

system or autophagy system contribute to the development of preeclampsia? International Federation of Placenta Associations Meeting 2012, 2012, 9, 18-21, Hiroshima (Invited).

- 7) Saito S.: NK-T-DC cross talk in pregnancy. Joint International Congress of American Society for Reproductive Immunology (ASRI) and European Society for Reproductive Immunology (ESRI). 2012, 5, 31-6, 2, Hamburg (Invited).
- 8) 齋藤 滋: 早産管理の最近の話題. 秋の産婦人科集中セミナー in 長崎, 2012, 9, 8-9, 長崎.
- 9) 齋藤 滋: Strategies to prevent preterm delivery for reducing neonatal morbidity and mortality. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 FIGO Forum, 2012, 4, 13-15, 神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担課題:周産期異常の統計解析

研究分担者 田嶋 敦 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授

研究要旨

周産期異常を伴う疾患の多くは、その発症に複数の環境要因や遺伝要因が関わる多因子性を示すことから、その病因病態解明には、詳細で正確な臨床経過情報と、多数のゲノム・エピゲノム情報とを同時分析することが可能である網羅的アプローチが有効であると考えられる。周産期関連疾患の症例対照研究体制の構築のために、本分担課題では、統計学的観点からの検体収集サポート、ならびに遺伝疫学的解析に必要な統計学的基盤整備を目的としている。本年度は、周産期疾患のひとつである不育症につき、症例の遺伝的異質性を考慮した層別解析により、ゲノム全域 SNP データに基づく遺伝的リスク探査を行った。

A. 研究目的

周産期異常を伴う疾患の多くは、その発症に複数の環境要因や遺伝要因が関わる多因子性を示すと考えられている。従って、その要因解明に向けては、多数要因の同時分析が可能であるゲノム・エピゲノム網羅的アプローチが有効であると期待されている。本年度は、昨年度に引き続き、不育症リスク遺伝子探査を目的として、共同研究により取得されたゲノム全域 SNP 遺伝子型データに基づく層別解析から、不育症の遺伝的異質性に関する考察を行う。

B. 研究方法

Illumina 社 HumanOmni1 あるいは Omni2.5 BeadChip により決定された SNP 遺伝子型(特徴的な臨床背景を有する不育症 19 例、正常分娩対照 334 例)に基づき、分析された SNP ならびにサンプルの品質管理を行った後、ゲノム全域症例対照関連分析を実施した。偽陽性確率(false discovery rate [FDR])水準値を 0.05 に設定し、SNP 遺伝子型と不育症との関連を統計学的に評価した。

C. 研究結果

両チップ共通 SNP、サンプルに対する品質管理基準をそれぞれ設定し、基準を満たした症例対照サンプル(不育症 19 例、対照 325 例)につき、510,596 SNPs(リスクアレル頻度 5%以上の常染色体 SNPs)の疾患関連を統計学的に評価した。

Bonferroni 補正有意水準値($0.05/510,596 = 9.8 \times 10^{-8}$)を満たす SNP は観察されなかったものの、関

連 $FDR < 0.05$ を満たす SNP を 9 個同定した。

D. 考察

$FDR < 0.05$ を満たす SNP は、昨年度の関連分析で注目した 91 SNPs には含まれず、このことは、不育症の遺伝的リスクに関する遺伝的異質性の存在を示唆する。また、他の多因子疾患研究と同様、正確な臨床経過・病理診断情報に基づく症例の層別化により、寄与度が比較的大きい遺伝的リスクの同定確率を高めることが可能であることを示している。

E. 結論

周産期異常を伴う疾患のひとつである不育症の遺伝的リスク探査を目的として、ゲノム全域 SNP 遺伝子型データに基づき、特徴的な臨床背景を有する不育症患者の遺伝的リスクの探査を行った。本年度の層別解析の結果から、不育症リスクに関する遺伝的異質性の存在が示唆された。疾患発症に関わる遺伝要因を同定するためには、正確な臨床経過・病理診断情報を十分考慮した症例対照解析を実施することが必要である。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Ohi K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Itakura M, Takeda M, Ohmori T. Meta-analysis of

なし

association studies between *DISC1* missense variants and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res* 141(2-3), 271-273, 2012.

- 2) Japanese Archipelago Human Population Genetics Consortium, Jinam T, Nishida N, Hirai M, Kawamura S, Oota H, Umetsu K, Kimura R, Ohashi J, Tajima A, Yamamoto T, Tanabe H, Mano S, Suto Y, Kaname T, Naritomi K, Yanagi K, Niikawa N, Omoto K, Tokunaga K, Saitou N. The history of human populations in the Japanese Archipelago inferred from genome-wide SNP data with a special reference to the Ainu and the Ryukyuan populations. *J Hum Genet* 57(12), 787-795, 2012.
- 3) Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Shimodera S, Ono S, Imamura A, Iga JI, Watanabe S, Kikuchi K, Kubo H, Nakataki M, Sumitani S, Imoto I, Okazaki Y, Ohmori T. DNA methylation signatures of peripheral leukocytes in schizophrenia. *Neuromolecular Med*, in press.

2. 学会発表

- 1) 渡邊美恵、田嶋敦、井本逸勢: 多因子遺伝性疾患における遺伝的リスクの集団間差: 東アジアにおける2型糖尿病関連遺伝子多型を例として. 日本人類遺伝学会第57回大会. 東京. 2012.10.24-27.
- 2) 阿部夏季、菅恵梨、田嶋敦、井本逸勢: *HNF1B*、*JAZF1*多型の前立腺がん発症リスクに関するメタアナリシス. 日本人類遺伝学会第57回大会. 東京. 2012.10.24-27.
- 3) 久須美真紀、中林一彦、前原佳代子、田嶋敦、副島英伸、吉原一、秦健一郎: 生殖補助医療技術か・出生時のDNAメチル化状態に及ぼす影響の検討. 日本人類遺伝学会第57回大会. 東京. 2012.10.24-27.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

分担課題:胎児炎症反応症候群の解析

研究分担者 柳原 格 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 部長

研究要旨

これまで *Ureaplasma* spp.のリポ蛋白質(MBA)および合成したリポペプチド(UPM-1)が自然免疫系(TLR)を介してNF- κ Bのシグナルカスケードを活性化し、炎症反応を惹起することを明らかにした。本年は、臨床で実際に用いられているプロゲステロンが、TLR2を介しUPM-1によるNF- κ Bの活性化を抑制するの可否かを*in vitro*で検討し、その有効性を見出した。

また、日本人習慣流産患者に多く認められるアネキシンA5遺伝子のSNP5のGマイナーアレルは習慣流産のリスクファクターであったが、これまでのところG/G患者では抗凝固療法に対する反応性は良かった。本遺伝子多型は、抗凝固療法が必要な症例を個別化できる可能性を示唆した。

A. 研究目的

- ①一般に低病原性の低い細菌と疾患の関連の証明は困難である。ヒトの *Ureaplasma* spp.は、分離、培養や血清学的診断が難しく、また健康成人生殖器内より高率に(40-80%)分離されることから、正常細菌叢を形成する細菌の一種と認識されていた。発見から60年、その病原性については長らく議論が続いてきた。昨年我々は *Ureaplasma* spp.の主要な膜抗原であるMBA蛋白質由来のリポペプチドが、1)培養HeLa細胞において、TLR2を介して細胞内におけるNF- κ Bシグナルカスケードを活性化し、2)妊娠マウスにおいては早産や流産を起こすことを見出した。本年は、早産治療薬として実際に臨床で用いられるプロゲステロンがMBAによる炎症反応に対して抑制性効果を持つのか否かという点について上記の*in vitro*の系を用いて検討を行った。
- ②アネキシンファミリーの一つであるアネキシンA5遺伝子のSNP5がわが国の原因不明の習慣流産患と関連することを報告してきた。SNP5のマイナーアレルと抗凝固療法との関連について、臨床的なアウトカムを指標に明らかにする目的で症例数を増やし検討を行う。

