。なお、CYP27A1 は *acidic pathway* の酵素としてだけでなく、*classical pathway* の中間代謝産物に対する酵素としても働く[57]。*classical pathway* において、Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Member 1 は、胆汁酸合成のフィードバックメカニズムの存在が知られている。一方で、*acidic pathway* においては、

CYP27A1 のフィードバックメカニズムは明らかになっておらず、調節機構は存在しない可能性が高い[58]。つまり、27-hydroxycholesterol は、胆汁うっ滞の影響を受けずに acidic pathway の状態を評価できるバイオマーカーであり、ビリルビン値や総胆汁酸値などの胆汁うっ滞マーカーとは異なった測定意義を持つ可能性がある。

Crosignani らは、慢性肝疾患患者の 27-hydroxycholesterol を測定し、acidic pathway は保たれるが、classical pathway は抑制されていると報告している[59]。また、重度の肝線維化状態では、classical pathway は抑制され、acidic pathway は亢進していると報告されている[60]。27-hydroxycholesterol は、acidic pathway の状態と線維化の程度を反映していると報告されている[56,60]。BA は、肝線維化が他の胆汁うっ滞性疾患よりも急速に進行していることが知られている[7,61]。以上から、BA 群における尿中 27-hydroxycholesterol 値の上昇は、BA の強い肝線維化により acidic pathway が亢進状態にあることを反映している可能性がある。

27-hydroxycholesterol は acidic pathway で合成される胆汁酸の前駆物質である。そこで、acidic pathway のみで合成される胆汁酸を測定することで、acidic pathway の状態を評価し[57]、本研究のデータを裏付ける結果が得られるかどうか検証した。 Δ^5 -3 β -ol group と Δ^5 -3 β ,7 α -diol group を測定し、BA 群と Non-BA 群で比較検討した。BA 群の尿中 Δ^5 -3 β -ol group と尿中 Δ^5 -3 β ,7 α -diol group は Non-BA 群と比

較して、有意差はなかったものの、比較的高い値を示した(図 10A、10B)。この結果は、acidic pathway が亢進状態にあり、尿中 27-hydroxycholesterol が BA 群で増加している結果を支持するものと考ええる。

Acidic pathway が亢進状態にあることと同時に、classical pathway が抑制状態にあることも示せば、より本研究結果を支持できると考えた。そこで、我々は classical pathway のみで合成される CA group と Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -triol group を測定した。しかし、BA 群と Non-BA 群において有意差は認めなかった。Classical pathway の第一のステップである 7 α -hydroxycholesterol、および類似構造を持ち活性酸素種 (Reactive Oxygen Species) によってコレステロールが酸化されて生成する、7 β -hydroxycholesterol と 7oxo-hydroxycholesterol の測定を試みた。しかし、これら 3 種のオキシステロールは、 -80°C かつ無酸素下で保存しないと容易に酸化されてしまうため、安定した測定値を得ることができなかった[38,45]。また、classical pathway の状態の評価に使用されることが多い 7 α -Hydroxy-4-cholesten-3-one(C4)[62]については、内部標準物質を持ち合わせていないことから、測定できなかった。今後は、7 α -hydroxycholesterol、7 β -hydroxycholesterol、7 oxo-hydroxycholesterol の安定した測定法確立を検討するとともに、C4 を測定し、classical pathway の状態についても評価していきたい。

本研究では、血清ではなく尿中の 27-hydroxycholesterol がバイオマーカーとし

て有用な可能性が示唆された。生体に対して毒性が強い物質は積極的に排出されることが多い。実際に、毒性の強い胆汁酸は、硫酸抱合により尿中に積極的に排泄する機構の存在が報告されている[40,63]。オキシステロールも同様であり、硫酸抱合による尿中排泄が報告されている[36,37]。今後は、各種オキシステロールの硫酸抱合体や多水酸化体などを測定し、尿中への排泄機構についても詳細に評価していきたい。

