

- Obstet Gynecol. Res. 37:1447–1454, 2011.
- 14) Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y. : Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice., Nature Nanotechnology. 6:321–328, 2011.
 - 15) Matsuda M., Kawamichi Y., Shiozaki A., Saito S., Hayashi H.: Comparison of risk factors for placental abruption and placenta previa : case-cohort study. J Obstet Gynecol. Res. 37:538–546, 2011.
 - 16) Hayashi K., Matsuda Y., Kawamichi Y., Shiozaki A., Saito S.: Smoking during pregnancy increases risks of various obstetric complications: A case-cohort study of the Japan Perinatal Registry Network Database. J Epidemiol. 21:61–66, 2011.
 - 17) Yoneda S., Shiozaki A., Shima T., Ito M., Yamanaka M., Hidaka T., Sumi S., Saito S.: Prediction of exact delivery time in patients with preterm labor and intact membranes at admission by amniotic fluid interleukin-8 level and preterm labor index. J Obstet Gynecol. Res. 37: 861–866, 2011.
 - 18) Molvarec A., Ito M., Shima T., Yoneda S., Toldi G., Stenczer B., Vászárhelyi B., Rigó J. Jr, Saito S.: Decreased proportion of peripheral blood vascular endothelial growth factor-expressing T and natural killer cells in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol. 203: 567.e1–567.e8, 2010.
 - 19) Saito S.: Th17 cells and regulatory T cells: New light on pathophysiology of preeclampsia. Immunology and Cell Biology. 88:615–617, 2010.
 - 20) Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M.: Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell paradigm in pregnancy. Am J Reprod Immunol. 63:601–610, 2010.
 - 21) Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A., Ishii N., Sugamura K., Saito S.: Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance during early stage of pregnancy, but not necessary during late stage of pregnancy in allogeneic mice. J. Reprod Immunol 85:121–129,2010.
 - 22) Nakashima A., Ito M., Shima T., Bac N.D., Hidaka T., Saito S.: Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. Am J Reprod Immunol. 2010: 64:4–11.
 - 23) Nakashima A., Ito M., Yoneda S., Shiozaki A., Hidaka T., Saito S.: Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. Am J Reprod. Immunol.63:104–109, 2010.
 - 24) Ito M., Nakashima A., Hidaka T., Okabe M., Bac N.D., Ina S., Yoneda S., Shiozaki A., Sumi S., Tsuneyama K., Nikaido T., Saito S. :A role for IL-17 in induction of an inflammation at fetomaternal interface in preterm labour. J.Reprod Immunol. 84:75–85, 2010.
 - 25) 塩崎有宏, 齋藤滋: 膣炎, 頸管炎, 細菌性膣症と早産対策.産婦人科の実際 61:563–569, 2012.
 - 26) 米田 哲, 齋藤 滋: リトドリン塩酸塩の後発医薬品から先発医薬品に切り替えて妊娠を継続しえた早産ハイリスク妊婦の 2 症例. 産婦人科の実際. 61:1395–1399, 2012.
 - 27) 塩崎有宏, 齋藤 滋:細菌性膣症. 周産期医学. 41:218–220, 2011.
 - 28) 米田 哲, 米田徳子, 齋藤 滋:絨毛膜羊膜炎. 周産期医学. 41:224–225, 2011.
 - 29) 塩崎有宏, 米田 哲, 米田徳子, 齋藤 滋. 感染症と羊水検査. 産科と婦人科. 10:1217–1222, 2011.

30) 齋藤 滋:わが国における早産の実態. 臨床婦人科産科. 65: 1408-1413, 2011.

31) 米田徳子, 米田 哲, 塩崎有宏, 齋藤 滋. 早産マーカーの評価. 周産期医学. 41:467-472, 2011.

2. 学会発表

1) Saito S: The role of regulatory T cells and regulatory NK cells during pregnancy. The Congress of the Hungarian Society for Reproductive Immunology, 2012, 12, 12, Pécs, Hungary.

2) Saito S: The pathophysiology of poor placentation in preeclampsia. The 200th anniversary of Dept of Obstet. and Gynecol, Semmelweis University foundation, 2012, 12, 10, Budapest.

3) Saito S: Impaired autophagy of extravillous trophoblast (EVT) by soluble endoglin may disturb EVT invasion and vascular remodeling. 8th International Workshop Reunion reproductive immunology, immunological tolerance and immunology of preeclampsia. 2012, 11, 26-29, Reunion Island.

4) Saito S: No maternal death caused by pandemic (H1N1) 2009 in Japan. The second isirv-Antiviral Group Conference in conjunction with NIHE, 2012, 10,29-31, Hanoi.

5) Saito S: Novel methods to detect infection for predicting the prognosis of preterm birth. American Society for Reproductive Immunology (ASRI) 's Second Clinical Reproductive Immunology Symposium, 2012, 10,27-28, Providence (Invited).

6) Saito S.: How does the maternal immune 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) Saito S.: Regulatory T cells and regulatory NK cells play very important role for maintenance of pregnancy. Australian Society for Immunology International Conference, 2011, 12, 11-15, Adelaide. (Invited)

9) Saito S., Yoneda S., Yoneda N.: To detect intrauterine inflammation and to evaluate intra-amniotic infection predict the prognosis of preterm labor cases. 31st Annual Meeting of The American Society for Reproductive Immunology, 2011, 5, 19-22, Salt Lake City (Invited).

10) Saito S., Shima T., Nakashima A., Lin Y.: Paternal antigen specific Treg cells proliferate in uterine draining lymph nodes before the implantation and in the uterus after the implantation. International Conference on Reproductive Immunology 2010 Shanghai. 2010.11.29-12.2, Shanghai (Invited)

11) Saito S., Shima T., Nakashima A.:Beyond Th1/Th2 - Leucocyte polarization in pregnancy. 8th European Congress on Reproductive Immunology, 2010, 11, 11-14, Munich. (Invited)

12) Saito S., Nakashima A., Shima T., Molvarec A.: What is the role of immune system in the pathogenesis of