B. 研究方法

- ①培養HeLa細胞にヒトTLR2遺伝子および、NF- κ B結合部位の下流にluciferase遺伝子を挿入したレポーターベクターを導入した。次に、MBAのN末側システインをジアシル化した合成リポペプチド(UPM-1、27.2 nM)、プロゲステロン(10 μ g/ml)を添加後、luciferase活性を測定した。
- ②2009年以降、関連医療機関を受診した流産を3回以上経験した不育症患者202名を対象に抗凝固療法の有無、生児獲得の有無、アネキシンA5遺伝子の翻訳開始点より上流-70から-214bpのDNAシーケンス解析を行い、その関連性を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針を遵守した。本研究内容は、大阪府立母子保健総合医療センターの承認を受けた(承認番号204、214-2)。

C. 研究結果

- ① UPM-1の添加によるluciferase比活性は

6.5±0.32であったが、プロゲステロンの添加によって 2.99±0.26(36%)まで減少した。UPM-1 刺激を行っていないコントロール群の luciferase 活性は 1.0±0.25 であった。

- ② これまで調べたアネキシン A5 遺伝子のプロモーター領域の SNP は延べ 922 人で、SNP5 は、G/G:27 人、T/G:306 人、T/T:589 人であった。このうち、3 回以上の流産を経験し、抗凝固療法後に妊娠帰結をフォローした 202 人では G/G:4 人、T/G:67 人、T/T:131 人であった。本年の解析では治療開始後初めての妊娠の帰結を見た。治療開始後、初めての妊娠で生児を獲得した比率は G/G:75%(3/4、IUFD 1 例は 43 歳)、T/G:61.2%(41/67)、T/T:70.2%(92/131)であった。また、35 歳未満と以上の患者を比較すると 35 歳未満では 73%で生児を獲得したが、35 歳以上では 62%にとどまった。35 歳未満患者における SNP5 多型毎の出産率は G/G:100%(2/2)、T/G:74.2%(23/31)、T/T:72.5%(37/51)と、G/G は人数が少ないものの成績は良好であった。一方、35 歳以上の場合、G/G:50%(1/2)、T/G:50%(18/36)、T/T:68.8%(55/80)であった。

D. 考察

- ① 近年の分子遺伝学的解析で、生理的な陣痛発来は、機能的プロゲステロン消退によって子宮収縮関連遺伝子の発現が増強されることによることが明らかになった。また、以前から早産患者において、プロゲステロン投与により妊娠期間が延長することが報告されている。プロゲステロンは、自然免疫系である TLR4,9 の刺激に対して抑制的に作用することがわかっているが、我々の見つけた UPM-1 はジアシルリポペプチドであり TLR2 を介してシグナルを伝達する。そこで、プロゲステロンが TLR2 依存的な炎症反応カスケードに対して抑制的に働くのか否かを検証し、*in vitro* の系で確認した。このことは、我々の以前の検討で早産胎盤の 42%から *Ureaplasma* spp. が分離されたことを踏まえると(当施設では最大の早産起因微生物ということになる)、*Ureaplasma* spp. による胎内炎症の抑制にプロゲステロンの効果が望めるという結果となった。さらなる検討は必要ではあるが、感染性早産に対しては、抗菌薬などでは十分な治療成績が得られない現状、価値のある

治療法であると考えている。プロゲステロンはすでに臨床応用されている薬剤でもある。本治療に対して科学的な根拠を与えた。

- ② Kaandorp SP らは、原因不明の習慣流産に抗凝固療法(アスピリン、ヘパリン)は効果がなかったと報告した(NEJM, 362, 1586-96, 2010)。364 人という比較的限られた症例に対し、多施設共同研究が行われた。また、新たに報告されたアネキシン A5 遺伝子の SNP1-5 についての検討は行われていない。これまでの我々の結果から、生児獲得と SNP5 の多型との関連については、マイナーアレルを持つことに加えて、年齢の因子が加わることで治療に反応しにくくなることを示唆している。G/G の多型を示す患者は人数が少なく、治療効果については今後も検討を有するが、少なくとも若年の G/G 患者 2 例は今回の検討でもよい治療成績を示している。今後、SNP 多型と抗凝固療法の治療法の選択について更なる解析を行う。

E. 結論

- ① 培養細胞を用いた系でプロゲステロンはウレアプラズマリポペプチドによる炎症反応を抑制し、ウレアプラズマ感染による早産にも効果が期待できる結果となった。
- ② アネキシン A5 遺伝子多型を調べることにより、抗凝固療法が必要な症例を個別化できる可能性を示した。「習慣性流産のテーラーメイド医療」が期待される結果となった。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shigeta N, Ozaki K, Hori K, Ito K, Nakayama M, Nakahira K, Yanagihara I. An Arthrobacter spp. Bacteremia Leading to Fetal Death and Maternal Disseminated Intravascular Coagulation. Fetal and Pediatric Pathology, 32, 25-31, 2013
2. Namba F, Ina S, Kitajima H, Yoshio H, Mimura K, Saito S, Yanagihara I. Annexin

- A2 in amniotic fluid: Correlation with histological chorioamnionitis, preterm premature rupture of membranes, and subsequent preterm delivery. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 38(1), 137-44, 2012
3. Sakamoto S, Wakae K, Anzai Y, Murai K, Tamaki N, Miyazaki M, Miyazaki K, Romanow WJ, Ikawa T, Kitamura D, Yanagihara I, Minato N, Murre C, Agata Y. E2A and CBP/p300 Act in Synergy To Promote Chromatin Accessibility of the Immunoglobulin κ Locus. *J Immunol*, 188(11), 5547-60, 2012
 4. Morita A, Nakahira K, Hasegawa T, Uchida K, Taniguchi Y, Takeda S, Toyoda A, Sakaki Y, Shimada A, Takeda H, Yanagihara I. Establishment and characterization of Roberts Syndrome and SC phocomelia model medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ*, 54(5) 588-604, 2012
2. 学会発表
(学会発表)
(1)
1. Daisuke Kinoshita, Kiyooki Sumi, Hiroaki Tubouchi, Kensi Wasada, Kumiko Nakahira, Itaru Yanagihara. Gastric fluid cytokines in preterm infants : a useful test for evaluating antenatal inflammation, 17th Congress of the Federation of Asian and Oceania Perinatal Societies (FAOPS) and the 16th Annual Congress of the Perinatal Society of Australia and New Zealand (PSANZ) – FAOPS & PSANZ Sydney 2012. March 18-21
 2. 久野秀太、小野寺章、西海史子、諸澤瑛、田中敦士、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一。「非晶質ナノシリカの精子頭部への結合による精子運動性の低下」日本薬学会 第 132 年会、2012. 3. 28-31 札幌 ポスター
 3. 西海史子、柳原格、「*Ureaplasma parvum* の細胞内取り込み機構・細胞内動態解析」、日本マイコプラズマ学会、盛岡、2012. 5. 24-25、口頭
 4. 柳原格、中平久美子、「腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒 (TDH) の膜障害機構の解明」、近畿腸管微生物研究会、吹田、2012. 6. 16、口頭
 5. 木下大介、玉置祥子、斉藤広幸、川村彬子、酒井絵美子、井石倫弘、甲斐明彦、前川周、隅清彰、中山雅弘、柳原格。「出生直後の新生児胃液中顆粒球エラストラーゼ、サイトカインは組織学的絨毛膜羊膜炎を反映する」周産期新生児学会 2012. 7. 8-10、大宮、口頭
 6. 名倉由起子、内田薫、柳原格。「早産における臨床分離マイコプラズマ科の血清型診断のまとめ」周産期新生児学会 2012. 7. 8-10、大宮、ポスター
 7. 柳原格、中平久美子、「The aggregative property of thermostable direct hemolysin」、日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会日本側総会、京都、2012. 8. 6、口頭
 8. Misako Iwata, Msahiro Nakayama, Masako Waguri, Nobuaki Mitsuda, Itaru Yanagihara, Tomio Fujita, Isao Nakanishi. Massive intervillous fibrin deposition in women with recurrent pregnancy loss, International Federation