今回、血清オキシステロールについても検討した。血清 27-hydroxycholesterol は、BA 群は Non-BA 群と比較して有意に低かった。その原因として、血清オキシステロールの前処理方法に要因があったと推察された。胆汁酸には、硫酸抱合体や水酸化抱合体といった様々な抱合体が存在する。同様に、オキシステロールにも様々な抱合体が含まれている。我々は、尿中オキシステロールは、抱合体が多く含まれているため、酵素加水分解処理を行った[36,38,48,49]。しかし、血清に対して、酵素加水分解処理を行わなかった。肝疾患症例の血清オキシステロール中に硫酸抱合体が比較的多く含まれるとの報告がある[37]。この既報を勘案すると、各種抱合体の存在を無視できないと考えられた。硫酸抱合体を含めたオキシステロールを定量する際に、血清に対しても酵素加水分解を行って比較検証すれば、非抱合型オキシステロール濃度と異なったデータが得られたかもしれない。本研究において、血清オキシステロールに対して BA のバイオマーカーとして

の有用性を評価することは、困難であると判断した。今後は、血清に対しても酵素加水分解処理を行い、硫酸抱合体を含めたオキシステロールを定量し、検証する予定である。

これまで、BA と他の胆汁うっ滞性疾患を鑑別するために、様々な胆汁酸が検討されてきた。BA の胆汁酸分析では、尿中硫酸抱合体やケト型胆汁酸に差は存在しせず、非特異的な分析値を示す。診断が遅れて非代償性肝硬変に進展し、腹水が存在するような症例では、CDCA が増加している[64]。Zhou らは、新生児の乾燥濾紙血を用いて TCA 値を測定し、BA のスクリーニングマーカーとしての有用性を報告した (AUC 0.820、感度 79.1%、特異度 62.5%) [43]。Golden らは、BA の血清 GCDCA 値が他の胆汁うっ滞性疾患との鑑別に有用である可能性について報告した (AUC、0.875 ; 感度、100% ; 特異度、83.3%) [11]。しかし、これらの研究は様々な抱合型が混在しており、BA における胆汁酸代謝は明らかになっていないのが現状である。胆汁酸のみで BA を診断することは困難と考える。今回我々は、オキシステロールの分析で得られた結果を検証するために、胆汁酸合成経路に基づいて胆汁酸を分類して、胆汁酸分析を行った。Acidic pathway のみで合成される Δ^5 -3 β -ol group と Δ^5 -3 β ,7 α -diol group は、BA 群で高い傾向を認めた。各種抱合体を包括的に含み、合成経路に基づいて胆汁酸を検討する方法は、胆汁酸研究において初めてのコンセプトである。

BA 群の尿中 27-hydroxycholesterol と日齢および血液検査結果の相関解析を行った。尿中 27-hydroxycholesterol はいずれの項目でも相関関係を認めなかった。最近報告された高い感度・特異度を持つ血清 MMP-7 は、日齢と正の相関を示すと報告されている[26]。BA は早期診断が重要であるため、バイオマーカーとしては、日齢の影響を受けないことが望ましい。我々の測定した尿中 27-hydroxycholesterol は、日齢と相関がみられなかったことから、バイオマーカーとしてより有用な可能性が考えられる。しかし、本研究は症例数が少ないので、血清 MMP-7 に対しての優位性を示すことはできない。血清 MMP-7 が BA と Non-BA の鑑別において非常に良好な AUC 値を示していることを勘案すると[25-28]、尿中 27-hydroxycholesterol を血清 MMP-7 などの他の有用なマーカーと組み合わせることは、BA 診断の向上を目指す上で重要な手法と考える。今後、血清 MMP-7 などの他のマーカーと組み合わせることも検討していきたい。

尿中 27-hydroxycholesterol は、尿検体であることが、バイオマーカーとして有用な理由の一つである。尿中 27-hydroxycholesterol の測定に必要な尿量は 200 μ L のみである。検体採取には、尿パックや尿道カテーテルが使用される。これらの方法は、検体採取の難しい新生児や乳児において、血液採取や末梢動脈ラインの挿入よりも侵襲性が低い。尿は十分な検体量を容易に採取でき、侵襲性の点で有用である[65,66]。

