

	日本 (1990-94)	日本 (1970-84)	日本 (2006-2009)	ドイツ (1990-1994)	COG (1990-1994)
<6	132	271	76	160	245
6≤ <12	791** (6.0)	199 (0.734)	50 (0.658)	104 (0.65)	170 (0.694)
12≤ <24	106 (0.803)	326 (1.203)	72 (0.947)	111 (0.694)	245 (1.0)
24≤ <60	130 (0.984)	478** (1.764)	163 (2.144)	224 (1.40)	406 (1.657)

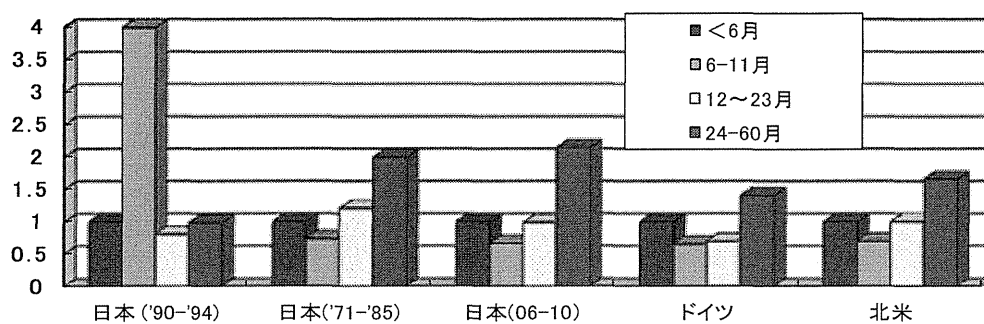


図2：生後6ヶ月未満症例を1とした時の各年代別発症比率

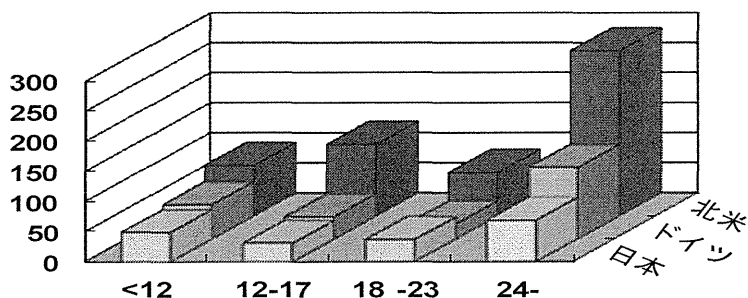


図3：日本と北米症例の MYCN 遺伝子増幅症例数の診断時年齢別分布

2) コホートの国際比較解析：

次に、検査事業の施行時期の本邦の症例数の割合を、1980年以前の症例および休止後2年以上経過した2006年以降の症例とともに、ドイツ、北米(COG)のほぼ同時期のコホートとで比較検討を行なった(表1)。ドイツを除いて6ヶ月までの臨床発見例は、スクリーニングによる介入がないことから、6ヶ月以前の症例を対象としてその比較を行なった(図2)。その結果は前年度の結果と同様で、生後6-11ヶ月診断例は、本邦で神経芽腫が施行されていた時期には約5-6倍に増加していたが、一方で2歳以上の症例は有意に減少し、ほぼ1/2になっていた。このことから、6ヶ月の神経芽腫では、予後良好な神経芽腫を約5-6倍の頻度で過剰診断していたが、一方で年長児の神経芽腫が減少する結果となり、これらが、以前の前向きコホート研究で報告された死亡率の低下のデータを一致する結果となっていた。

さらに、予後不良腫瘍の典型例である *MYCN* 遺伝子増幅症例の診断時年齢別の分布を *MYCN* 増幅症例には過剰診断例はないとすると、ほぼ同様の分布をするはずであるが、明らかに本邦の2歳以降の *MYCN* 増幅例の絶対数が少ないことが明らかとなった(図3)。これは *MYCN* 増幅例が6ヶ月マスで早期に発見されたことが一因と考えることも可能で、実際12-17ヶ月の *MYCN* 増幅例が本邦で北米に比べ少ないことはこれで説明可能である。しかし、2歳以降の症例の減少は早期発見効果だけでは説明困難であった。この時期に、生後1年でスクリーニングを施行したドイツはちょうど日本と北米の中間のデータを示した。

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：

発症年齢別のマス施行中と施行後のコホ

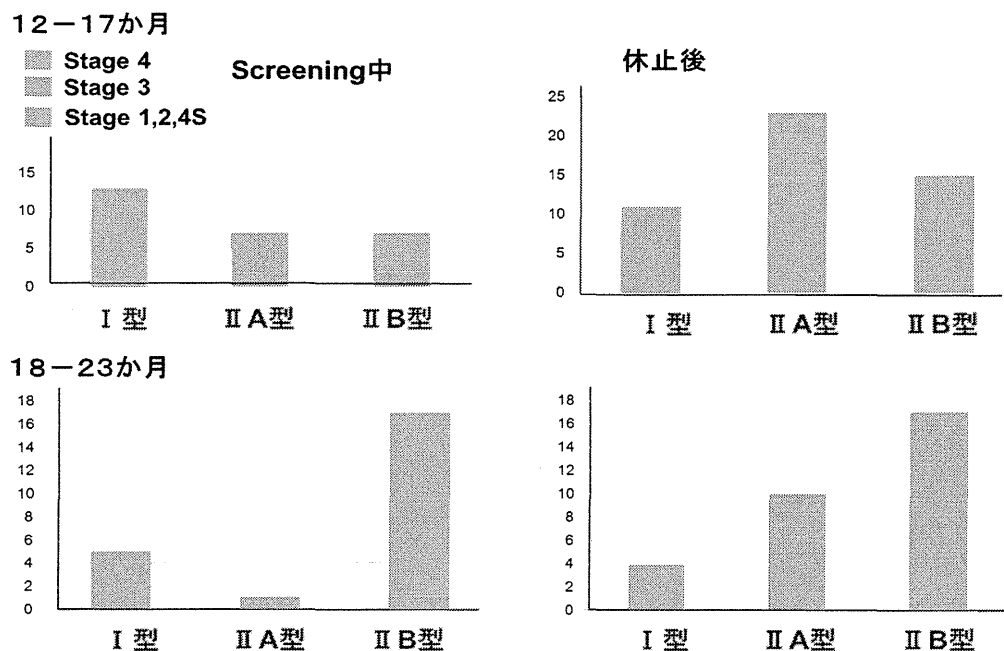


図4：スクリーニング中と休止後の1歳代の神経芽腫の分布

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、悪性度を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に進行