- of Placenta Associations, September 18-21 2012, Hiroshima, ポスター
9. Hideto Inagaki, Sayuri Ota, Haruki Nishizawa, Hironori Miyamura, Kumiko Nakahira, Machiko Suzuki, Sachie Nishiyama, Yasuhiro Udagawa, Itaru Yanagihara, Hiroki Kurahashi. Obstetric complication-associated ANXA5 promoter polymorphisms affect gene expression via DNA secondary structures. American Society of Human Genetics, November 6-10 2012, San Francisco
 10. 小野寺章、西海史子、田中敦士、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈美、根津菜摘、宝諸あい、福井健太郎、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一、「非結晶ナノシリカの細胞膜への結合とナノ生殖毒性との関連」、日本薬学会近畿支部、2012. 10. 20、武庫川
 11. 久野秀太、小野寺章、西海史子、諸澤瑛、田中敦士、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一、「非結晶ナノシリカの精子頭部への結合による精子運動性の低下」、日本薬学会近畿支部、2012. 10. 20、武庫川
 12. 太田小百合、稲垣秀人、宮村浩徳、西澤春紀、中平久美子、柳原格、宇田川康博、倉橋浩樹。「習慣流産をおこす ANXA5 上流のグアニン四重鎖構造多型」人類遺伝学会、2012. 10. 25-27、東京
 13. Hideto Inagaki, Sayuri Ota, Haruki Nishizawa, Hironori Miyamura, Kumiko Nakahira, Macjiko Suzuki, Sachie Nishiyama, Yasuhiro Udagawa, Itaru Yanagihara, Hiroki Kurahashi, Obstetric complication-associated ANXA5 promoter polymorphisms affect gene expression via DNA secondary structures, American Society of Human Genetics, November 6-10, 2012, san Francisco
 14. Jiro Mitobe, Shouji Yamamoto, Itaru Yanagihara, Makoto Ohonishi, Haruo Watanabe, Multimer Formation of Bacterial Cytoskeletal Protein RodZ, United States-Japan Cooperative Medical Science Program, December 12-14, 2012, Chiba
 15. Itaru Yanagihara, Kumiko Nakahira, The aggregative property of thermostable direct hemolysin, United States-Japan Cooperative Medical Science Program, December 12-14, 2012, Chiba
 16. 小野寺章、西海史子、古田拓也、中平久美子、石井幸奈、本間安季、太田舞子、諸澤瑛、福井健太郎、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一。「非晶質ナノシリカの細胞膜への結合とナノ生殖毒性との関連」生化学会 2012. 12. 14-16、福岡

分担課題: 周産期異常症例の大規模検体収集体制の確立

研究分担者 和氣徳夫 九州大学大学院生殖病態生理学 教授
田中守 聖マリアンナ医科大学産婦人科 教授

研究要旨

周産期の異常の多くは、複数の環境要因や遺伝要因の関与する多因子疾患であり、コホート研究で得られるような詳細で正確な臨床経過情報に基づく大規模疫学調査が、解析に有効である。その一方で、多因子疾患で同定される関連因子の多くは寄与率が低く、関連解析で十分な検出力を期待するには、多数(多くは千例規模)の疾患集団の解析が必要とされる場合が多い。そのため、コホート研究では十分な症例を得られない場合が多い。そこで本研究計画では、症例対照研究の体制を基軸に、多数かつ多彩な症例を収集する。検体収集に当たっては、正確な臨床情報と共に、将来の遺伝子解析に供する事が可能な倫理的手続きを踏み、様々な疫学解析手法に供する事の出来るよう対応する。このような大規模検体収集体制を確立し、未知の病因病態の解明に資するリソースを整備する事を目的とする。

A. 研究目的

周産期の異常の多くは、複数の環境要因や遺伝要因が関与していることが示唆されている、いわゆる多因子疾患であり、分子生物学的な解析で明確な結論を得る事が困難である。近年、いわゆるポストゲノムシーケンス技術の著しい進歩に伴い、多数の症例に対し、網羅的な発現解析や全ゲノム領域の一塩基多型解析が可能となり、多因子疾患の病因病態解明に画期的成功を収めつつある。多因子疾患の解析では、コホート研究で得られるような詳細で正確な臨床経過情報が重要である。その一方で、多因子疾患で同定される関連因子の多くは寄与率が低く、関連解析で十分な検出力を期待するには、相当多数(多くは千例規模)の疾患集団が必要とされる場合が多い。そこで本研究計画は、症例対照研究の体制を基軸に、多数かつ多彩な症例を、正確な臨床情報と共に、将来の遺伝子解析に供する事が可能な状態で収集する体制を確立し、周産期に関連する疾患の未知の病因病態の解明に資する症例収集と試験的解析を目的とする。

- 1) 早産症例: 年間 500 症例、本研究終了までに計 2,000 例以上。
- 2) 正常産例(対照群) 年間 500 例、本研究終了までに計 2,000 例。
- 3) その他の症例
症例数の根拠
オッズ比 1.4、頻度 5%の関連多型を検出力 80%で同定するのに 1,000 例必要。

【収集する臨床情報】

分娩前

- ① 身長
- ② 体重(非妊時)
- ③ 妊娠歴(流・早産歴、死産歴、FGR 歴、妊娠高血圧既往歴)
- ④ 円錐切除術歴の有無
- ⑤ 嗜好(喫煙、飲酒)
- ⑥ 不妊治療の有無
- ⑦ 母体基礎疾患の有無
- ⑧ 妊娠合併症の有無

分娩後

- ① 分娩週日(早産の際は人工早産か自然早産か)
- ② 分娩時母体年齢
- ③ 分娩時母体体重、体重増加
- ④ PROM の有無

B. 研究方法

【対象症例】

- 1) 妊娠 37 週未満で分娩に至った症例
- 2) その他の異常を伴う周産期症例
- 3) 正常産例(対照群)

【対象予定人数】

- ⑤ 単胎妊娠か多胎妊娠か
- ⑥ 分娩様式
- ⑦ 陣痛促進剤の有無
- ⑧ 臍帯血 2ml
- ⑨ 母体末梢血 2ml

新生児

- ① 胎数
- ② 性別
- ③ 身長
- ④ 体重
- ⑤ 頭周囲径
- ⑥ 胸囲
- ⑦ Apgar 値
- ⑧ 胎盤重量
- ⑨ LFD(SGA), AFD(AGA), HFD(LGA)の有無
- ⑩ 児の転帰
- ⑪ 児のNICU 管理有無
- ⑫ 児の合併症