尿中 27-hydroxycholesterol は、BA との関連性が示唆された。その理由に、BA の肝線維化との関連が推察された。そこで、葛西手術後の肝移植の必要性といった予後予測に有用な可能性がある。例えば、BA は術後に胆汁うっ滞が軽度であるにも関わらず、肝線維化の進行が強い症例が存在する。そういった症例に、尿中 27-hydroxycholesterol を測定することで、肝線維化状態の評価ができる可能性がある。今後は、BA の葛西術後 2 か月、6 か月、1 年、2 年といった頻度で、尿中 27-hydroxycholesterol を含むオキシステロールを測定し、肝移植の必要性の指標として有用かどうか検討していく予定である。

本研究の限界について述べる。第一に、本研究は多施設共同研究であるが、BA 群と Non-BA 群の症例数が少ない。本邦では胆道閉鎖症の症例数は年間 80~100 例である。今回参加している施設では、1 施設当たり年間 1~5 例である。また、尿検体なので、取り漏らしもあり、それらの症例は除外せざるを得なかった。しかし、この症例数であっても、本邦における BA の多施設共同研究としては、最大規模の研究であり、報告する意義はあると考える。今後、症例数を増やして、更なる検討を目指していきたい。次に、我々の検体は日本人のみであり、本データを他のアジア諸国や異なる民族には使用できない可能性がある。前述の如く血清 MMP-7 は非常に高い感度・特異度であったが、後の報告と比較すると cut off 値は大きく異なっており、人種による違いが示唆された[25-28]。そして、前

述したが、我々は血清検体の酵素加水分解を行っていなかったために、硫酸抱合体を含めたオキシステロールを定量できていなかった。症例数を増やし、血清検体に対する酵素加水分解を行い、更に検証を行う必要がある。

8. 結論

今回我々は、BA 患者におけるオキステロール分析を初めて報告した。尿中の 27-hydroxycholesterol が BA 診断に有用である可能性が示唆された。

9. 引用文献

- 1 Rauschenfels, S., Krassmann, M., Al-Masri, A. N., Verhagen, W., Leonhardt, J., Kuebler, J. F. & Petersen, C. Incidence of hepatotropic viruses in biliary atresia. *Eur. J. Pediatr.* **168**, 469-476 (2009).
- 2 Lorent, K., Gong, W., Koo, K. A., Waisbourd-Zinman, O., Karjoo, S., Zhao, X., Sealy, I., Kettleborough, R. N., Stemple, D. L., Windsor, P. A., Whittaker, S. J., Porter, J. R., Wells, R. G. & Pack, M. Identification of a plant isoflavonoid that causes biliary atresia. *Sci. Transl. Med.* **7**, 286ra267 (2015).
- 3 Tan, C. E. & Moscoso, G. J. The developing human biliary system at the porta hepatis level between 11 and 25 weeks of gestation: a way to understanding biliary atresia. Part 2. *Pathol. Int.* **44**, 600-610 (1994).
- 4 Tsai, E. A., Grochowski, C. M., Loomes, K. M., Bessho, K., Hakonarson, H., Bezerra, J. A., Russo, P. A., Haber, B. A., Spinner, N. B. & Devoto, M. Replication of a GWAS signal in a Caucasian population implicates ADD3 in susceptibility to biliary atresia. *Hum. Genet.* **133**, 235-243 (2014).
- 5 Harada, K., Sato, Y., Itatsu, K., Isse, K., Ikeda, H., Yasoshima, M., Zen, Y., Matsui, A. & Nakanuma, Y. Innate immune response to double-stranded RNA in biliary epithelial cells is associated with the pathogenesis of biliary atresia. *Hepatology* **46**,