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

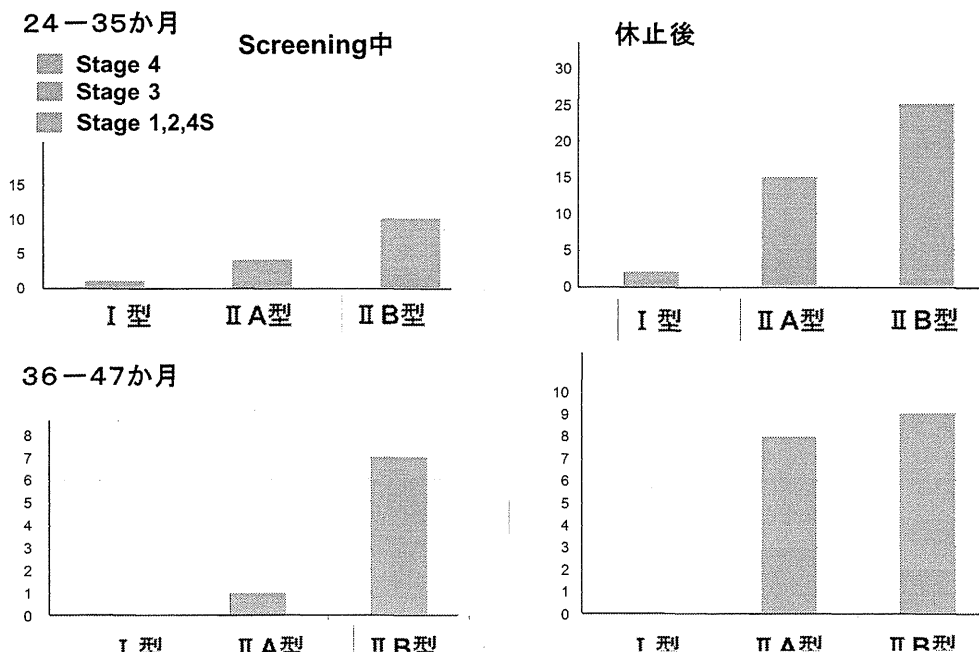


図5：スクリーニング中と休止後の2歳代以降の神経芽腫の分布

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4、図5)。

2. 18ヶ月の神経芽マスについて

平成15年以降、施行時期(生後18ヶ月)を変更し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。

月神経芽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

に発症例が1例報告されただけである。。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継続して必要と考えられた。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102例の保存血清中の遊離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。

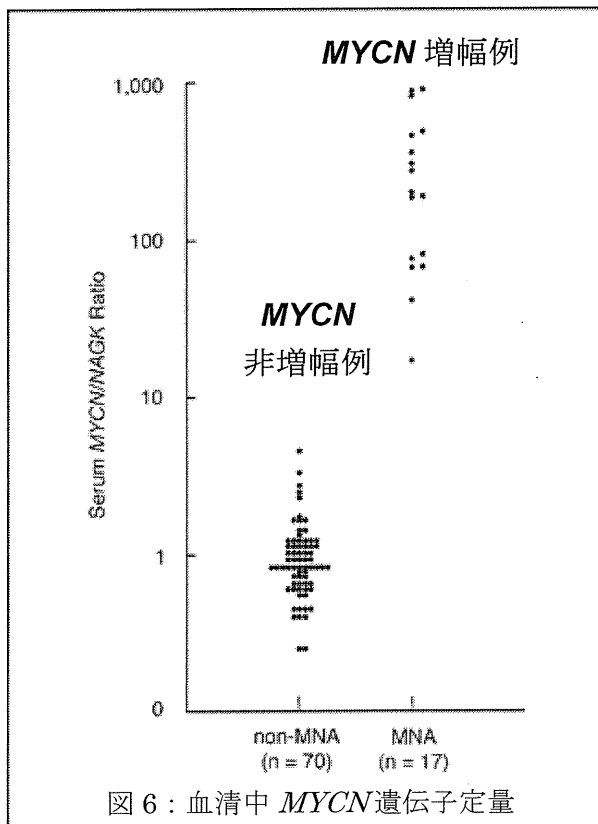


図6：血清中MYCN遺伝子定量

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(図6)。

2) 血清遊離DNAを用いた1p, 11q LOH検索(図7)