【収集する試料】

- 分娩後の臍帯血 2ml
- 母末梢血 2ml
- 父末梢血 2ml

【解析対象遺伝子・ゲノム領域】

- 1) 約 100 万箇所の大規模なゲノム網羅的一塩基多型解析
- 2) 網羅的 DNA メチル化解析(計約 2 万 6 千箇所の遺伝子プロモーター領域、インプリンティング遺伝子調節領域を中心とした DNA メチル化解析)

4. 倫理面への配慮

ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針を遵守し、初年度に本分担研究課題の中心となる医療機関が、各自の倫理委員会の定める倫理申請手続きを行い、承認を得て行っている。本年度は、必要に応じて関連協力機関での倫理申請も行った。

C. 研究結果

初年度は、特に遺伝子解析に対する倫理申請に十分な準備を行った後、検体収集体制の構築を行ない、倫理申請承認後の 2010 年 11 月より、実際に周産期の異常症例の回収を開始した。

本年度は、合計約 330 症例(正常対照群 150 例、妊娠糖尿病 80 症例、早産 50 症例、胎児発育不全 50 症例)を収集した。

D. 考察

今後、関連病院とも連携し、比較的頻度の高い周産期の疾患(早産、妊娠糖尿病等)にとどまらず、原因不明の不妊症・不育症や、先天奇形症候群等の、周産期医療にかかわる稀少疾患も含めた検体収集を進めていく。

E. 結論

正確な臨床情報を伴った高品質の臨床検体を、遺伝子解析が可能な倫理的手続きを取ったうえで多数集める事は、今後の大規模網羅的な周産期の疾患解析に必須のバイオリソースである。また、正常分娩を経た女性のゲノム DNA リソースは、世界に類を見ない貴重なものであり、周産期の疾患に止まらず様々な疾患のコントロールとして利用できるゲノムリソースである。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyakoshi, K., Saisho, Y., Tanaka, M., Shimada, A., Itoh, H., Yoshimura, Y. Pancreatic beta-cell function in women with gestational diabetes mellitus defined by new consensus criteria. *Diabetes Care* 2011; 34: e8.

2.

2. 学会発表

1. 宮越敬、田中守、前原佳代子他日本人妊娠糖尿病合併妊婦における遺伝子多型に関する検討 第 27 回日本糖尿病・妊娠学会学術集会 2011、11 月、神戸市

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働省科学研究費補助金

(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業) H22-次世代-一般-008

分担研究報告書

神経芽腫スクリーニングの成果からみた本症の病態解明に関する研究

分担研究者 檜山 英三 広島大学自然科学研究支援開発センター 教授
広島大学病院小児外科

研究要旨 平成 15 年に休止された生後 6 ヶ月児を対象とした神経芽腫検査事業が、その休止の条件として①本症の罹患と死亡の正確な把握、②マススクリーニングの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価、③本症による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立、の三点について対応することが課せられている。そのことを受け、本分担研究では、母子コホート研究として、本症の発症機序を明らかにするとともに、死亡率に結びつく予後不良な神経芽腫の新たな早期発見法と有効な対応策について検討を継続した。

神経芽腫検査事業の休止後のコホート解析を 2011 年まで継続した結果、検査事業休止後 1 才未満症例の発症率は速やかに減少したのに対し、2 歳以降の症例が有意に増加していた。

18 ヶ月でのスクリーニング検査を施行している大阪、京都、札幌でのデータを集計すると、受診例が約 20 万に達し、約 7000 人に 1 例の発見で、の発見率で、明らかな過剰診断症例はなく、全例生存であった。

過剰診療の観点から、発見された腫瘍の特性を判定する方法として、血清の予後不良例に特異的に上昇するペプチド MH を見出し、一方、神経芽腫細胞の培養上清プロテオーム解析で得た Glutamate decarboxylase 活性が予後不良群の血清で有意に低値であった。そこでこの両者を組合わせて測定すると、予後不良例の層別に極めて有効性が高い結果が得られた。さらに、血清中 DNA を用いた *MYCN* 増幅や染色体 1p、11q 欠失の診断法を組合わせることで、発見された神経芽腫の悪性度診断の侵襲的判定がある程度可能となった。

また、多発神経芽腫症例の全エクソン解析から、11 番染色体に位置する遺伝子に共通したミスセンス変異を発見し、本腫瘍の易罹患性に関与した変異と考えられ、この遺伝子機能の解析から病態解明に極めて有用な知見を得ており、ゲノムスクリーニングへと展開する可能性が示唆された。

A. 研究目的

わが国で 1984 年から全国的に展開された尿中 VMA, HVA をマーカーとする生後 6

ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業 (以下、神経芽マス) は過剰診療が指摘された 2003 年から休止したが、その後の後向き

研究の結果 (*Lancet, 2008*) から死亡率の低下が明らかになった。そこで、本分担研究では昨年度から神経芽腫の発生動向を検査事業休止後の母子コホートの動向から休止後には乳児症例が減少し、2歳以上の進行例が増加しており、また国際比較からは神経芽マスによって乳児症例の増加と年長児症例の減少に加えて予後不良な *MYCN* 増幅例が有意に減少していたことを示した。また、生物学的特性別に神経芽腫の発生動向を解析したところ、神経芽腫には易罹患性が存在し、その一部が自然体縮あるいは分化し、一方で悪性度が増加して予後不良な神経芽腫に進展していると仮定すると、易罹患性に関連するゲノム異常が存在することが推定された。

さらに、休止後に行われている18ヶ月の神経芽マスの成果を集積しつつ、予後不良例の新規マーカーの同定と有用性の検討を行ってきた。そこで、本年度は、これらのデータから神経芽腫の発症機序、悪性度上昇の機序を解明し、さらに新規のバイオマーカーを検証して、18ヶ月神経芽マスの有用性を検証する前向き研究への展開への根拠を集積することを目的とした。さらに、神経芽腫症例の遺伝的背景についての解析も加えて、検討した。

B. 研究方法

1. 生後6ヶ月児神経芽マスの再評価:

1) 休止後のコホート解析: 昨年度に引き続き、休止後の2006-2011年出生の解析を施行した。比較対象のコホートは1971年から日本小児外科学会および日本小児がん学会に登録され、病理所見や腫瘍特性を再評価され予後解析もなされた症例、約5,000

例(神経芽マス発見2,500例)とした。このデータベースの補足率を、死亡個表での神経芽腫の死亡数との比較と、厚生労働科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「小児慢性特定疾患治療研究事業の登録・管理・評価・情報提供に関する研究」(主任研究者:加藤忠明)から提供された平成10年から12年までの小児慢性特定疾患のコードC74.9の新規症例を診断年齢別に症例数との比較から67.5%である。

休止後のデータは主に日本小児外科学会の神経芽腫群腫瘍のデータを使用した。

2) 発症年齢別のマス施行中と施行後のコホートの比較解析: 1)で対象とした神経芽細胞腫検査事業が行われていた時期のうち、1990-2000年に出生し、この期間に発症した神経芽腫1852例(臨床発見例367例)と、休止後の2004-2010年に出生し、この期間に発症した神経芽腫例397例を比較して検討した。