- preeclampsia? Int. Symp. for Immunol. of Reprod (ISIR-Osaka 2010) 25th Annual Meeting of Japan Soc. for Immunol of Reprod., 2010, 8, 28-29, Osaka. (Invited)
- 13) Saito S.: The role of regulatory NK cells and regulatory T cells in the maintenance of pregnancy. XI International Congress of Reproductive Immunology, 2010, 8, 15-19, Queensland, Australia. (Invited)
- 14) Saito S.: The role of NK cells and T cells in the pathogenesis of preeclampsia. 7th International Workshop on Immunology of Pregnancy/Preeclampsia, 2010, 8, 8-12, Tioman Island, Malasia. (Invited)
- 15) Saito S.: Immunoregulation in human and mouse pregnancy. Immunologie van de voortplanting 2010, 2010, 5, 26, Netherlands. (Invited)
- 16) Saito S.: Prevention of preterm birth and treatment for women in preterm labor. 2010, Lecture at Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University, 2010, 4, 8-11, Shanghai. (Invited)
- 17) Saito S. Prevention of Preterm Birth and Treatment for Women in Preterm Labor. 2010 Vietnam Immunology meeting, Hanoi, 2010, 3, 4-5. (Invited)
- 18) Saito S. What is the role of immune system in the pathogenesis of pre-eclampsia? 2010 Vietnam Immunology meeting, Hanoi, 2010, 3, 4-5. (Invited)
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 齋藤滋, 中島彰俊, 塩崎有宏, 佐々木泰, 島友子, Molvarec A.: 妊娠高血圧腎症 (preeclampsia) の病態と予測因子. 日本高血圧学会合同シンポジウム. 2011, 10, 20, 宇都宮. (招待講演)
- 22) 齋藤滋, 島友子, 中島彰俊: 制御性 T 細胞、制御性 NK 細胞からみた妊娠維持機構. 免疫疾患学会連合 2011 合同シンポジウム 2. 2011, 9, 16, 東京. (招待講演)
- 23) 齋藤 滋: 早産について考える. 前期山梨県産婦人科集談会, 2010, 6, 4, 山梨. (招待講演)
- 24) 齋藤 滋: 早産について考える. 広島県南部地区産婦人科医会学術講演会, 2010, 6, 18, 広島. (招待講演)
- 25) 齋藤 滋: 早産について考える. 第 23 回福井県母性衛生学会, 2010, 6, 27, 福井. (招待講演)
- 26) 齋藤 滋: 日本における早産の実態と早産予防対策. 京都産婦人科医会, 2010, 7, 17, 京都. (招待講演)
- 27) 齋藤 滋: 本邦における早産・低出生体重児の急激な増加についていかに対応すべきか. 第 55 回日本未熟児新生児学会学術集会, 2010, 11, 5, 神戸. (招待講演)
- 28) 齋藤 滋: 早産の予防と治療に関する最近の知見. 兵庫県産科婦人科専門医生涯研修会, 2010, 12, 18, 姫路. (招待講演)
- 29) 齋藤 滋: 新しい産科医療の治療方針. 富山県看護協会 助産師職能集会, 富山, 2010, 3, 20. (招待講演)
- 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的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た。分担研究として、ゲノム全域症例対照関連分析のための研究デザインについて検討し、必要症例数を推定するとともに、周産期疾患のひとつである不育症をモデル疾患として、ゲノム全域 SNP データに基づく症例対照関連分析を実施した。

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的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。本分担課題では、ゲノム全域症例対照関連分析のための研究デザインの検討、ならびに周産期疾患のひとつである不育症をモデル疾患としたゲノム全域 SNP データに基づく症例対照関連分析の実践を目的とした。

B. 研究方法

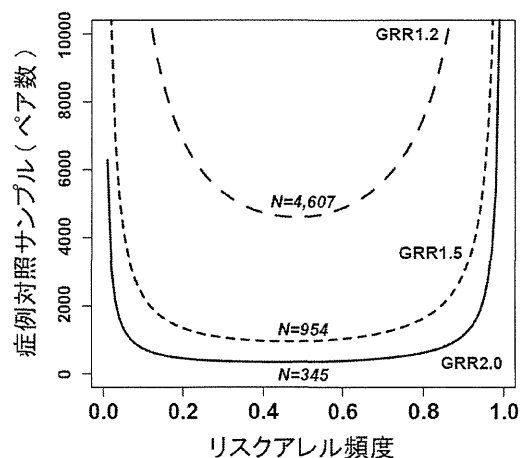
研究デザインの検討では、ゲノム全域症例対照関連研究における有意水準値を 10^{-7} に設定し、様々な要因寄与率(遺伝子型相対リスク GRR)を仮定し、検出力 80%以上となる症例対照数(ペア数)を統計学的に推定した。

関連解析の実践では、不育症 78 例、正常分娩対照 334 例につき、Illumina 社 HumanOmni1 あるいは Omni2.5 BeadChip を用いて共同研究として取得されたゲノム全域 SNP 遺伝子型データに基づく症例対照関連分析をケーススタディとして実施した。

C. 研究結果

アレル頻度が比較的高い(頻度 5%以上)一塩基多型の遺伝子型情報に基づくゲノム全域症例対照関連研究デザインについて検討した結果の一例を右図に示す。遺伝子型相対リスク GRR 1.5 の疾患関連

多型を同定するためには症例対照ともに 1000 例程度以上必要であると推定された。



一方、不育症をモデル疾患としたゲノム全域 SNP データに基づく症例対照関連分析からは、遺伝的効果の大きな不育症関連 SNP が存在する可能性は低いこと、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な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明らかにした。

D. 考察

関連分析に用いたサンプルサイズに関する考察より、遺伝的寄与率の非常に大きな SNP が不育症発症に関わることはないと考えられる。一方、他の多因子疾患と同様、不育症発症に対しても、遺伝的寄与度が小〜中であるリスク SNP が関与すること、な

らびに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唆する知見を得た。より大規模の症例対照関連解析の実施により、この可能性を評価することができると思われる。