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

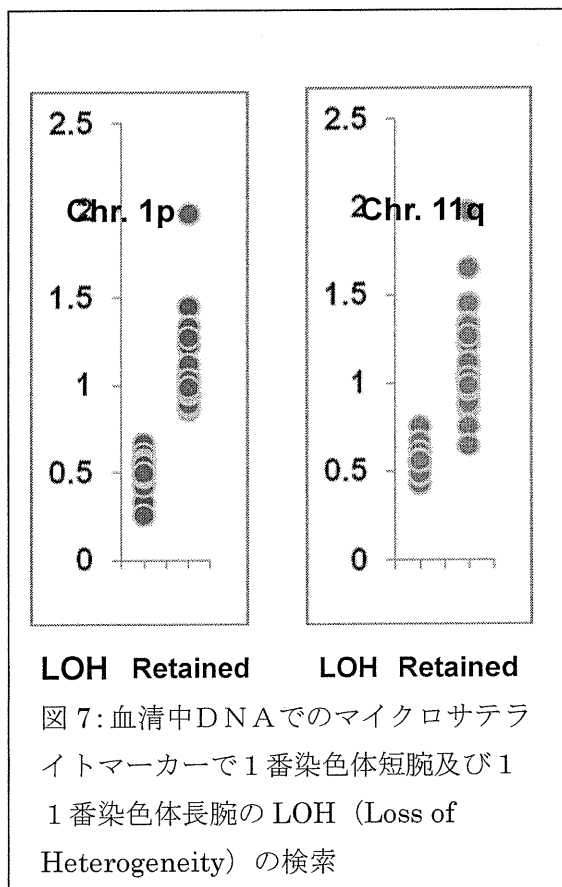


図7：血清中DNAでのマイクロサテライトマーカーで1番染色体短腕及び11番染色体長腕のLOH(Loss of Heterogeneity)の検索

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。

2) LC/MS による神経芽腫バイオマーカーの探索

血清中低分子の一斉分析法を用い、患者血清の分析及びその解析を行った。今回用いた検体は全部で 28 検体、広島及び京都で保存されていた血清検体であり病期および予後等の情報が明らかになっているものである。またコントロール試料としては、健常小児および単径ヘルニアの同年代患者の血清を用いた。LC においては比較的早い時間（極性の高い物質が溶出する領域）に大きなピークが 2 つ、遅い時間（極性の低い物質が溶出する領域）に小さなピークが数多く検出された。ほとんどのピークにおいてピークの幅が比較的広いことから 1 つのピークの中にいくつかの物質が含まれていると考えられた。MS 分析結果よりどのような物質が検出されているか抽出してみたところ、約 250 種の物質を抽出された。これらの物質の変化・物質のパターンにより、予後や悪性度分類ができないかと考え、3次元のグラフ化を行った。コントロール血清と予後良好例の結果を比較すると、ほぼ似た形状をしていた。一方、INSS 4 期を比較してみると、溶出が遅い物質に関しても、大きくパターンが異なっていたが、三次元解析のみで病期やタイプの判別は困難である症例もあった。

そこで MS 専用の統計解析ソフト

(MakerView) を用いて解析を行った。本邦分類 I 期とコントロール血清間で t 検定を行った結果をいくつかの神経芽腫の検体において検出されていないもののコントロールでは全く検出されておらず、これらの物質が神経芽腫のマーカーになりうると考えられた。また、INSS 4 期と 1 期の t 検定

の結果においては 15 の物質において有意な差が見られた。その中、INSS1 期では全く検出されず、INSS4 期でカウントが高い物質など、予後不良例の特異的な物質の探索からペプチドMHと名付けた物質を見出

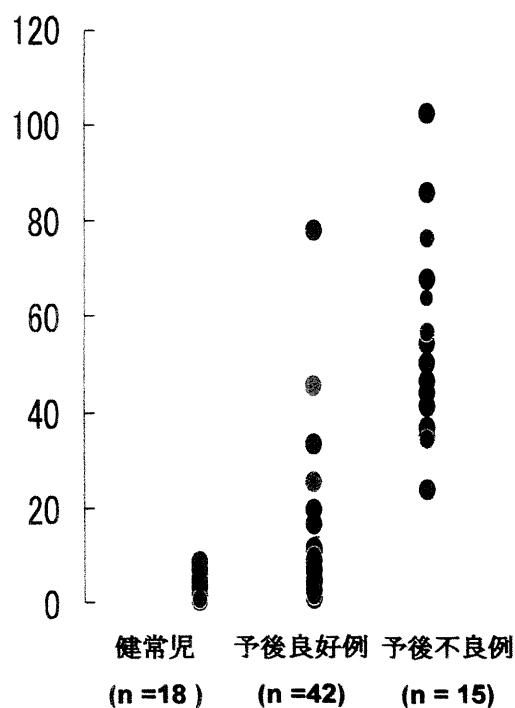


図 8 : ペプチドMHの神経芽腫及び健常児の血清濃度

した。このペプチドに対するポリクローナル抗体を作製し、神経芽腫患者および対照児の保存血清を用いて定量した(図8)。検体数が十分ではないが、有意に予後不良例で血清中濃度が高値であり、有用な層別マーカーと考えられた。

次に、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、差分解析を行った。p < 0.05 のものを特異的ピークとして抽出した

各群の分布を検討した。これら、単独では予後良好例と不良例を層別することは完全にはできなかったが、この 2 つのマーカを用いることで、ほぼ完全に層別することが可能であった (図 10)