2. 生後18ヶ月神経芽マスの成績の検討動向

札幌、京都、大阪で行われてきた生後1歳半での尿中VMA,HVAによる神経芽腫マスの動向を調査し、現時点でのその成果と有用性について検討した。

3. 新規血中、尿中マーカーの検討: 神経芽マスの特異的マーカーのLC-MS探索

1) 血清遊離DNAを用いた*MYCN*遺伝子増幅判定法の開発

神経芽腫の治療前の保存血清102例の血清遊離DNAを抽出。血清遊離DNA中の*MYCN* (2p24.1)および対照遺伝子*NAGK*

(*N-acetylglucosamine kinase*, 2p12) を TaqMan 法による Real-time PCR 法で解析し、血清中の *MYCN* 遺伝子増幅を定量した。

2) 血清遊離 DNA を用いた 1p, 11q LOH 検索

患者 64 例の術前採取した血清由来 DNA を用いて、マイクロサテライトマーカーで 1 番染色体短腕及び 11 番染色体長腕の LOH (Loss of Heterogeneity) の検索を行った。

3) 血中・尿中バイオマーカー探索

一昨年の研究で得られた PeptideMH に対する抗体を作製した。また、昨年度の研究でマーカーとして示唆されたグルタミンデカルボキシラーゼの活性を測定した。その両者を、正常児 14 例、予後良好例 20 例、予後不良例 13 例の血清で測定し、各群の分布を検討した。

4. 神経芽腫患者のゲノム解析

神経芽腫の易罹患性に関連するゲノム異常の探索に、胚細胞異常の可能性が高い

多発神経芽腫 10 例の切除標本を、各 2 腫瘍ずつ DNA を抽出して、その全ゲノムエクソンのシーケンス解析を施行した。DNA を断片化後にエクソン領域を濃縮したのちに、次世代シーケンサー (Genomic Analyzer、イルミナ社製) にてシーケンス解析を行った。

抽出されたシーケンスで、今までの SNP データベースにないものを抽出して、従来のゲノム情報と比較し、全ての症例に共通した点突然多型 (SNPs) と候補部位については、sporadic な神経芽腫 212 例及び健常人 91 例で検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、広島大学研究審査委員会および日本小児外科学会倫理委員会の承認を得た上で、臨床研究を施行した。また、ゲノム研究については、広島大学ゲノム審査委員会の承認 (ヒ倫-10) を得て、患者または代諾者の同意を得て施行した。

また、18 ヶ月での神経芽腫は、インフ

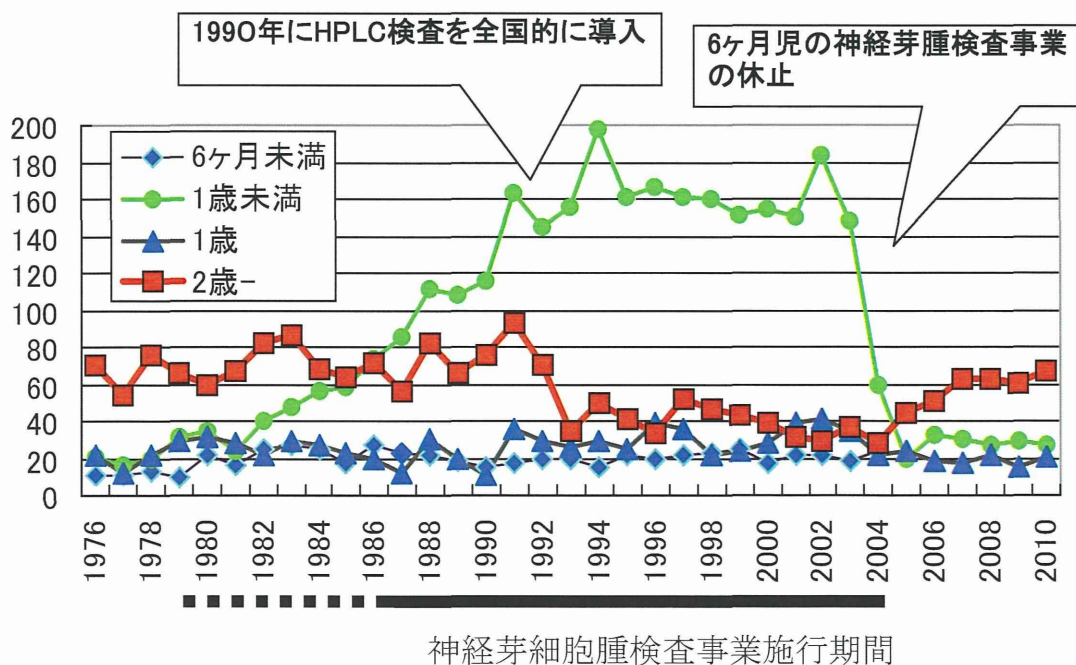


図 1 : 診断時年齢毎の神経芽腫登録数の年次別変化

フォームドコンセントを得た上で運用されている。

C. 研究結果

1. 生後6ヶ月児神経芽腫の再評価：

1) 休止後の後向きコホート解析：6ヶ月神経芽腫検査事業によって予後良好な腫瘍が増加し、その中に過剰診断例が含まれていたことは明らかであったが、実際に年長児に発生する予後不良腫瘍をどの程度見いだせていたかを検討する目的で、昨年の検討に加え、継続的に年代をおって診断時年齢別の症例数を検討した(図1)。1歳未満の乳児は、スポット法による定性法が始まった1980年頃から漸増し、全国的に実施された1985年頃から明らかに増加していた。1990年ころに定量法であるHPLC法が全国的に導入され、その頃から、乳児例の明らかな増加と2歳以上の診断症例が半減を認めていたが、休止後は2005年から明らかに1歳

未満の症例は減少し、検査事業を開始前の値に近い数になったが、2006年以降2歳以上の年長児に発生する神経芽腫症例が増加し、年間60例程度になり、2010年症例が確定した時点でも継続した傾向であり、この増加分が検査事業にて早期発見していた症例と考えられた。

2) 発症年齢別のマス施行中と施行後のコホートの比較解析：休止後の分布では、1才代の病期 INSS 3、2-5才での INSS4が増加していた。さらに、悪性度3群（自然退縮するI型、緩徐に進行するII A型、MYCNが増幅しているような急速進行するII B型）分類して検討すると、マス休止後には1才代でII A型が増加し、2才代ではII A型に加えてII B型も増加しており、昨年の国際データベースのデータとも一致した結果であった。3才以降では、II B型は変化なく、II A型のみが増加していた(図2、図3)。