- 1146-1154 (2007).
- 6 Bezerra, J. A., Wells, R. G., Mack, C. L., Karpen, S. J., Hoofnagle, J. H., Doo, E. & Sokol, R. J. BILIARY ATRESIA: Clinical and Research Challenges for the 21(st) Century. *Hepatology* (2018).
- 7 Hartley, J. L., Davenport, M. & Kelly, D. A. Biliary atresia. *Lancet* **374**, 1704-1713 (2009).
- 8 Zahm, A. M., Hand, N. J., Boateng, L. A. & Friedman, J. R. Circulating microRNA is a biomarker of biliary atresia. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **55**, 366-369 (2012).
- 9 Song, Z., Dong, R., Fan, Y. & Zheng, S. Identification of serum protein biomarkers in biliary atresia by mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **55**, 370-375 (2012).
- 10 Zhao, D., Han, L., He, Z., Zhang, J. & Zhang, Y. Identification of the plasma metabolomics as early diagnostic markers between biliary atresia and neonatal hepatitis syndrome. *PLoS One* **9**, e85694 (2014).
- 11 Golden, J., Zagory, J. A., Fenlon, M., Goodhue, C. J., Xiao, Y., Fu, X., Wang, K. S. & Gayer, C. P. Liquid chromatography-mass spectroscopy in the diagnosis of biliary atresia in children with hyperbilirubinemia. *J. Surg. Res.* **228**, 228-237 (2018).
- 12 Cabrera-Abreu, J. C. & Green, A. Gamma-glutamyltransferase: value of its

- measurement in paediatrics. *Ann. Clin. Biochem.* **39**, 22-25 (2002).
- 13 Rendón-Macías, M. E., Villasís-Keever, M. A., Castañeda-Muciño, G. & Sandoval-Mex, A. M. Improvement in accuracy of gamma-glutamyl transferase for differential diagnosis of biliary atresia by correlation with age. *Turk. J. Pediatr.* **50**, 253-259 (2008).
- 14 Chen, X., Dong, R., Shen, Z., Yan, W. & Zheng, S. Value of Gamma-Glutamyl Transpeptidase for Diagnosis of Biliary Atresia by Correlation With Age. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **63**, 370-373 (2016).
- 15 Dillman, J. R., DiPaola, F. W., Smith, S. J., Barth, R. A., Asai, A., Lam, S., Campbell, K. M., Bezerra, J. A., Tiao, G. M. & Trout, A. T. Prospective Assessment of Ultrasound Shear Wave Elastography for Discriminating Biliary Atresia from other Causes of Neonatal Cholestasis. *J. Pediatr.* **212**, 60-65.e63 (2019).
- 16 Nguyen, M., Dossa, A., Zagory, J., Golden, J., Roberts, A., Fu, X., Wang, K. & Gayer, C. P. Liquid chromatography-mass spectroscopy as a tool in the rapid diagnosis of biliary atresia: a pilot study. *J. Pediatr. Surg.* **51**, 923-926 (2016).
- 17 Peng, X., Yang, L., Liu, H., Pang, S., Chen, Y., Fu, J., Chen, Y., Wen, Z., Zhang, R., Zhu, B., Yu, J. & Invernizzi, P. Identification of Circulating MicroRNAs in Biliary Atresia by Next-Generation Sequencing. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **63**, 518-523

- (2016).
- 18 Dong, R., Shen, Z., Zheng, C., Chen, G. & Zheng, S. Serum microRNA microarray analysis identifies miR-4429 and miR-4689 are potential diagnostic biomarkers for biliary atresia. *Sci. Rep.* **6**, 21084 (2016).
- 19 Chen, P., Zhong, Z., Jiang, H., Chen, H., Lyu, J. & Zhou, L. Th17-associated cytokines multiplex testing indicates the potential of macrophage inflammatory protein-3 alpha in the diagnosis of biliary atresia. *Cytokine* **116**, 21-26 (2019).
- 20 Behairy, O. G., Elsadek, A. E., Behiry, E. G., Elhenawy, I. A., Shalan, N. H. & Sayied, K. R. Clinical Value of Serum Interleukin-33 Biomarker in Infants With Neonatal Cholestasis. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **70**, 344-349 (2020).
- 21 Ukarapol, N., Wongsawasdi, L., Ong-Chai, S., Riddhiputra, P. & Kongtawelert, P. Hyaluronic acid: additional biochemical marker in the diagnosis of biliary atresia. *Pediatr. Int.* **49**, 608-611 (2007).
- 22 Muraji, T., Harada, T., Miki, K., Moriuchi, T., Obatake, M. & Tsugawa, C. Urinary sulfated bile acid concentrations in infants with biliary atresia and breast-feeding jaundice. *Pediatr. Int.* **45**, 281-283 (2003).
- 23 Li, W. W., Yang, Y., Dai, Q. G., Lin, L. L., Xie, T., He, L. L., Tao, J. L., Shan, J. J. & Wang, S. C. Non-invasive urinary metabolomic profiles discriminate biliary atresia