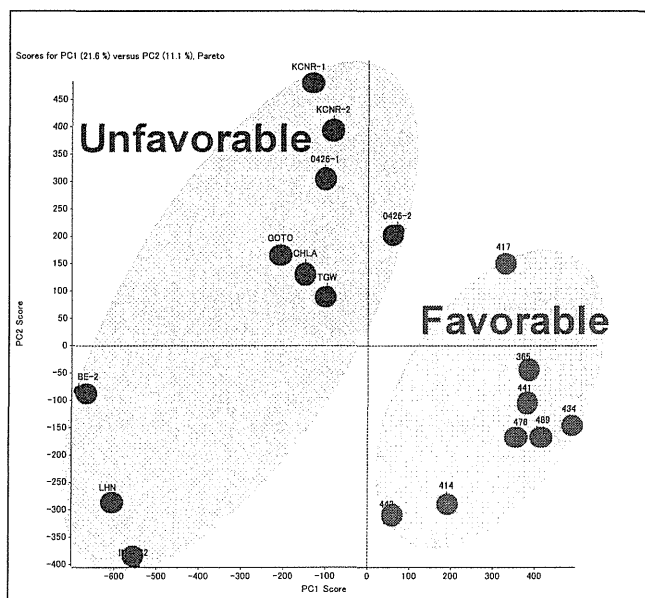


図 9 神経芽腫初代培養細胞および細胞株の培養上清の LC-MS 解析結果

ところ、予後良好群で約 700 ピーク、予後不良群で約 200 ピークが抽出された。これらの発現強度からクラスター分析を行うと、予後良好群と予後不良な 2 群の 3 群に分別された (図 9)。これらのペプチドや分子の同定を行い、パスウェイ解析を行った。予後良好群で GABA と Taurin が増加し、一方、予後不良群で Glutation、Glutamate および Cysteine が増加していた。以上から、Glutamate decarboxylase 活性が生物学的特性と関連していることが示唆された。

そこで、血清中の PeptideMH の濃度と培養上清から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。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。

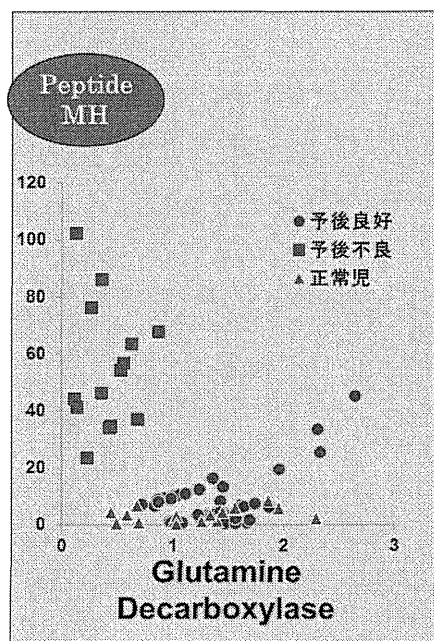


図 10 : 正常児および診断時血清中の Peptide MH および Glutamine Decarboxylase 値と生物学的特性

4. 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 11)。

そこで、Sporadic な神経芽腫 212 例とともに健常人 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。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 tctagctgt ...
Variant ...gctggaacCt cattgtctgg tctagctgt ...

図 11 : 多発例 10 腫瘍共通のミスセンス変異

D. 考察

2003年まで過去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が必要である。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その恩恵をうけなくなった児が2歳に達する時期と一致した2年経過した頃から増加し、小児人口の減少を鑑みると、ほぼ休止前と同様の発症年齢分布となり、また、欧米とも同様の分布となったことから、6ヶ月の神経芽腫検査事業の本腫瘍における早期診断例の存在は再確認された。

さらに、欧米のデータとの比較でも、6ヶ月の神経芽マスで明らかに1歳未満症例が数倍に増加した一方で、2歳以上の進行例が減少していた。特に、MYCN増幅例が明

らかに減少していることから、乳児期にはかなりの数の神経芽腫が発症し、その多くが退縮分化するが、一方で、これらを母地に悪性度の高い腫瘍が発生していることが明らかになった。

そこで、これらの後向き研究の成果を基に、施行された生後18ヶ月の前向き研究グループ成果では、現時点で26症例が発見され、約7,000出生に対して1の割合でほぼ自然発症と同等であり、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NM23H1値の測定などを行ってきた。また、本研究ではLC/MS/MSによる網羅的分子追跡法（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。引き続き、直接神経芽腫細胞の培養細胞上清から検索したところ、Glutamate Decarboxylateが有用なマーカーになる可能性が示唆された。そこで、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。本層別法は治療が必要な腫瘍に特異的な腫瘍マーカーは、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応用可能なマーカーとなると考えている。

また、本研究は、神経芽腫発症への易罹患性に関わるゲノム異常を見出すために、多発例のエクソーム解析を行った。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するミスセンス変異について、健常人、通常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詳細な検討までは至っていないが、今回見出したミスセンス変異は大多数の神経芽腫例に見出されている

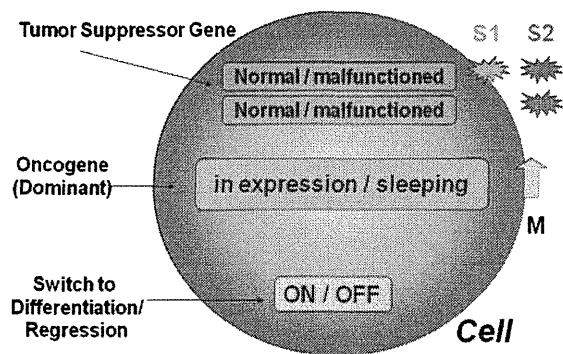


図 12：神経芽腫発症パターンから推測される神経芽腫発症関連因子（Pediatric Surgery International 2010 より引用）

点は極めて興味深い。従来、神経芽腫事業中の神経芽腫の発症数の値から推定した変異として、がん遺伝子、がん抑制遺伝子とさらに神経分化誘導制御因子の3つの因子の関与が推定された(図12)が、この変異はその最後の神経分化誘導制御因子である可能性が示唆された。

また、この遺伝子変異の検索が将来、神経芽腫の易罹患性因子としてスクリーニングにも応用買おうと考えられ、ゲノムスクリーニングの母子保健の中で行われる時代も来ると考えられる。

E. 結論

6ヶ月施行神経芽腫事業の前後の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、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