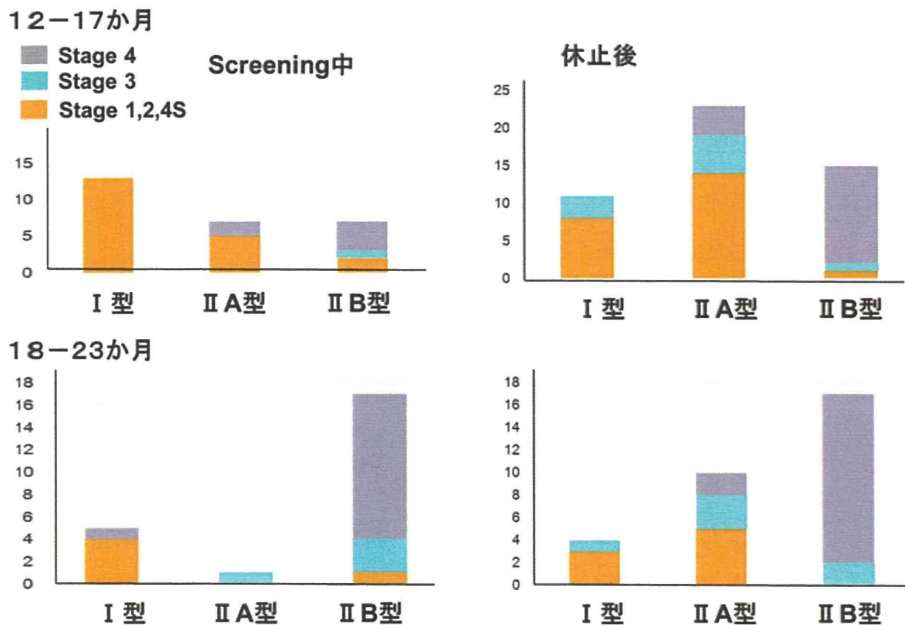


図2：スクリーニング中と休止後の1歳代の神経芽腫の分布

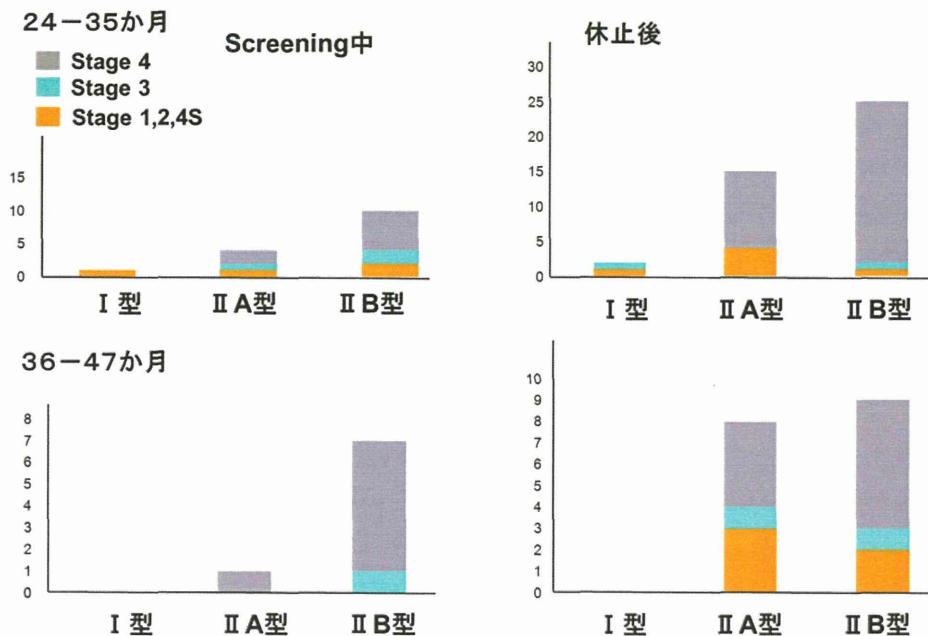


図3：スクリーニング中と休止後の2歳代以降の神経芽腫の分布

2. 18ヶ月の神経芽腫検査について

平成15年以降、施行時期（生後18ヶ月）を変えて神経芽腫検査事業を継続してきた札幌、京都、大阪の自治体関係者等を交えて、その成果等について論議を継続した。

インフォームドコンセントを得た上で、大阪、京都、札幌で実際に運用されている。

また、6ヶ月マスが休止となった以降に、大阪(2004.5～2009.12)、京都(2004.12～2008.12)、札幌(2006.4～2009.12)の18ヶ月マスの状況についてまとめてみると、合計180,534人受診し、26人に神経芽腫が見出されている。これらは、全例現時点では生存中であり、早期発見として18ヶ月が明らかに遅いことを示唆した症例や過剰診断例はなかった。発症率は6,943人に対して1（対10万出生あたり1.44）であった。先の二次マスのデータが、11,116出生に1（対10万出生あたり9.00）であったことから、発見率は二次マスよりも高く、自然

発生が7,000人に1人ということから、妥当な値であると考えられた。さらにこれらの症例のうち、現在2年経過し、陰性例に発症例は確認されていない。これらの長期予後とともに、臨床発生例の分布、さらにそれらの悪性度解析が必要と考えられた。これらのエビデンスから、18ヶ月マスの有効性を検証する大規模な前向き研究が是非とも必要であることが強く示唆される結果となっている。

3. 新規マーカー探索

1) 血清遊離DNAを用いたMYCN遺伝子増幅判定法

血清遊離DNAを用いたMYCN遺伝子増幅判定法の開発を目指して、昨年度の結果にさらに症例を追加して、神経芽腫の治療前の保存血清102例の血清遊離DNAを抽出。血清遊離DNA中のMYCN(2p24.1)および、対照遺伝子NAGKおよび、対照遺伝子

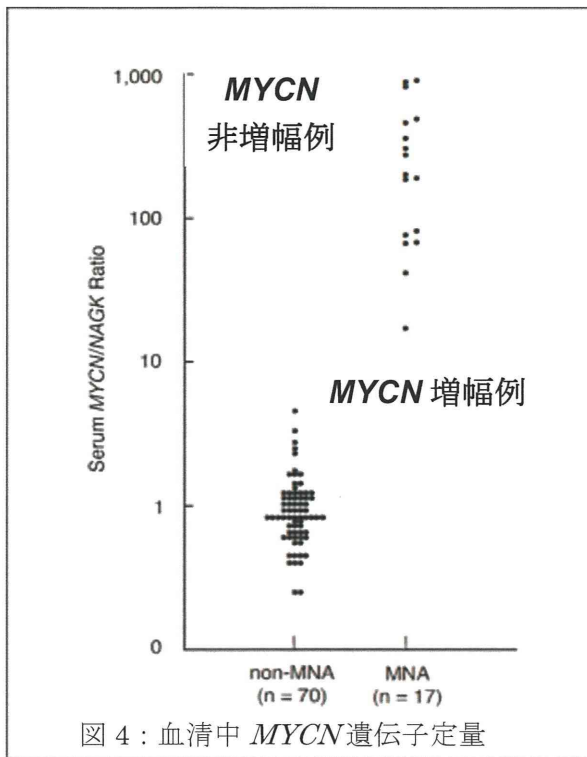


図 4：血清中 *MYCN* 遺伝子定量

NAGK (*N-acetylglucosamine kinase*, 2p12)を TaqMan 法による Real-time PCR 法で各々定量した。*MYCN/NAGK* 値は増幅例では非増幅例に比べ有意に高く ($p < 0.001$)、血清遊離 DNA の *MYCN/NAGK* 値の測定は *MYCN* 増幅の有無を判定できる精度の高い手法として期待される結果であった。これらのデータは治療後には、増幅が消失し、再発すると再度血清 DNA にて *MYCN* 増幅が認められた。以上から、診断のみならず、治療効果や経過観察にも有用であることが示された。

2) 血清遊離 DNA を用いた 1p, 11q LOH 検索 (図 5)