E. 結論

周産期異常を伴う疾患の発症に関わる遺伝要因探索において、比較的頻度の高いリスク多型を同定するための統計学的基盤は整備された。モデル疾患とした不育症の共通リスクを同定するためには、他の多因子疾患研究と同様、症例対照関連解析の大規模化が必要であることを示した。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Low SK, Kirschek B, Auburger G, Simon M, Krex D, Arlier Z, Nayak N, Ruigrok YM, Niemelä M, Tajima A, von und zu Fraunberg M, Dóczi T, Wirjatijasa F, Hata A, Blasco J, Oszvald A, Kasuya H, Zilani G, Schoch B, Singh P, Stüer C, Risselada R, Beck J, Sola T, Ricciardi F, Aromaa A, Illig T, Schreiber S, van Duijn CM, van den Berg LH, Perret C, Proust C, Roder C, Ozturk AK, Gaál E, Berg D, Geisen C, Friedrich CM, Summers P, Frangi AF, State MW, Wichmann HE, Breteler MM, Wijmenga C, Mane S, Peltonen L, Elio V, Sturkenboom MC, Lawford P, Byrne J, Macho J, Sandalcioglu EI, Meyer B, Raabe A, Steinmetz H, Rufenacht D, Jääskeläinen JE, Hernesniemi J, Rinkel GJ, Zembutsu H, Inoue I, Palotie A, Cambien F, Nakamura Y, Lifton RP, Günel M. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. *Nat Genet* 42(5), 420–425, 2010.
- 2) Kirschek B, Tajima A, Akagawa H, Narita A, Ruigrok Y, Rinkel G, Wijmenga C, Feigl GC, Kim CJ, Hori T, Tatagiba M, Kasuya H, Inoue I. Association of the Jun dimerization protein 2 gene with intracranial aneurysms in Japanese and Korean cohorts as compared to a Dutch cohort. *Neuroscience* 169(1), 339–343, 2010.
- 3) Nakaoka H, Takahashi T, Akiyama K, Cui T, Tajima A, Kirschek B, Kasuya H, Hata A, Inoue I. Differential effects of chromosome 9p21 variation on subphenotypes of intracranial aneurysm: site distribution. *Stroke* 41(8), 1593–1598, 2010.
- 4) Akiyama K, Narita A, Nakaoka H, Cui T, Takahashi T, Yasuno K, Tajima A, Kirschek B, Yamamoto K, Kasuya H, Hata A, Inoue I. Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J Hum Genet* 55(10), 656–661, 2010.
- 5) Kurata R, Nakaoka H, Tajima A, Hosomichi K, Shiina T, Meguro A, Mizuki N, Ohono S, Inoue I, Inoko H. *TRIM39* and *RNF39* are associated with Behçet's disease independently of *HLA-B*51* and *-A*26*. *Biochem Biophys Res Commun* 401(4), 533–537, 2010.
- 6) Tabara Y, Kohara K, Kita Y, Hirawa N, Katsuya T, Ohkubo T, Hiura Y, Tajima A, Morisaki T, Miyata T, Nakayama T, Takashima N, Nakura J, Kawamoto R, Takahashi N, Hata A, Soma M, Imai Y, Kokubo Y, Okamura T, Tomoike H, Iwai N, Ogihara T, Inoue I, Tokunaga K, Johnson T, Caulfield M, Munroe P; Global Blood Pressure Genetics Consortium, Umemura S, Ueshima H, Miki T. Common variants in the *ATP2B1* gene are associated with susceptibility to hypertension: the Japanese Millennium Genome Project. *Hypertension* 56(5), 973–980, 2010.
- 7) Adachi S, Tajima A, Quan J, Haino K, Yoshihara K, Masuzaki H, Katabuchi H, Ikuma K, Suginami H, Nishida N, Kuwano R, Okazaki Y, Kawamura Y, Sasaki T, Tokunaga K, Inoue I, Tanaka K. Meta-analysis of genome-wide association scans for genetic susceptibility to endometriosis in Japanese population. *J*

- Hum Genet 55(12), 816–821, 2010.
- 8) Nakabayashi K, Tajima A, Yamamoto K, Takahashi A, Hata K, Takashima Y, Koyanagi M, Nakaoka H, Akamizu T, Ishikawa N, Kubota S, Maeda S, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Sasazuki T, Shirasawa S. Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population. *J Hum Genet* 56(11), 772–778, 2011.
- 9) Nakaoka H, Cui T, Tajima A, Oka A, Mitsunaga S, Kashiwase K, Homma Y, Sato S, Suzuki Y, Inoko H, Inoue I. A systems genetics approach provides a bridge from discovered genetic variants to biological pathways in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 6(9), e25389, 2011.
- 10) Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Ohi K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Itakura M, Takeda M, Ohmori T. Meta-analysis of association studies between *DISC1* missense variants and schizophrenia in the Japanese population. *Schizophr Res* 141(2–3), 271–273, 2012.
- 11) 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.
- 12) 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.

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
なし

2. 学会発表

- 1) 渡邊美恵、田嶋敦、井本逸勢：多因子遺伝

厚生労働科学研究費補助金(次世代研究事業)
(総合) 研究報告書

小児発達スケールの信頼性と妥当性に関する研究

研究分担者 橋本 圭司 国立成育医療研究センター

(要約) 本研究の目的は、乳幼児の発達を経時的に評価することにある。初年度は、広く一般に用いることのできる乳幼児基本動作評価スケール ABMS-C (Ability for basic movement for children の信頼性と妥当性を、次年度は、ABMS-CT (Ability for basic movement for children Type T) の信頼性と妥当性を、最終年度は、乳幼児発達スケール(KIDS)の妥当性を検討した。

橋本圭司・国立成育医療研究センター
リハビリテーション科医長

A. 研究目的

(1) 第1の研究の小児の基本動作を5項目(頭部保持、座位保持、平面移動、立位保持、歩行)を4段階で評価する小児基本動作評価スケール、ABMS-C (Ability for basic movement for children) (図1)を作成し、同評価スケールの信頼性と妥当性を検討することである。

(2) 第2の研究の目的は、小児の応用基本動作を5項目(航空顔面、手先、片足、両足、階段)を4段階で評価する小児基本動作評価スケール、ABMS-CT (Ability for basic movement for children Type T) (図2)を作成し、同評価スケールの信頼性と妥当性を検討することである。

(3) 第3の研究の目的は、乳幼児発達スケール(KIDS) (公益財団法人発達科学研究教育センターより出版) (図3)の妥当性を検討することである。

図1 ABMS-C

Ability for Basic Movement Scale for Children (ABMS-C)

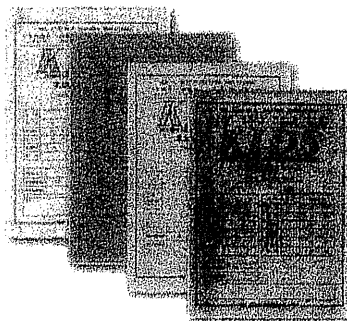
グレード	0	1	2	3
1 頭部保持	頭部が大きく揺れている	頭部が揺れている	頭部が安定している	頭部が完全に安定している
2 座位保持	床に横たわっている	床に座っている	床に正座している	床に正座して両手を膝の上にのせている
3 平面移動	手足で這っている	手足で這っている	手足で這っている	手足で這っている
4 立位保持	手足で這っている	手足で這っている	手足で這っている	手足で這っている
5 歩行	歩行していない	歩行している	歩行している	歩行している

図2 ABMS-CT

Ability for Basic Movement Scale for Children (ABMS-C) Type T

グレード	0	1	2	3
口腔顔面	顔を前方に向けずじまがである	顔を前方に向けずじまがである	顔を前方に向けずじまがである	顔を前方に向けずじまがである
手先	手を握り合せている	手を握り合せている	手を握り合せている	手を握り合せている
片足	両足で立っている	片足で立っている	片足で立っている	片足で立っている
両足	両足で立っている	両足で立っている	両足で立っている	両足で立っている
階段	階段を登ることができない	階段を登ることができない	階段を登ることができない	階段を登ることができない

図3 KIDS



B. 研究方法

(1) 2010年3月から6月の4か月間に、リハビリテーション科へ新規依頼のあった入院患者45名（男児29名、女児16名。年齢1カ月～8歳8か月）を対象に初診時、2週間時にABMS-C, GMFCS評価を行った。ABMS-Cの各項目とGMFCSのグレードとの相関については、Speamanの順位相関係数を用い、内的整合性の検証にはCronbachの α を、再検査法による信頼性の検討には κ 値を、それぞれ用いた。