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、この18ヶ月の神経芽腫スクリーニングの前向き研究などを評価して早急に対応を行うべきである。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiyama, K., Hiyama, E., Danijoh, I. Public database useful for molecular diagnosis, in *Clinical Application of Molecular Diagnosis* edited by Hiyama, K., Hiyama, E. 1 edition, Vol. 1, p. 21-34. Kerala: Transworld Research Network, 2010.
- 2) Kato Y, Murakami Y, Uemura K, et al. Impact of intratumoral thymidylate synthase expression on prognosis after surgical resection for ampullary carcinoma. *J Surg Oncol*, in press
- 3) Nagatani S, Sudo T, Murakami Y, Uemura K, Hiyama E, Sueda T. Edaravone, a free radical scavenger, promotes engraftment of intraportally transplanted islet cells. *Pancreas*. 2011; 40:126-30.
- 4) Arai, Y., Honda, S., Haruta, M., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ohshima, J., Sasaki, F., Nakagawara, A., Horie, H., Yamaoka, H., Hiyama, E., Kaneko, Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010; 49: 596-609.
- 5) Hiyama, E., Hiyama, K. Diagnostic and prognostic molecular markers in neuroblastoma, in *Clinical Application of Molecular Diagnosis* edited by Hiyama, K., Hiyama, E. 1 edition, Vol. 1, p. 21-34. Kerala: Transworld Research Network, 2010.
- 6) Kamimatsuse A, Onitake Y, Kamei N, Tajima G, Sakura N, Sueda T, Hiyama E. Surgical intervention for patent ductus venosus. *Pediatr Surg Int*. 2010;26:1025-30
- 7) Arifin, M., Tanimoto, K., Putra, A. C., Hiyama, E., Nishiyama, M., Hiyama, K. Carcinogenesis and cellular immortalization without persistent inactivation of p16/Rb pathway in lung cancer. *Int J Oncol*, 2010; 36: 1217-1227.
- 8) Ohtaki, M., Otani, K., Hiyama, K., Kamei, N., Satoh, K., Hiyama, E. A robust method for estimating gene expression states using Affymetrix microarray probe level data. *BMC Bioinformatics*, 2010; 11: 183.
- 9) Shalaby, T., Hiyama, E., Grotzer, M. A. Telomere Maintenance as Therapeutic Target in Embryonal Tumours. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010;10:196-212.
- 10) Ueda Y, Hiyama E, Kamimatsuse A, Kamei N, Ogura K and Sueda T: Wnt signaling and telomerase activation of hepatoblastoma: correlation with chemosensitivity and surgical resectability. *J Pediatr Surg* 46: 2221-2227, 2011.
- 11) Herlambang B, Orihashi K, Mizukami T, Takahashi S, Uchida N, Hiyama E and Sueda T: New method for absolute spinal cord ischemia

- protection in rabbits. *J Vasc Surg* 54: 1109-1116, 2011.
- 12) Kanda A, Sotomaru Y, Shiozawa S and Hiyama E: Establishment of ES Cells from Inbred Strain Mice by Dual Inhibition (2i). *J Reprod Dev*, 2011.
- 13) Yamaoka E, Hiyama E, Sotomaru Y, Onitake Y, Fukuba I, Sudo T, Sueda T and Hiyama K: Neoplastic transformation by TERT in FGF-2-expanded human mesenchymal stem cells. *Int J Oncol* 39: 5-11, 2011.
- 14) Kojima K, Hiyama E, Otani K, Ohtaki M, Fukuba I, Fukuda E, Sueda T and Hiyama K: Telomerase activation without shortening of telomeric 3'-overhang is a poor prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Sci* 102: 330-335, 2011.
- 15) Kato Y, Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Hiyama E and Sueda T: Impact of intratumoral thymidylate synthase expression on prognosis after surgical resection for ampullary carcinoma. *J Surg Oncol* 103: 663-668, 2011.
- 16) Hishiki T, Matsunaga T, Sasaki F, Yano M, Ida K, Horie H, Kondo S, Watanabe KI, Oue T, Tajiri T, Kamimatsuse A, Ohnuma N and Hiyama E: Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT. *Pediatr Surg Int* 27: 1-8, 2011.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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. Molecular diagnosis in neuroblastoma. 6th Congress of the SIOP Asia. Kish Island, Iran. March 3-5, 2010.
- 2) Hiyama E, Kamei N, Kamimatsuse A, Hiyama K, Hirai Y, Masujima T. Omics analysis and evolution for identification of candidate genes in progression of neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research (ANR) 2010*. Stockholm, Sweden. June 21-24, 2010.
- 3) Hiyama E, Kamimatsuse A, Kamei N, Masujima T, Hiyama K, Ohtaki M. Screening at 18 months of age using the new serum marker for reducing the mortality of neuroblastoma: Simulation using Japanese population based cohort study. *Advances in Neuroblastoma Research (ANR) 2010*. Stockholm, Sweden. June 21-24, 2010.
- 4) 檜山英三 (司会). 神経芽腫スクリーニングの正しい評価と今後. 第18回日本がん検診・診断学会. 東京都. 2010年7月16-17日.
- 5) 檜山英三 (座長). 神経芽腫マスキングの有効性と問題点. 第18回日本がん検診・診断学会. 東京都. 2010年7月16-17日.
- 6) 上松瀬新, 亀井尚美, 檜山英三. 神経芽腫マスキングの再評価と今後の方向性. 第18回日本がん検診・診断学会. 東京都. 2010年7月16-17日.
- 7) Hiyama E, Kamei N, Kamimatsuse A, Hirai Y, Hiyama K, Masujima T. Identification of New Candidate Genes in Progression of Neuroblastoma Using Omics Analysis. SIOP2010. Boston, USA. October 21-24, 2010.
- 8) Tanimoto K, Eguchi H, Wada S, Nakamura H, Poellinger I, Hiyama E, Nishiyama M. Molecular mechanisms of regulation of the pVHL by oncogenic UBE2S/E2-EPF. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会. 神戸市. 2010年12月7-10日.
- 9) 亀井尚美, 檜山英三, 上田祐華, 上松瀬新, 末田泰二郎, 檜山桂子. 神経芽腫における ALK 遺伝子活性型変異および増幅症例の検討. 第26回日本小児がん学会学術集会. 大阪市. 2010年12月17-19日.
- 10) Naomi Kamei, Eiso Hiyama, Arata Kamimatsuse, Yuka Ueda, Kaoru Ogura, Taijiro Sueda. Clinical feature of ALK mutated neuroblastoma. 44th Annual Meeting