- from infantile hepatitis syndrome. *Metabolomics* **14**, 90 (2018).
- 24 Fukuoka, T., Bessho, K., Tachibana, M., Satomura, Y., Konishi, A., Yasuda, K., Kimura, T., Hasegawa, Y., Ueno, T., Miyoshi, Y. & Ozono, K. Total Bile Acid Concentration in Duodenal Fluid Is a Useful Preoperative Screening Marker to Rule Out Biliary Atresia. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **67**, 383-387 (2018).
- 25 Lertudomphonwanit, C., Mourya, R., Fei, L., Zhang, Y., Gutta, S., Yang, L., Bove, K. E., Shivakumar, P. & Bezerra, J. A. Large-scale proteomics identifies MMP-7 as a sentinel of epithelial injury and of biliary atresia. *Sci. Transl. Med.* **9** (2017).
- 26 Yang, L., Zhou, Y., Xu, P. P., Mourya, R., Lei, H. Y., Cao, G. Q., Xiong, X. L., Xu, H., Duan, X. F., Wang, N., Fei, L., Chang, X. P., Zhang, X., Jiang, M., Bezerra, J. A. & Tang, S. T. Diagnostic Accuracy of Serum Matrix Metalloproteinase-7 for Biliary Atresia. *Hepatology* **68**, 2069-2077 (2018).
- 27 Jiang, J., Wang, J., Shen, Z., Lu, X., Chen, G., Huang, Y., Dong, R. & Zheng, S. Serum MMP-7 in the Diagnosis of Biliary Atresia. *Pediatrics* **144** (2019).
- 28 Wu, J. F., Jeng, Y. M., Chen, H. L., Ni, Y. H., Hsu, H. Y. & Chang, M. H. Quantification of Serum Matrix Metallopeptide 7 Levels May Assist in the Diagnosis and Predict the Outcome for Patients with Biliary Atresia. *J. Pediatr.* **208**, 30-37.e31 (2019).
- 29 Davenport, M. Biliary atresia. *Semin. Pediatr. Surg.* **14**, 42-48 (2005).

- 30 Davenport, M. Biliary atresia: clinical aspects. *Semin. Pediatr. Surg.* **21**, 175-184 (2012).
- 31 Sundaram, S. S., Mack, C. L., Feldman, A. G. & Sokol, R. J. Biliary atresia: Indications and timing of liver transplantation and optimization of pretransplant care. *Liver Transpl.* **23**, 96-109 (2017).
- 32 Vanier, M. T., Gissen, P., Bauer, P., Coll, M. J., Burlina, A., Hendriksz, C. J., Latour, P., Goizet, C., Welford, R. W., Marquardt, T. & Kolb, S. A. Diagnostic tests for Niemann-Pick disease type C (NP-C): A critical review. *Mol. Genet. Metab.* **118**, 244-254 (2016).
- 33 Raselli, T., Hearn, T., Wyss, A., Atrott, K., Peter, A., Frey-Wagner, I., Spalinger, M. R., Maggio, E. M., Sailer, A. W., Schmitt, J., Schreiner, P., Moncsek, A., Mertens, J., Scharl, M., Griffiths, W. J., Bueter, M., Geier, A., Rogler, G., Wang, Y. & Misselwitz, B. Elevated oxysterol levels in human and mouse livers reflect nonalcoholic steatohepatitis. *J. Lipid Res.* **60**, 1270-1283 (2019).
- 34 Leoni, V. & Caccia, C. Potential diagnostic applications of side chain oxysterols analysis in plasma and cerebrospinal fluid. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 26-36 (2013).
- 35 Alkazemi, D., Egeland, G., Vaya, J., Meltzer, S. & Kubow, S. Oxysterol as a marker of atherogenic dyslipidemia in adolescence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 4282-4289