(2) 2011年3月から4月の2か月間に、国立成育医療研究センターリハビリテーション科へ依頼のあった入院患者49名（男児29名、女児20名。年齢1～15.17歳）を対象にABMS-CTを2名の検者が評価し、WeeFIMも併せて評価した。ABMS-CTの各項目とWeeFIM運動項、認知項目との相関については、Speamanの順位相関係数を用い、内的整合性の検証にはCronbachの α を、検者間信頼性の検討には κ 値を、それぞれ用いた。

(3) 対象は317名（健常児151名、障害児166名）、男169名、女148名、年齢中央値20.00か月（2か月～69か月）家族が評価する乳幼児発達スケール(KIDS)に加え、在胎週数、出生体重、月齢、家族によるAges & Stages Questionnaires, Third Edition (ASQ-3)・Ability for Basic Movement Scale for Children (ABMS-C)・Ability for Basic Movement Scale for Children type T (ABMS-CT), そしてスタッフによるFunctional Independence Measure for Children (WeeFIM)を記録した。

（倫理面への配慮）

診療録の後方視的利用のみの調査と

した。

C. 研究結果

(1) R値=-0.628～-0.784（P値<0.001）でGMFCSスコアとABMS-Cは高い相関関係を示した（表1）。ABMS-Cの各5項目はCronbach α 値=0.944と極めて高い内的整合性を認め、再検査法においても κ 値=0.865～1.00とほぼ完璧な信頼性を認めた（表2）。

表1 ABMS-Cの各項目とGMFCSのグレードとの相関

Variable	Median	Range	r	p
Basic mobility (ABMS-C)	(n = 45)			
"Head control"	1.00	0-3	-0.695	0.0001
"Sitting"	1.00	0-3	-0.784	0.0001
"Locomotion on flat surface"	1.00	0-3	-0.718	0.0001
"Standing"	0.00	0-3	-0.700	0.0001
"Walking"	0.00	0-3	-0.628	0.0001
Total scores of ABMS-C	2.00	0-15	-0.752	0.0001
Age, years	1.30	0.1-8.8	-0.300	0.085
Gross motor function (GMFCS)	5.00	1-5		

ABMS-C = Ability for Basic Movement Scale for Children.
GMFCS = Gross Motor Function Classification System.

表2 ABMS-Cの信頼性

Table 2
Test-retest reliability of each ABMS item with intra-class correlations in 15 pediatric patients.

Test and retested ABMS-C	(n = 15)		Reliability κ
	Median	Range	
"Head control"	3.00	0-3	1.000
Retested "head control"	3.00	0-3	
"Sitting"	1.00	0-3	1.000
Retested "sitting"	1.00	0-3	
"Locomotion on flat surface"	2.00	0-3	1.000
Retested "locomotion on flat surface"	2.00	0-3	
"Standing"	0.00	0-3	0.868
Retested "standing"	0.00	0-3	
"Walking"	0.00	0-3	0.865
Retested "walking"	0.00	0-3	

ABMS-C = Ability for Basic Movement Scale for Children, κ = kappa coefficient.

(2) R値=0.753～0.878（P値=0.0001）でABMS-CTは、WeeFIM運動スコア、認知スコアと、それぞれ高い相関関係を示した

(表3)。ABMS-CTの各5項目はCronbach's α 値=0.970と極めて高い内的整合性を認め、検者間信頼性もk値=0.854-0.925とほぼ完ぺきな値を認めた(表4)。

表3 ABMS-CTとWeeFIMスコアの相関

Correlation between ABMS-CT scores, WeeFIM scores, and age Spearman's rank correlation with WeeFIM

Variable	Median	Range	With motor WeeFIM	With cognitive WeeFIM	p
Basic mobility (ABMS-CT)	10 (0-43)				
Head and facial area	2.00	0-3	0.836	0.827	0.000
Hands and fingers	2.00	0-3	0.827	0.863	0.000
Other leg	1.00	0-2	0.838	0.794	0.000
Both legs	1.00	0-1	0.789	0.751	0.000
Stair	2.00	0-3	0.809	0.833	0.000
Total scores of ABMS-CT	8.66	0-13	0.854	0.854	0.000
Age, years	4.38	1.00-13.17	0.266	0.599	0.000
Motor WeeFIM	19.00	0-31	0.855	0.800	0.000
Cognitive WeeFIM	19.00	0-35	0.858	0.800	0.000

ABMS-CT, Ability for Basic Movement Scale for Children Type T; WeeFIM, Functional Independence Measure for Children.

表4 ABMS-Cの検者間信頼性

Intra-rater reliability of each ABMS-CT item by two physicians with kappa coefficient in 42 pediatric patients

Item name of ABMS-CT	Physician	Median (0-43)	Range	Reliability
Head and facial area	A	1.00	0-3	0.835
	B	1.50	0-3	0.835
Hands and fingers	A	1.00	0-3	0.854
	B	1.50	0-3	0.854
Other leg	A	0.00	0-1	0.925
	B	0.00	0-1	0.925
Both legs	A	0.00	0-1	0.897
	B	0.50	0-1	0.897
Stair	A	2.00	0-3	0.881
	B	1.50	0-3	0.881

ABMS-CT, Ability for Basic Movement Scale for Children Type T; A, kappa coefficient.

(3) 結果、KIDS による発達年齢及び発達指数は9項目において内的整合性があり(Cronbach's $\alpha = 0.969, 0.942$)、生活年齢と有意に相関していた。KIDS による発達年齢はABMS-CとABMS-CT、そしてWeeFIM運動、WeeFIM認知、ASQ-3のコミュニケーション、粗大運動、微細運動、問題解決、個人-社会などの項目の合計点と有意に相関していた($r = 0.417-0.894, p < 0.01$)。また、KIDS による発達指数は、在胎週数や出生体重と有意に相関していた($r = 0.353, 0.299, p < 0.01$) (表5)。