- of Pacific Association of Paediatric Surgeons (PAPS). Cancun, Mexico. April 13, 2011.
- 11) 檜山英三, 小倉薫, 上松瀬新, 亀井尚美. 小児がんへ有効な施策提言のための資料収集とアウトカム指標の抽出. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会. 群馬県前橋市. 2011年11月27日.
 - 12) 林陽子, 田川浩美, 森原なぎさ, 平野尚子, 檜山英三. 神経芽腫におけるがん幹細胞分離の試み. 第34回日本分子生物学会年会. 横浜市. 2011年12月2日.
 - 13) 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.
 - 14) 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. 2013年5月11日.
 - 15) 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.
 - 16) Hiyama E, Kamimatsuse A, Ogura K, Ueda Y, Hiyama K. Next-generation sequencing: Integrated exome analysis in human multiple neuroblastoma. ANR2012. Tronto. June 19, 2012.
 - 17) Hiyama E, Kamimatsuse A, Ueda Y, Ogura K, Sueda T, Hiyama K. Identification of new candidate biomarkers in progression of neuroblastoma cells using differential transcriptome and proteome analysis. ANR2012. Tronto. June 20, 2012.
 - 18) Yoneda A, Tajiri T, Hishiki T, Maeda K, Iehara T, Hiyama E. Changes in clinical feature of neuroblastoma after the cessation of the mass screening in Japan -Analysis of the Neuroblastoma registry data of the Tumor committee of the Japanese Society of Pediatric Surgeons-. ANR2012. Tronto. June 20, 2012.
 - 19) Kawashima M, Hiyama E, Kamei N, Kamimatsuse A, Ueda Y, Ogura K, Hiyama K. ALK activating infant neuroblastoma cases including mass-screening detected cases. SIOP2012. London. October 6, 2012.
 - 20) 米田光宏, 田尻達郎, 菱木知郎, 近藤知史, 杉山正彦, 水田耕一, 亀井尚美, 木下義晶, 平山裕, 脇坂宗親, 佐々木文章, 本多昌平, 佐藤智行, 塚田真実, 仲谷健吾, 大植孝治, 上松瀬新, 家原知子, 檜山英三, 前田貢作. マスクリーニング休止による本邦神経芽腫像の変化—小児外科学会悪性腫瘍登録データの解析より—. 第54回日本小児血液がん学会学術集会. 横浜市. 2012年11月30日.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許出願 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

（総合）研究報告書

母子コホート研究による成育疾患等の病態解明に関する研究

分担研究項目：SGA の免疫学的機序に基づく病型分類と、
アレルギー疾患の発症に関わる胎内因子の検索

分担研究者：松本 健治 （独）国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部
免疫アレルギー研究部 部長

研究協力者：本村健一郎 （独）国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部
医師 共同研究員

森田 英明 （独）国立成育医療研究センター 研究所 免疫アレルギー研究部
医師 共同研究員

小川 倫史 千葉愛友会記念病院 小児科 医師

研究要旨：近年、small-for-gestational-age (SGA)一部に、胎盤に対する母胎の免疫学的な反応の異常が原因と考えられる症例が存在する事が報告され注目されている。また、アレルギー疾患の発症は遺伝的要因と環境要因が複雑に相互作用して制御されていると考えられているが、乳幼児期早期に発症するアレルギー疾患児の子宮内環境や子宮内感作に関しては不明な点が多く残されている。以上から、本研究では①SGA の発症要因を解明するために網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、母胎免側の遺伝子発現 profile では SGA 症例は特異な遺伝子発現パターンを示さなかったが、胎児面側の組織における遺伝子発現 profile は SGA と AGA で大きく異なり、その上 SGA 症例は3つの群に分かれる事が明らかとなった。②子宮内環境が子宮内感作や乳幼児期早期のアレルギー疾患発症に与える影響については、対象児がまだアレルギー疾患の好発年齢に達していない事から、解析を行っていない。

A. 研究目的

small-for-gestational-age (SGA)には明らかな基礎疾患や栄養障害などに起因する症例と、原因不明な症例が存在する。近年、原因不明のSGAの一部に、胎盤に対する母胎の免疫学的な反応の異常が原因と考えられる症例が存在する事が報告され注目されている。しかし、現時点で多くのSGAの発症病理については不明な点が多く残されている。本研究では実際にSGA症例の胎盤の網羅的な遺伝子発現解析を行い、appropriate-for-gestational-age (AGA)と比較して、

どの程度の頻度でどのような変化が生じているのかを検討する。

また、アレルギー疾患の発症は遺伝的要因と環境要因が複雑に相互作用して制御されていると考えられているが、乳幼児期早期に発症するアレルギー疾患児の子宮内環境や子宮内感作に関しては不明な点が多く残されている。

以上から、本研究では①SGAの胎盤における遺伝子発現パターンの解析を行う。

②子宮内環境が子宮内感作や乳幼児期早期のアレルギー疾患発症に与える影響について検

討する。

B. 方法

①i)胎盤からの質の良い Total RNA を採取するため、分娩後可及的速やかに胎盤から組織を切りだし、液体窒素にて凍結保存した。ii)ISOGEN を用いて SGA 症例および正常産の胎盤から total RNA を抽出し、Agilent human Gene Expression microarray による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