- (2008).
- 36 Meng, L. J., Griffiths, W. J., Nazer, H., Yang, Y. & Sjovall, J. High levels of (24S)-24-hydroxycholesterol 3-sulfate, 24-glucuronide in the serum and urine of children with severe cholestatic liver disease. *J. Lipid Res.* **38**, 926-934 (1997).
- 37 Acimovic, J., Lövgren-Sandblom, A., Olin, M., Ali, Z., Heverin, M., Schüle, R., Schöls, L., Fischler, B., Fickert, P., Trauner, M. & Björkhem, I. Sulphatation does not appear to be a protective mechanism to prevent oxysterol accumulation in humans and mice. *PLoS One* **8**, e68031 (2013).
- 38 Takaki, Y., Mizuochi, T., Takei, H., Eda, K., Konishi, K. I., Ishihara, J., Kinoshita, M., Hashizume, N., Yamashita, Y., Nittono, H. & Kimura, A. Urinary and serum oxysterols in children: developmental pattern and potential biomarker for pediatric liver disease. *Sci. Rep.* **10**, 6752 (2020).
- 39 Ikegami, T., Honda, A., Miyazaki, T., Kohjima, M., Nakamuta, M. & Matsuzaki, Y. Increased serum oxysterol concentrations in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 736-740 (2014).
- 40 Kimura, A., Suzuki, M., Murai, T., Kurosawa, T., Tohma, M., Sata, M., Inoue, T., Hoshiyama, A., Nakashima, E., Yamashita, Y., Fujisawa, T. & Kato, H. Urinary 7 α -hydroxy-3-oxochol-4-en-24-oic and 3-oxochola-4,6-dien-24-oic acids in infants

- with cholestasis. *J. Hepatol.* **28**, 270-279 (1998).
- 41 Kimura, A., Mahara, R., Inoue, T., Nomura, Y., Murai, T., Kurosawa, T., Tohma, M.,
Noguchi, K., Hoshiyama, A., Fujisawa, T. & Kato, H. Profile of urinary bile acids in
infants and children: developmental pattern of excretion of unsaturated ketonic bile
acids and 7beta-hydroxylated bile acids. *Pediatr. Res.* **45**, 603-609 (1999).
- 42 Nishiura, H., Kimura, A., Yamato, Y., Aoki, K., Inokuchi, T., Kurosawa, T. &
Matsuishi, T. Developmental pattern of urinary bile acid profile in preterm infants.
Pediatr. Int. **52**, 44-50 (2010).
- 43 Zhou, K., Lin, N., Xiao, Y., Wang, Y., Wen, J., Zou, G. M., Gu, X. & Cai, W. Elevated
bile acids in newborns with Biliary Atresia (BA). *PLoS One* **7**, e49270 (2012).
- 44 Zhou, K., Wang, J., Xie, G., Zhou, Y., Yan, W., Pan, W., Che, Y., Zhang, T., Wong, L.,
Kwee, S., Xiao, Y., Wen, J., Cai, W. & Jia, W. Distinct Plasma Bile Acid Profiles of
Biliary Atresia and Neonatal Hepatitis Syndrome. *J. Proteome Res.* **14**, 4844-4850
(2015).
- 45 Helmschrodt, C., Becker, S., Thiery, J. & Ceglarek, U. Preanalytical standardization
for reactive oxygen species derived oxysterol analysis in human plasma by liquid
chromatography-tandem mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**,
726-730 (2014).