表5. KIDS と他の発達検査との相関

Spearman's rank correlation coefficients **p<0.01, ***p<0.001

Variable	Median	Range	with ASQ-3 (n=940)					
			communication	gross motor	fine motor	problem solving	personal-social	
Family-rated KIDS								
	total	16.50	8-43	0.428**	0.603**	0.417**	0.459**	0.600**
age of motor								
	developmental age, mo	16.00	8-72	0.363**	0.607**	0.387**	0.387**	0.502**
communication								
	developmental age, mo	19.10	1-61	0.308**	0.520**	0.374**	0.303**	0.471**
fine motor								
	developmental age, mo	18.00	1-47	0.401**	0.514**	0.416**	0.479**	0.509**
gross motor								
	developmental age, mo	18.00	1-62	0.405**	0.618**	0.363**	0.477**	0.570**
problem solving								
	developmental age, mo	18.00	1-50	0.470**	0.627**	0.356**	0.470**	0.574**
personal-social								
	developmental age, mo	17.00	1-7-430	0.477**	0.607**	0.385**	0.374**	0.467**
with children								
	developmental age, mo	16.00	1-5-76	0.520**	0.624**	0.456**	0.349**	0.467**
with adults								
	developmental age, mo	19.10	1-55	0.370**	0.571**	0.345**	0.249**	0.365**
with siblings								
	developmental age, mo	20.00	1-5-56	0.400**	0.532**	0.455**	0.225**	0.300**
with siblings								
	developmental age, mo	18.00	1-5-4-154	0.405**	0.533**	0.341**	0.416**	0.383**
overall								
	developmental age, mo	18.00	1-5-50	0.417**	0.607**	0.416**	0.467**	0.612**
Age, yrs	10.00	2-40	0.301**	0.573**	0.279**	0.208**	0.308**	
Point of gestation, d	18.00	23-41						
Birth weight, g	3072.00	470-4930						

with ABMS-CT

Variable	ABMS-C		ABMS-CT		Age, mo (n=207)	Point of gestation, d (n=201)	Birth weight, g (n=207)
	r	p	r	p			
Family-rated KIDS							
	total	0.878**	0.203**	0.894**	0.004**	0.326	0.816
age of motor							
	developmental age, mo	0.841	0.002	-0.166**	-0.146**	0.335**	0.200**
communication							
	developmental age, mo	0.819**	0.000**	0.091**	0.001**	0.266	0.180
fine motor							
	developmental age, mo	0.855**	0.000**	0.091**	-0.107**	0.280	0.205**
gross motor							
	developmental age, mo	0.879**	0.000**	0.087**	0.010**	0.212**	0.201**
problem solving							
	developmental age, mo	0.864**	0.000**	-0.029	-0.224**	0.170**	0.201**
personal-social							
	developmental age, mo	0.851**	0.000**	0.077**	0.033**	0.180	0.190
with children							
	developmental age, mo	0.873**	0.000**	-0.024	-0.211**	0.207**	0.200**
with adults							
	developmental age, mo	0.857**	0.000**	0.077**	0.033**	0.170	0.180
with siblings							
	developmental age, mo	0.833**	0.000**	-0.024	-0.211**	0.214**	0.207**
with siblings							
	developmental age, mo	0.833**	0.000**	0.077**	0.033**	0.170	0.180
with siblings							
	developmental age, mo	0.808**	0.000**	-0.024	-0.211**	0.200**	0.200**
overall							
	developmental age, mo	0.850**	0.000**	0.077**	0.033**	0.170	0.180
Age, yrs	0.285**	0.000**	0.285**	0.000**	0.270**	0.270**	
Point of gestation, d	-0.135**	-0.000**	-0.135**	-0.000**	0.220**	0.220**	
Birth weight, g	0.353**	0.000**	0.299**	0.000**	0.299**	0.299**	

KIDS, Infant-Toddler Development Scale; ABMS-C, Ability for Basic Movement Scale for Children Type T; ABMS-CT, Ability for Basic Movement Scale for Children Type T; WeeFIM, Functional Independence Measure for Children.

D. 考察

(1, 2) 小児運動機能の評価バッテリーにはGMFCS, GMFM, WeeFIM, PEDI、ベイリー運動発達評価スケール等が挙げられる。しかしこれらが、実際の臨床の場面で汎用されているとは言い難い側面もある。これには臨床、療育の現場で小児基本動作を評価するには内容が複雑で手間がかかるからと思われる。今回、我々の作成した小児基本動作スケール; ABMS-CとABMS-CTの高い信頼性と妥当性が明らかとなった。

(3) 小児発達検査のゴールドスタンダードとして、デンバーIIやベイリーIII、WISC-IVなどがある。しかしながら、これらの検査は、質問票上で採用することは困難である。今回、我々が検討したKIDSは、いつでもどこでも家族によって評価可能な発達スケールである。KIDS と他の発達スケールが有意な相関を認めたことは、KIDS

の妥当性を示唆する結果と考えられた。

E. 結論

(1, 2) ABMS-C及びABMS-CTは簡便に評価することができ、評価結果から患者の応用基本動作が容易に想像することができることから、今後各スタッフ間で患者イメージの共有化に有用な評価スケールになると考える。

(3) KIDSは、質問紙上で簡便に評価することができ、本研究から、発達評価スケールとしての妥当性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

a) Miyamura K, Hashimoto K, Honda M. Validity and reliability of Ability for Basic Movement Scale for Children (ABMS-C) in disabled pediatric patients. Brain Dev 2011;33:508-11.

b) Hashimoto K, Miyamura K, Honda M. Evaluation of Ability for Basic Movement Scale for Children Type T (ABMS-CT) in disabled children. Brain Dev 2012;34:349-53.

c) Hashimoto K, Sakamoto N, Takekoh M, Ikeda N, Kato K, Honda M, Tamai S, Miyamura K, Horikawa R, Ohya Y. Validity of the Family-Rated Kinder Infant Development Scale (KIDS) for Children. Journal of Pediatric Rehabilitation Medicine; in press

分担課題: 新生児のエピゲノム多様性の解析

研究分担者 秦健一郎

研究要旨

ヒトの発生と生存に必須の機構であるエピジェネティックな遺伝子発現制御は、環境によって変化し、遺伝子配列の変異を伴わないにもかかわらず、細胞分裂を経て安定に長期にわたり遺残する。このような現象は、例えば胎内環境が胎児や出生児に長期にわたり与える影響の分子機構の一つであることがモデル生物では示されており、注目されている。本研究では、新生児のエピゲノム解析の中でも、特に生理的に存在する DNA メチル化状態の違い=多様性に着目し、出生児のエピゲノム状態標準データを整備し、将来の疾患児エピゲノム異常診断に役立てることを目指す。

A. 研究目的

胎内環境や養育環境が、出生児の将来の生活習慣病の発症等に関与する可能性が提唱されている。実際に動物では、初期胚の体外培養などの胚操作技術や、母体の食餌が、児の遺伝子発現を変化させる事が知られている。ヒトでも同様の環境要因による影響が、未知の機構により遺残し、出生後も長期に渡り遺伝発現の変化(遺伝子発現異常)を引き起こす可能性が懸念されているが、系統的な解析は未だになされておらず、本研究で得られる基盤的情報の医学的意義は高い。

初年度に続き、検体の収集を継続した。解析対象症例(正常症例)を抽出し、対象症例のゲノム DNA をバイサルファイト PCR 法により処理し、非メチル化シトシンをチミンに変換した。バイサルファイト PCR 法によって変換された塩基配列の一塩基多型を利用して、任意の領域の DNA メチル化状態を、一塩基レベルの解像度で、かつ定量的に解析した。これらの解析から、正常例におけるエピゲノム多様性(エピジェネティックな修飾状態の揺らぎ、正常範囲)を検証し、異常症例の検出に必要な基準値を設定した。