②妊娠中の各種要因、特に食事やつわり、不正出血などの因子と臍帯血の好酸球数、児のアレルギー疾患の発症の相関について疫学的に検討する。

(倫理的配慮)

本試験は、ヘルシンキ宣言 (1964 年) およびその改訂版に基づく倫理的原則、改訂 GCP (2003 年改訂) および「疫学研究に関する倫理指針(2007 年 8 月 16 日厚生労働省告示、2007 年 11 月 1 日施行)」等の関連法規を遵守して実施した。

1. 倫理審査: 臨床検体を用いる研究計画および臨床研究について、国立成育医療研究センターおよび千葉愛友会記念病院の倫理審査委員会による承認を得ている。

2. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人の個人情報の保護: 臨床検体を用いる研究においては、試料は個人情報管理者により連結可能匿名化されたのちに国立成育医療研究センター研究所に搬送され、実験に供される。個人識別情報は個人情報管理者により試料等採取機関にて管理され、研究実施機関には個人情報の伝達は行われない。

3. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益: 検体の採取の方法および研

究の目的と内容について十分に説明する。研究計画は、対象患者の治療にとって直接利益をもたらすものではないこと、協力しないことによって何らの不利益も生じないことを説明する。

4. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法: 本研究の目的及び医学的貢献について対象患者あるいは代諾者に十分に説明した上で、各研究協力施設における倫理規定に合わせて検体採取の同意を得る。

国立成育医療研究センターにて承認された倫理申請

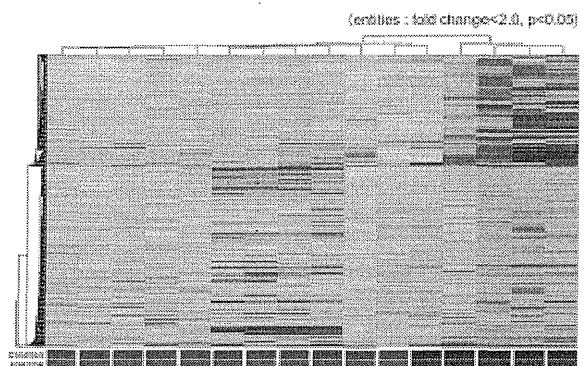
「アレルギー発症機序の解明に向けたアレルギー出生コホート研究と免疫ヒト化マウス作製 (受付番号 398)」

「多層的疾患オミックス解析による創薬標的の網羅的解析 (受付番号 476)」

C. 結果

①SGA および AGA の胎盤を採取して total RNA を抽出し、microarray によって遺伝子の網羅的な発現 profile を比較検討した。まず、SGA 群 (5 例) と AGA 群 (11 例) の平均を比較して 2 倍以上の差が認められ、かつ $p < 0.05$ となる遺伝子群を抽出し、クラスタリング解析を行った。その結果、母胎免側の遺伝子発現 profile

Fig. 1 母体面側の遺伝子発現パターン

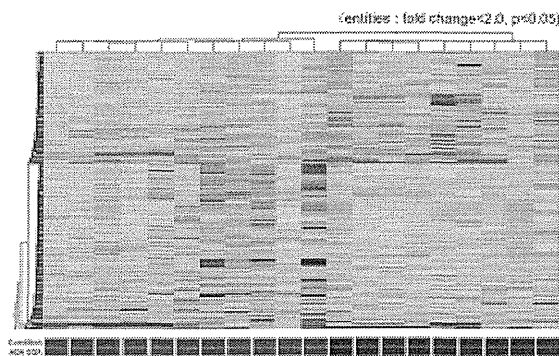


赤が AGA 症例、青が SGA 症例

は SGA と AGA の間で重複する部分もあり、また、SGA 症例の遺伝子発現パターンはほぼ単一であった。

一方、胎児面側の組織における遺伝子発現 profile は SGA 群 (9 例) と AGA 群 (11 例) で大きく異なり、その上 SGA 症例は 2 つの群に分かれる事が明らかとなった。

Fig. 2 胎児面側の遺伝子発現パターン



赤が AGA 症例、青が SGA 症例

②出生コホート研究に関しては、児がまだアレルギー疾患の好発年齢に達していない事から、解析を行う事が出来ない。

D. 考察

SGA は母胎面側 (脱落膜や絨毛) や、胎児側の組織の遺伝子発現に影響を与えるような異常によって起こる可能性が高い事が明らかとなった。また、胎盤の遺伝子発現パターンからは、SGA は複数の要因によって発症する症候である事が明らかとなった。今後は症例の臨床情報を精査して、病歴別の SGA 関連遺伝子群を検索することにより、原因不明の SGA の病型分類が出来る可能性があると考えられる。