血清中 DNA を用いて、腫瘍で 1pLOH が 42 例、及び 11qLOH が腫瘍で確認されて

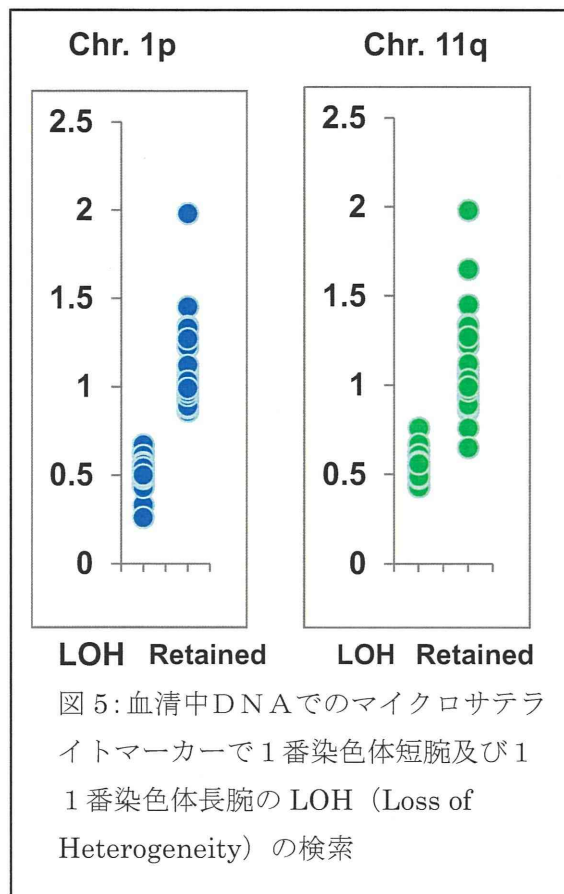


図 5：血清中 DNA でのマイクロサテライトマーカーで 1 番染色体短腕及び 1 番染色体長腕の LOH (Loss of Heterogeneity) の検索

いた 19 例と LOH のなかった 39 例で比較した。LOH のあった症例は明らかに蛍光強度が低く、血清中 DNA でもこれらの判定が可能なが示された。

3) 血中・尿中バイオマーカー探索

一昨年の研究で得られた PeptideMH に対する抗体を作製した。また、昨年度の研究でマーカーとして示唆されたグルタミンデカルボキシラーゼの活性を測定した。その両者を、正常児 14 例、予後良好例 20 例、予後不良例 13 例の血清で測定した。各群の分布を検討した。これら h、単独では予後良好例と不良例を層別することはできなかったが、この 2 つのマーカーを用いることで、ほぼ完全に層別することが可能であった (図 6)。

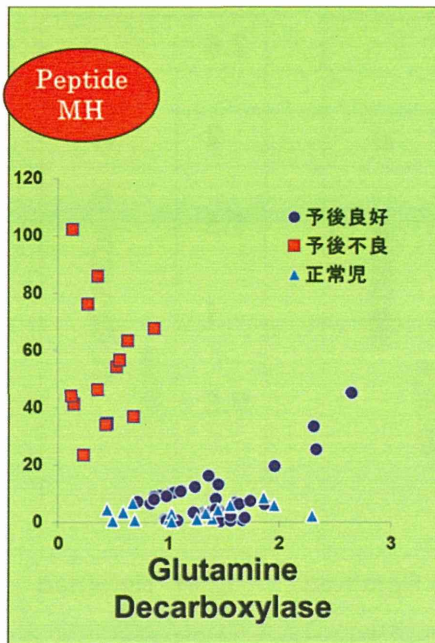


図 6 : 正常児および診断時血清中の Peptide MH および Glutamine Decarboxylase 値と生物学的特性

3) 神経芽腫患者のゲノム解析

多発神経芽腫 5 例の切除標本を、各 2 腫瘍ずつで、10 検体の DNA を抽出して、その全ゲノムエクソンのシーケンス解析を施行した。ヒトゲノムデータベース NCBI human genome build 37.1(hg19)と比較した変異部位は 202,073 あり、10 検体の共通変異部位は 5,730 で、このうち SNP が 5,546、Indel が 181 であった。これらのうち、SNP のデータベースに記載されていないものが 1 であった。この 1 つの SNP は Missense 変異であった (図 7)。

そこで、本年度は、Sporadic な神経芽腫 212 例とさらに健常人 91 人について検討した。健常人 91 名では、Wild 83, Hetero 7, Homo 1 で、Hardy-Weinberg の法則から

Wild allele の頻度は 0.951 であった。

神経芽腫 212 例については、Wild 45, Hetero 144, Homo 23 が Mutated allele freq. = 0.565 であった。腫瘍において、11q LOH がそれぞれ Tumor 2/45, 47/145, 1/23 で、ヘテロに症例で効率的に LOH を認めた。さらに、MYCN 増幅は、それぞれ 2/45, 21/145, 0/23 であった。

ところ、8 例を除いて同一の変異を少なくとも片側アレルに検出し、47 例はホモまたはヘミの変異であった。病理や病期との関連は認めず、予後良好群、予後不良群両者に同様に認めた。

Wild ...gctggaacGt cattgtctgg tectagetgt ...
Variant ...gctggaacCt cattgtctgg tectagetgt ...

図 7 : 多発例 10 腫瘍共通のミスセンス

D. 考察

過去20年近く継続された生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業は、過剰診断による不利益から、休止となったが、一方で、この事業で得られたエビデンスを神経芽腫の診断と治療成績向上に確実に結びつけることは責務である。特に休止にあたり、早急に解決すべき点として①本症の罹患と死亡の正確な把握、②マスの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価、③本症による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立、の三点が挙げられ、これに対して国内外のコホートを用いてすでに終了している後向き研究に加えて、②前向き研究の成果と、③腫瘍特性解析からの新規

マーカーによる早期発見法の確立について
検証を昨年に引き続き継続した。

本年は後向き研究の継続として、2006年
以降に診断された症例の発生頻度と予後の
統計解析と病理所見の検討に加え、これら
の後向き研究から得られるエビデンスにつ
いての検討を昨年に引き続き行った。2010
年度の集計データを追加して検討したが、
休止後は、1歳未満の症例が減少し、予想
通りに2歳以降の症例数が休止後、1歳代
では緩徐に進行する例が有意に増加し、さ
らに2才代では急速に増大する腫瘍も含め
てその恩恵をうけなくなった児が増加して
いて、6ヶ月の神経芽腫マスの本腫瘍にお
ける早期診断例の存在は確実に再確認され
た。

さらに、これらの後向き研究の成果を基
に、施行されてきた生後18ヶ月の前向き研
究グループ成果では、現時点で約7,000出生
に対して1の割合でほぼ自然発症の率と同
等であり、これらのうち明らかな早期診断
症例はなく、有効性を検証する前向き研究
の早期施行が強く期待される。

新たな前向き研究を行うにあたり、施行
時期の問題と共に新たな検査法の導入の検
討を行ってきた。昨年来、血清を用いた
*MYCN*増幅の検討、さらに、血清*NM23*に
加えて、染色体1p及び11qのLOH 検索を
行った。これらの血清診断は、腫瘍特性の
把握に有用と考えられた。また、一昨年度
は網羅的分子追跡法（マスマッピング）に
より、予後不良な神経芽腫に特異的なマー
カーとしてpeptide MHをその候補として
見出した。昨年度は、直接神経芽腫細胞の
培養細胞上清から検索し、Glutamate
Decarboxylateが有用なマーカーであるこ

とを示した。本年度は、この2つのマーカー
を同一血清で検討した。その結果、特異度
及び感度が各々100%で予後不良例を予後
良好例や正常児から明らかに層別すること
が可能となった。今後、前向き研究にて実
証するとともに、さらに容易な検討法を開
発することが必要と考えられた。治療が必
要な腫瘍に特異的な腫瘍マーカーによる層
別法は、新たなスクリーニング法の開発だ
けでなく、臨床の場での診断や治療効果の
判定にも応用可能なマーカーとなると考え
られた。