B. 研究方法

H22 年度

分娩後に、胎盤の異なる部位 4 箇所から胎盤組織片(径 1cm 程度)と、臍帯血を 2ml 以上採血した。EDTA あるいはヘパリン等の抗凝固剤入りの採血管を用い、精製処理まで凍結保存した。母体血は、いずれの時期に採血したものでも利用可能であり、CBC 検査用の EDTA 採血管で 2ml を採取し、同様に凍結保存した。胎盤組織片からは、ゲノム DNA と RNA を回収した。血液からは、ゲノム DNA を精製回収した。

H23 次年度

H24 年度

特に、絨毛細胞の分化異常が疑われる症例を抽出し、DNA メチル化状態の定量初解析を行った。次年度までの解析で得られた、正常新生児のエピゲノム多様性の基準値を参考に、逸脱する領域、症例群の有無を検討した。

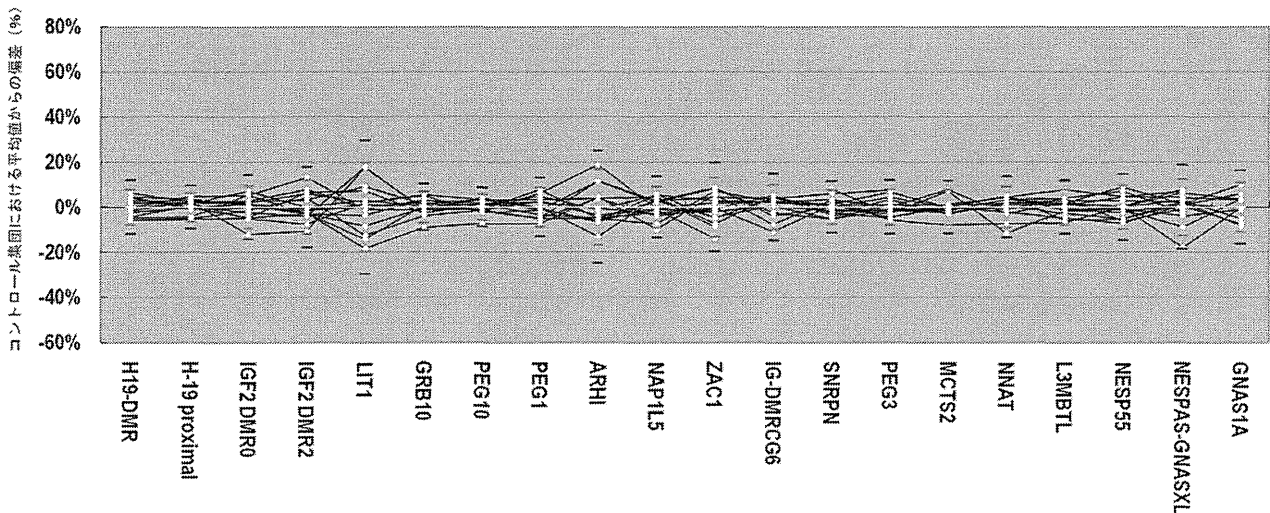
倫理面への配慮

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する。本研究に関わる症例検体収集及び解析の詳細は、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を受けた(承認番号 234、406)

C. 研究結果

初年度（H22年度）は、主に検体収集体制の構築を行った。研究協力機関で、我々の倫理申請を基に、本研究を行うための倫理申請を行った。高品質の血液検体および胎盤組織を、安全

エピジェネティックな情報は、ジェネティックな情報（遺伝子配列）と異なり、発生時期や臓器によって異なる可能性がある。すなわち、新生児のエピジェネティックな状態を評価するには、新生児の組織を解析することが必須で



かつ効率的に、研究協力機関から収集する体制を整えた。検体数の増加に伴い、血液サンプルからのゲノム DNA 回収は、自動化ロボットを利用し、自動化ロボットを利用する際の検体量、検体の状態（抗凝固剤、凍結の影響）、DNA 濃度、その後の解析実験への影響を検証した。

次年度（H23年度）は、正常例（特に合併症を認めない正常産の臍帯血）を中心に、網羅的な DNA メチル化解析を試験的に行った。特に、ヒトで特殊な DNA メチル化制御を受けている約 30 領域を、定量的に解析する系を立ち上げた。（図 1）

最終年度は、これらの解析系を用い、胎盤機能異常が疑われる症例の解析を行った。のべ 44 か所で、我々の取得した正常範囲から外れた DNA メチル化状態（異常 DNA メチル化状態）が同定された（図 2）。

ある。また、ジェネティックな情報には一塩基多型のような多様性・個体差があるが、同様にエピジェネティックな情報にも、個体差があると考えられる。そのためにも、健常者のエピジェネティックな状態を標準値として検証取得することで、全てのエピジェネティックな解析に必要な基盤的知見を提供することができる。

本研究では、エピゲノム多様性の指標として、主に DNA メチル化状態を解析している。DNA メチル化状態は、ゲノムインプリンティングなどの主要な制御機構であり、特に胎児と胎盤の発生発育に重要な役割を担う。がん細胞などを中心とした既知の疾患に対し、既知の原因遺伝子プロモーター領域を標的に、局所的解析が盛んに行われているが、正常分娩例における DNA メチル化状態の多様性（個人差、基準値）は明らかでない。初年度に整備した検体収集体制と、本年度に確立したスクリーニング体制を利用し、新生児のエピゲノム多様性の解析を進めた。これらの解析結果から、図に示すように、胎児発育異常との関連が強く疑われるゲノム領域の DNA メチル化異常に加え、これまで胎児発育異常との関連が報告されていない領域の DNA メチル化異常がのべ 44 か所同定された。

D. 考察

エピジェネティックな遺伝子発現制御は、正常なヒトの発生と生存に必須であると同時に、様々な疾患との関連も明らかになりつつあり、エピジェネティックな異常を網羅的に調べる様々な大規模な国際プロジェクト（エピゲノムプロジェクト）が進行中である。

E. 結論

研究計画は当初の予定通り完了し、多数検体の網羅的なエピゲノム解析(DNAメチル化解析)体制が整備された。これらの標準データを用い、今後、疾患例のエピゲノム多様性(異常)の解析を進めていく。