- 46 McDonald, J. G., Smith, D. D., Stiles, A. R. & Russell, D. W. A comprehensive method for extraction and quantitative analysis of sterols and secosteroids from human plasma. *J. Lipid Res.* **53**, 1399-1409 (2012).
- 47 Sidhu, R., Jiang, H., Farhat, N. Y., Carrillo-Carrasco, N., Woolery, M., Ottinger, E., Porter, F. D., Schaffer, J. E., Ory, D. S. & Jiang, X. A validated LC-MS/MS assay for quantification of 24(S)-hydroxycholesterol in plasma and cerebrospinal fluid. *J. Lipid Res.* **56**, 1222-1233 (2015).
- 48 Griffiths, W. J., Crick, P. J., Wang, Y., Ogundare, M., Tuschl, K., Morris, A. A., Bigger, B. W., Clayton, P. T. & Wang, Y. Analytical strategies for characterization of oxysterol lipidomes: liver X receptor ligands in plasma. *Free Radic. Biol. Med.* **59**, 69-84 (2013).
- 49 Tsukada, T., Isoe, M. & Yoshino, M. Hydrolysis of conjugated steroids by beta-glucuronidase from *Ampullaria* and application to the determination of urinary 17-hydroxycorticosteroids. *Clin. Chim. Acta* **160**, 245-253 (1986).
- 50 Muto, A., Takei, H., Unno, A., Murai, T., Kurosawa, T., Ogawa, S., Iida, T., Ikegawa, S., Mori, J., Ohtake, A., Hoshina, T., Mizuochi, T., Kimura, A., Hofmann, A. F., Hagey, L. R. & Nittono, H. Detection of Δ^4 -3-oxo-steroid 5 β -reductase deficiency by LC-ESI-MS/MS measurement of urinary bile acids. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **900**, 24-31 (2012).

- 51 Nittono, H., Takei, H., Unno, A., Kimura, A., Shimizu, T., Kurosawa, T., Tohma, M. & Une, M. Diagnostic determination system for high-risk screening for inborn errors of bile acid metabolism based on an analysis of urinary bile acids using gas chromatography-mass spectrometry: results for 10 years in Japan. *Pediatr. Int.* **51**, 535-543 (2009).
- 52 Bauman, D. R., Bitmansour, A. D., McDonald, J. G., Thompson, B. M., Liang, G. & Russell, D. W. 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 16764-16769 (2009).
- 53 Diczfalusy, U., Olofsson, K. E., Carlsson, A. M., Gong, M., Golenbock, D. T., Rooyackers, O., Fläring, U. & Björkbacka, H. Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide. *J. Lipid Res.* **50**, 2258-2264 (2009).
- 54 Patel, R. P., Diczfalusy, U., Dzeletovic, S., Wilson, M. T. & Darley-Usmar, V. M. Formation of oxysterols during oxidation of low density lipoprotein by peroxynitrite, myoglobin, and copper. *J. Lipid Res.* **37**, 2361-2371 (1996).
- 55 Crosignani, A., Del Puppo, M., De Fabiani, E., Caruso, D., Gallisai, D., Mela, M. G., Melzi, M. L., Galli Kienle, M. & Colombo, C. Plasma oxysterols in normal and cholestatic children as indicators of the two pathways of bile acid synthesis. *Clin.*

- Chim. Acta* **395**, 84-88 (2008).
- 56 Crosignani, A., Zuin, M., Allocca, M. & Del Puppo, M. Oxysterols in bile acid metabolism. *Clin. Chim. Acta* **412**, 2037-2045 (2011).
- 57 Reiss, A. B., Martin, K. O., Rojer, D. E., Iyer, S., Grossi, E. A., Galloway, A. C. & Javitt, N. B. Sterol 27-hydroxylase: expression in human arterial endothelium. *J. Lipid Res.* **38**, 1254-1260 (1997).
- 58 Bjorkhem, I., Araya, Z., Rudling, M., Angelin, B., Einarsson, C. & Wikvall, K. Differences in the regulation of the classical and the alternative pathway for bile acid synthesis in human liver. No coordinate regulation of CYP7A1 and CYP27A1. *J. Biol. Chem.* **277**, 26804-26807 (2002).
- 59 Crosignani, A., Del Puppo, M., Longo, M., De Fabiani, E., Caruso, D., Zuin, M., Podda, M., Javitt, N. B. & Kienle, M. G. Changes in classic and alternative pathways of bile acid synthesis in chronic liver disease. *Clin. Chim. Acta* **382**, 82-88 (2007).
- 60 Del Puppo, M., Kienle, M. G., Petroni, M. L., Crosignani, A. & Podda, M. Serum 27-hydroxycholesterol in patients with primary biliary cirrhosis suggests alteration of cholesterol catabolism to bile acids via the acidic pathway. *J. Lipid Res.* **39**, 2477-2482 (1998).
- 61 Russo, P., Magee, J. C., Anders, R. A., Bove, K. E., Chung, C., Cummings, O. W.,