また、昨年度に引き続き、家族性あるい
は多発神経芽腫のエクソーム解析で見出し
た神経芽腫発症への易罹患性に関わるミス
センス変異について、健常人、通常の神経
芽腫で検討した。明らかに、神経芽腫症例
でこのミスセンス変異が高率認められたこ
とから、この変異が神経芽腫発症にかかわ
っていることが示唆された。さらに、この
遺伝子が11番染色体長腕(11q)にあること
から、通常の神経芽腫検体での11qLOH と
の関連をみると、明らかにこのミスセンス
が片側アレルにある症例で11qLOHが高率
に認められた。11qのこのミスセンス変異と
LOHが神経芽腫発症に関与していること
を強く示唆しており、この遺伝子の機能も
含めて今後も詳細な検討を継続する予定で
あるが、この変異が神経芽腫の易発症性に
関与しているとなれば、スクリーニングに
も応用可能となり、いわゆる神経芽腫のゲ
ノムスクリーニングとして母子保健に応用
される可能性も示唆された。

E. 結論

2,500万以上の6ヶ月児を対象とした神経芽腫検査事業の前後の2,500万以上のコホート解析で、神経芽腫の発症形式とその自然経過について大きな知見がえられつつある。通常の本腫瘍の累積罹患率が、この事業を行うと3倍近く(2,500例に1例)に上昇した一方で、累積死亡率は半減していた。これは、乳児例は相当数が退縮・分化する一方、その中から悪性度を増して進行する腫瘍が存在することを示している。一方で、その後一部の地域で行われている18ヶ月神経芽腫マススクリーニングは退縮・分化する腫瘍の発見はほとんどなく、また、新規マーカーを用いることでより効果的に予後不良例をスクリーニングできる神経芽腫マス確立が可能になると考えられる。

そこで、血清を用いた悪性度診断法へのアプローチとして、本腫瘍細胞の培養上清からバイオマーカー見出す方法として、低分子マーカーの一斉解析法として LC/MS による網羅的検出に加えて、神経芽腫細胞の培養上清からのバイオマーカーの検出をこころみてきた。本年はその2つを組み合わせることで予後不良例のところ、昨年患者血清からのアプローチに加えてさらに有用な候補マーカーを見出した。これらのデータを蓄積し、予後不良な神経芽腫に特異的なマーカーの候補を絞り込み、診断・治療効果の判定に応用するだけでなく、今後の新たな形のスクリーニングへ応用する。

本年は、稀ではあるが存在する多発例を用いて、易罹患性に関わるゲノム異常を探索した。その結果、候補となるミスセンス変異を見出した。この変異の存在が、本腫瘍発生の一因子となることが解明されつつ

あり、易罹患群が層別されれば、より効率のよい早期発見や早期治療が可能となり、今後の本腫瘍の治療成績向上に向けて極めて有用な知見となると考えられた。

F. 健康危険情報

昨年と同様に、生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業は、従来から指摘されている乳児の予後良好な腫瘍を過剰診断してきたが、一方、HPLCによる定量法が導入された1990年以降の群では、明らかに2歳以上の症例が半減し、予後向上に寄与していた。そこで、過剰診断を最小にし、さらに早期発見できるスクリーニングは、生後18ヶ月が適切で、すでに26例が発見され全例生存している。この事業によって、予後不良な年長児の神経芽腫症例が増加することが予想され、今後、18ヶ月の神経芽腫スクリーニングの前向き研究などにて対応を早急に行うべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda A, Sotomaru Y, Shiozawa S, Hiyama E. Establishment of ES cells from inbred strain mice by dual inhibition (2i). *The Journal of Reproductive Medicine*, 58: 77-83, 2012.
- 2) Iehara T, Hiyama E, Tajiri T, Yoneda A, Hamazaki M, Fukuzawa M, Hosoi H, Sugimoto T, Sawada T. Is the prognosis of stage 4s neuroblastoma in patients 12 months of age and older really excellent? *European Journal of Cancer*, 48: 1707-12, 2012.
- 3) Sakabe R, Murakami Y, Uemura K,

Sudo T, Hashimoto Y, Kondo N, Nakashima A, Ohge H, Sueda T, Hiyama E. Prognostic significance of telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase expression in ampullary carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 19: 3072-80, 2012.

4) Yuasa Y, Murakami Y, Nakamura H, Uemura K, Ohge H, Sudo T, Hashimoto Y, Nakashima A, Hiyama E, Sueda T. Histological loss of pancreatic exocrine cells correlates with pancreatic exocrine function after pancreatic surgery. *Pancreas*, 41: 928-33, 2012.

5) Ogura T, Hiyama E, Kamei N, Kamimatsuse A, Ueda Y, Ogura K. Clinical feature of ALK mutated neuroblastoma *Journal of Pediatric Surgery*, 47: 1789-96, 2012.

6) Tajiri T, Kimura O, Fumino S, Furukawa T, Iehara T, Souzaki R, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Hishiki T, Hosoi H, Hiyama E, Taguchi T. Surgical strategies for unresectable hepatoblastomas. *Journal of Pediatric Surgery*. 47:2194-8, 2012.

2. 学会発表

1) Hiyama E, Kamimatsuse A, ueda Y, Ogura K, Watanabe K, Hishiki T, Tajiri T, Ida K, Yano M, Kondo S, Oue T, Sasaki F. Cisplatin plus pirarubicin based chemotherapy for hepatoblastoma: Experience and future in japanese study group for pediatric liver tumor (JPLT). The 7th

SIOP Asia Congress. April 22, 2012.

2) Hiyama E, Fukuzawa M, Hosoi H, Yano K, Nakayama M, Yoneda A, Iehara T, Masujima T, Ohtaki M. Early detection for neuroblastoma: Japanese experience of screening and new strategies for early detection. The 7th SIOP Asia Congress. April 22, 2012

3) 上松瀬新、河島茉澄、三木瑞香、中村和洋、権丈雅樹、小倉薫、檜山英三. 再発時に臍内転移を認めた胞巣型横紋筋肉腫の1例. 第53回中国四国小児がん研究会. 徳島市. 2012年4月21日.

4) 河島茉澄、上松瀬新、上田祐華、小倉薫、世羅康彦、有廣光司、堀江弘、檜山英三. DSRCTの1例. 第53回中国四国小児がん研究会. 徳島市. 2012年4月21日.

5) 檜山英三. 小児固形腫瘍の基礎的研究と治療戦略への展開. 京都小児固形腫瘍フォーラム. 京都市. 3023年5月11日.

6) 本多昌平, 岡田忠雄, 宮城久之, 檜山英三, 武富紹信. 肝芽腫の組織型に関するDNAメチル化以上と予後予測マーカー確立の試み. 第49回日本小児外科学会学術集会. 横浜市. 2012年5月14日.

7) 上松瀬新, 小倉薫, 檜山英三. 地方大学病院における小児がんの小児外科介入までの期間の検討. 第49回日本小児外科学会学術集会. 横浜市. 2012年5月14日.

8) 河島茉澄, 上松瀬新, 小倉薫, 前野誓子, 西村裕, 辻恵二, 檜山英三. 家族性静脈管開存症の1家系. 第49回日本小児外科学会学術集会. 横浜市. 2012年5月15日.

9) Marcio H. Malogolowkin, Piotr Czauderna, Beate Haberle, Eiso Hiyama, Irene Schmid, Mark Krailo, Rudolf