F. 健康危険情報

該当せず。

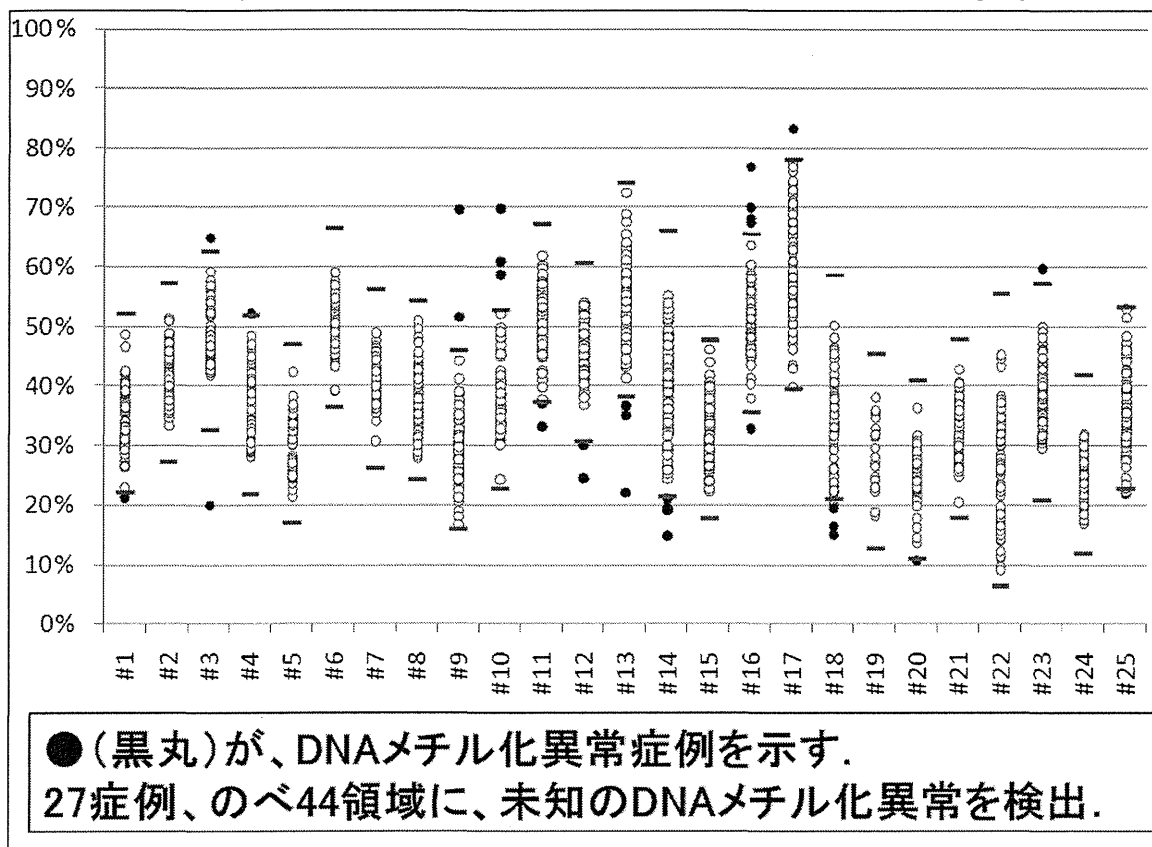
G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomizawa SI, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H. Development. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. 2011 Jan 19. [Epub ahead of print]
2. Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Masubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T. J Hum Genet. Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and up(14)pat-like phenotypes. 2010 Nov 11. [Epub ahead of print]
3. Yamazawa K#, Nakabayashi K#, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T. (2010) Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell Syndrome-like phenotype. J. Med. Genet. (in press)
4. 秦健一郎 (2010)「胎児発育とゲノムインプリンティング」HORMONE FRONTIER IN GY7NECOLOGY 17, 43-48.
5. Swallowood SA, Tomizawa S, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-Pichon A, Sato S, Hata K, Andrewes SR, Kelsey G. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet* 43 811-814 2011.
6. O'Doherty AM, Rutledge CE, Sato S, Thakur A, Lees-Murdock DJ, Hata K, Walsh CP. DNA methylation plays an important role in promoter choice and protein production at the mouse Dnmt3L locus. *Dev Biol* 356 411-420 2011.
7. Sato S, Yoshida W, Soejima H, Nakabayashi K, Hata K. Methylation dynamics of IG-DMR and Gtl2-DMR during murine embryonic and placental development. *Genomics* 98 120-127 2011.
8. Characterization of novel paternal ncRNAs at the Plagl1 locus, including Hymai, predicted to interact with regulators of active chromatin. Iglesias-Platas I, Martin-Trujillo A, Cirillo D, Court F, Guillaumet-Adkins A, Camprubi C, Bourc'his D, Hata K, Feil R, Tartaglia G, Arnaud P, Monk D. PLoS One. 査読有 2012;7(6):e38907.

9. Aberrant methylation of H19-DMR

occurs after the segregation of the



acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Am J Med Genet A. 査読有 2012;158A(7):1670-5.

10. Imprinted DNA methylation reprogramming during early mouse embryogenesis at the Gpr1-Zdbf2 locus is linked to long cis-intergenic transcription. Kobayashi H, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Kono T. FEBS Lett. 査読有 2012 23;586(6):827-33.

11. Trophoblast-specific DNA methylation

trophoblast and inner cell mass in the mouse periimplantation embryo. Nakanishi MO, Hayakawa K, Nakabayashi K, Hata K, Shiota K, Tanaka S. Epigenetics. 査読有 2012 Feb;7(2):173-82.

12. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T. PLoS Genet. 査読有 2012 ;8(1):e1002440.

2. 学会発表

1) 秦健一郎「生殖に関わるエピジェネティクスとその異常」教育講演、日本生殖医学会、徳島、11月12日、2010.

- 2) 教育講演 秦健一郎：「合併症妊娠におけるゲノム解析」第28回日本糖尿病・妊娠学会年次学術集会 2012.11.17
- 3) 招待講演 秦健一郎：ジェネティクスを越えてエピジェネティクスへ-周産期のエピジェネティクス- 遺伝医学合同学術集会（第35回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、第18回日本遺伝子診療学会大会、第17回日本家族性腫瘍学会学術集会）、2011.6.18
- 4) 招待講演 秦健一郎：ヒト異常妊娠のエピジェネティクス 大阪大学蛋白質研究所セミナー 「疾患におけるエピゲノム異常の分子機構」大阪、2011.11.18
- 5) 招待講演 秦健一郎：「次世代遺伝子解析技術を用いた生殖発生異常のゲノム研究」第30回日本受精着床学会学術講演会 2012.8.31
- 6) 招待講演 秦健一郎：「最先端テクノロジーを駆使したヒト周産期疾患ゲノム解析への取り組み」第19回遺伝子診断学会 2012.7.27
- 7) 招待講演 秦健一郎：「ヒト発生異常のゲノム解析・エピゲノム解析」東京大学大学院 農学部 応用動物科学セミナー 2012.7.20

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 6ヶ月児を対象とした神経芽腫検査事業が、平成15年に休止され、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、の三点への対応が課せられ、その後の解析で、この検査事業で本腫瘍の6歳までの累積罹患率が約2.8倍に上昇した一方で、6歳までに罹患した腫瘍による累積死亡率は半数に減少していた。そこで、本分担研究では、母子コホート研究として、本症の発生機序を解明し、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した。