- Finegold, M. J., Finn, L. S., Kim, G. E., Lovell, M. A., Magid, M. S., Melin-Aldana, H., Ranganathan, S., Shehata, B. M., Wang, L. L., White, F. V., Chen, Z. & Spino, C. Key Histopathologic Features of Liver Biopsies That Distinguish Biliary Atresia From Other Causes of Infantile Cholestasis and Their Correlation With Outcome: A Multicenter Study. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 1601-1615 (2016).
- 62 Gälman, C., Arvidsson, I., Angelin, B. & Rudling, M. Monitoring hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase activity by assay of the stable bile acid intermediate 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in peripheral blood. *J. Lipid Res.* **44**, 859-866 (2003).
- 63 Lee, C. S., Kimura, A., Wu, J. F., Ni, Y. H., Hsu, H. Y., Chang, M. H., Nittono, H. & Chen, H. L. Prognostic roles of tetrahydroxy bile acids in infantile intrahepatic cholestasis. *J. Lipid Res.* **58**, 607-614 (2017).
- 64 Zhao, D., Zhou, K., Chen, Y., Xie, W. & Zhang, Y. Development and validation of bile acid profile-based scoring system for identification of biliary atresia: a prospective study. *BMC Pediatr.* **20**, 255 (2020).
- 65 Konishi, K. I., Yoshida, M., Nakao, A., Tsuchiya, K., Tsurisawa, C., Ichiki, K., Takeda, T., Hisaeda, Y., Hirota, A., Amagata, S., Odashima, T., Yokomori, K., Ishida, K., Matsuura, M., Ito, S., Fujiwara, M. & Nakahara, S. Prostaglandin E-major urinary metabolite as a noninvasive surrogate marker for infantile necrotizing enterocolitis.

J. Pediatr. Surg. **54**, 1584-1589 (2019).

- 66 Idborg, H., Pawelzik, S. C., Perez-Manso, M., Björk, L., Hamrin, J., Herlenius, E. & Jakobsson, P. J. Evaluation of urinary prostaglandin E2 metabolite as a biomarker in infants with fever due to viral infection. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **91**, 269-275 (2014).

10. 謝辞

本研究を遂行する機会を与えて下さり、御指導・御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 小児医学講座 小児外科学分野 藤代 準 教授に厚く御礼申し上げます。同じく、本研究を遂行するにあたり、御指導・御鞭撻を賜りました、久留米大学医学部小児科 水落 建輝 先生、木村 昭彦 先生、順伸クリニック胆汁酸研究所 入戸野 博 先生、武井 一 先生に深謝致します。また、本研究に御協力下さいました、久留米大学医学部小児科 安田 亮輔 先生、坂口 廣高 先生、石原 潤 先生、高木 祐吾 先生、木下 正啓 先生、山下 裕史朗 先生、久留米大学医学部外科学講座小児外科部門 橋詰 直樹 先生、深堀 優 先生、順天堂大学医学部附属順天堂医院小児科・思春期科 東海林 宏道 先生、順天堂大学医学部附属順天堂医院小児外科・小児泌尿生殖器外科 宮野 剛 先生、九州大学大学院医学研究院小児外科学分野 吉丸 耕一郎 先生、松浦 俊治 先生、自治医科大学消化器一般移植外科 眞田 幸弘 先生、名古屋大学大学院医学系研究科小児外科 田井中 貴久 先生、内田 広夫 先生、北海道医療大学大学院薬学研究科生命物理科学講座薬品分析化学 村井 毅 先生、東北大学病院小児外科 久保 有美子 先生、田中 拓 先生、佐々木 英之 先生、仁尾 正記 先生に深謝致します。