神経芽腫検査事業の休止後のコホート解析を2010年登録例まで検討した結果、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。国際神経芽腫リスク分類委員会(INRG)のデータとの比較からは、検査事業を施行したコホートでは2歳以上のMYCN増幅した予後不良例の有意な低下が示され、乳児期に発症した腫瘍が予後不良腫瘍に転化することが示された。施行中の症例を休止後症例と比較すると、予後不良例が1歳以降特に2歳代で増加していた。

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、札幌での現在までのデータを集計すると、受診例が約20万人に達し、約7000人に1例の発見率で、明らかな過剰診断症例はなく、現在、全例生存で、ある程度の有効性が示されつつある。

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非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、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 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と国際比較から検証し、さらに、予後不良な神経芽腫を早期発見するために有効かつ特異性の高い検査法の確立を目的として以下の方法で検討した。

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、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 2006-2010 年出生（ $n = 437$ 万出生）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てクリーニングされた症例、約 5,000 例（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) コホートの国際比較解析：国際神経芽腫リスクグループ（INRG）データ（約 11,000 例）と比較検討。

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、及びその後の時期と同時期の欧米の神経芽腫の動向とその治療成績との比較検討を行うべく、INRG（国際神経芽腫リスクグループ）から、欧米での神経芽腫のデータベースを用いた。このデータベースは 1990 年以降に治療された北米（Children's Oncology Group）と欧州及び日本の神経芽腫を登録し、リスク分類を行うために作成されたデータベースで、これらのうちスクリーニングを行っていない北米 COG と、1歳でスクリーニングを行っていたドイツの症例を中心に比較検討した。

3) 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マス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 ヶ月マススクリーニングの成績の検討動向

札幌、京都、大阪で行われてきた生後1歳半での尿中VMA,HVAによる神経芽腫スクリーニングの動向を調査し、現時点でのその成果と有効性について検討を加えた。

3. 新規血中、尿中マーカーの検討：神経芽腫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 法で各々定量した。

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

血中の小分子とくにアルブミンなどに結合したカテコラミン類の一斉分析法を開発し、これらを分子量と電荷にて分離するマスマッピングを行い、特徴的な蛋白やペプチドの分析を LC/MS/MS で検討を行った。LC/MS/MS は Micro21 Series と QSTAR[®] XL, ESI-QqTOF/MS (Applied Biosystems) のセット及び Prominence Series

(SHIMADZU) と API3200, ESI or APCI-QqQ/MS (Applied Biosystems) を用い、データ処理は同社の AnalystQS により行った。また Mariner への導入はスプリッターティーにより流量を 1/40 になるよう

調整し測定を行った。特徴的なペプチドである MH ペプチドに対して、予後良好であった症例 (n=42) と、予後不良であった症例 (n=15) の保存血清を用いて検証した。対照は、ほぼ健常と考えられる単径ヘルニアの小児例で同意を得て保存した血清 (n = 18) を用いた。

また、予後不良例の新たなバイオマーカーの探索を目的に、予後が良好であった神経芽腫の初代培養細胞と、予後不良で株化可能であった細胞株の培養液を用いて、LC/MS 解析を行って検討を行い、差分析を行った。LC/MS の LC は、LC 20AD (SHIMADZU) を用い、サンプル量は 5 μ l としてカラムは *L-Column2 ODS*, 1.5 \times 150 mm (化学物質評価研究機構) をもちいた。MS は QqTOF 型 (QSTAR Elite) と LIT/FT 型 (LTQ-Orbitrap XL) を用い、データ処理は全 LC/MS データから全ピークを抽出して、各ピークの比較を行い、t 検定による評価にて $p < 0.05$ のものを特異的ピークとして抽出した。

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クエ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、次世代シークエンサー (Genomic Analyzer、イルミナ社製) にてシークエンス解析を行った。

抽出されたシークエンスで、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) と欠失 (Indel) を検索した。また、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ヶ月での神経芽マスは、イン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ヶ月児神経芽マスの再評価:

1) 休止後の後向きコホート解析:6ヶ月神

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、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、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

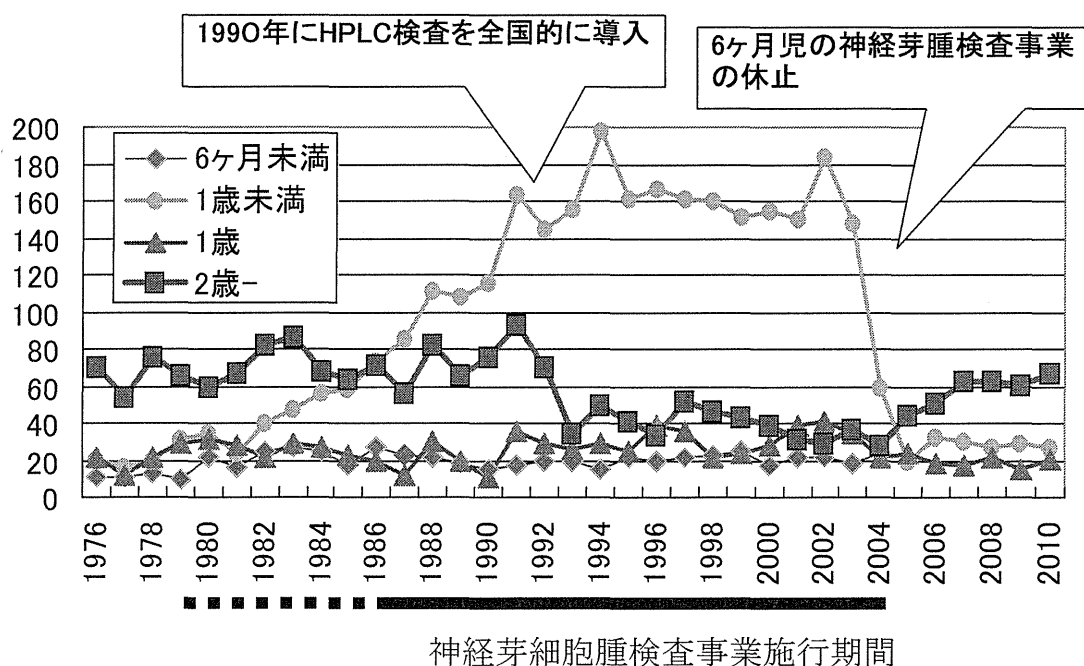


図1: 診断時年齢毎の神経芽腫登録数の年次別変化

神経芽マスによって予後良好な腫瘍が増加し、向であり、この増加分が検査事業にて早期その中に過剰診断例が含まれていたことは 発見していた症例と考えられた。

表1: 本邦およびドイツ、北米での年齢別診断数