E. 結論

胎盤の網羅的な遺伝子発現解析は SGA の原因究明の方法として有用であり、今後病態の発

現に関連する遺伝子群が同定される事が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Activation of human synovial mast cells from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients in response to aggregated IgG through FcεRI and FcγRII. Lee H, Kashiwakura J, Matsuda A, Watanabe Y, Sakamoto-Sasaki T, **Matsumoto K**, Hashimoto N, Saito S, Ohmori K, Nagaoka M, Tokuhashi Y, Ra C, Okayama Y. *Arthritis Rheum.* 65: 109-19, 2013.
2. Interleukin-33 in allergy. Ohno T, Morita H, Arae K, **Matsumoto K**, Nakae S. *Allergy.* 67: 1203-14, 2012.
3. Antigen-specific T-cell responses in patients with non-IgE-mediated gastrointestinal food allergy are predominantly skewed to TH2. Morita H, Nomura I, Orihara K, Yoshida K, Akasawa A, Tachimoto H, Ohtsuka Y, Namai Y, Futamura M, Shoda T, Matsuda A, Kamemura N, Kido H, Takahashi T, Ohya Y, Saito S, **Matsumoto K**. *J Allergy Clin Immunol* 2012 in Press.
4. Epithelial cell-derived IL-25, but not Th17 cell-derived IL-17 or IL-17F, is crucial for murine asthma. Suzukawa M, Morita H, Nambu A, Arae K, Shimura E, Shibui A, Yamaguchi S, Suzukawa K, Nakanishi W, Oboki K, Kajiwara N, Ohno T, Ishii A, Korner H, Cua DJ, Suto H, Yoshimoto T, Iwakura Y, Yamasoba T, Ohta K, Sudo K, Saito H, Okumura K, Broide DH, **Matsumoto K**, Nakae S. *J Immunol.* 189: 3641-3652, 2012.
5. Omalizumab inhibits acceleration of FcεpsilonRI-mediated responsiveness of

- immature human mast cells by immunoglobulin E. Okayama Y, Kashiwakura J, Sasaki-Sakamoto T, **Matsumoto K**, Hashimoto N, Ohmori K, Kawakami T, Saito H, Ra C. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 108: 188-194 e182, 2012.
6. Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies: distinct differences in clinical phenotype between Western countries and Japan. Nomura I, Morita H, Ohya Y, Saito H, **Matsumoto K**. *Curr Allergy Asthma Rep.* 12: 297-303, 2012.
 7. ST2 requires Th2-, but not Th17-, type airway inflammation in epicutaneously antigen-sensitized mice. Morita H, Arae K, Ohno T, Kajiwara N, Oboki K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, **Matsumoto K**, Nakae S. *Allergol Int.* 61:265-73, 2012.
 8. Anti-inflammatory effects of high-dose IgG on TNF-alpha-activated human coronary artery endothelial cells. Matsuda A, Morita H, Unno H, Saito H, **Matsumoto K**, Hirao Y, Munechika K, Abe J. *Eur J Immunol.* 42: 2121-31, 2012.
 9. Salivary cortisol response to stress in young children with atopic dermatitis. Kojima R, Matsuda A, Nomura I, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, **Matsumoto K**. *Pediatr Dermatol.* 30: 17-22, 2013.
 10. Factors associated with steroid phobia in caregivers of children with atopic dermatitis. Kojima R, Fujiwara T, Matsuda A, Narita M, Matsubara O, Nonoyama S, Ohya Y, Saito H, **Matsumoto K**. *Pediatr Dermatol.* 30: 29-35, 2012.
 11. Histamine-releasing factor has a proinflammatory role in mouse models of asthma and allergy. Kashiwakura JC, Ando T, **Matsumoto K**, Kimura M, Kitaura J, Matho MH, Zajonc DM, Ozeki T, Ra C, MacDonald SM, Siraganian RP, Broide DH, Kawakami Y, Kawakami T. *J Clin Invest.* 122: 218-228, 2012.
 12. The role of Staphylococcal enterotoxin in atopic keratoconjunctivitis and corneal ulceration. Fujishima H, Okada N, Dogru M, Baba F, Tomita M, Abe J, **Matsumoto K**, Saito H. *Allergy.* 67: 799-803, 2012.
 13. Effects of diesel exhaust particles on primary cultured healthy human conjunctival epithelium. Fujishima H, Satake Y, Okada N, Kawashima S, **Matsumoto K**, Saito H. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 110: 39-43, 2013
 14. The association between oxytocin and social capital. Fujiwara T, Kubzansky LD, **Matsumoto K**, Kawachi I. *PLoS One.* 7:e52018, 2012.
 15. Role of Interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, **Matsumoto K**, Saito H. *Allergology Int* 2013 In Press.
 16. Pretreatment with low-levels of FceRI-crosslinking stimulation enhances basophil mediator release. Koketsu R, Yamaguchi M, Suzukawa M, Arai H, Nagase H, **Matsumoto K**, Saito H, Ra C, Yamamoto K, Ohta K. *Int Arch Allergy Immunol* 2013 In Press.
 17. Eosinophilic gastrointestinal disorders in infants: a Japanese case series. Yamada Y, Nishi A, Ebara Y, Kato M, Yamamoto H, Morita H, Nomura I, Matsumoto K, Hirato J, Hatakeyama SI, Suzuki N, Hayashi Y. *Int Arch Allergy Immunol.* 155 Suppl 1: 40-45, 2011
 18. Paracrine IL-33 stimulation enhances lipopolysaccharide-mediated macrophage activation. Ohno T, Oboki K, Morita H, Kajiwara N, Arae K, Tanaka S, Ikeda M, Iikura

- M, Akiyama T, Inoue J, Matsumoto K, Sudo K, Azuma M, Okumura K, Kamradt T, Saito H, Nakae S. *PLoS ONE*. 6: e18404, 2011
19. IL-33 and airway inflammation. Oboki K, Nakae S, Matsumoto K, Saito H. *Allergy Asthma Immunol Res*. 3: 81-88, 2011
 20. Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. Nomura I, Morita H, Hosokawa S, Hoshina H, Fukuie T, Watanabe M, Ohtsuka Y, Shoda T, Terada A, Takamasu T, Arai K, Ito Y, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. *J Allergy Clin Immunol*. 127: 685-688 e681-688, 2011
 21. Genome-wide association study identifies HLA-DP as a susceptibility gene for pediatric asthma in Asian populations. Noguchi E, Sakamoto H, Hirota T, Ochiai K, Imoto Y, Sakashita M, Kurosaka F, Akasawa A, Yoshihara S, Kanno N, Yamada Y, Shimojo N, Kohno Y, Suzuki Y, Kang MJ, Kwon JW, Hong SJ, Inoue K, Goto Y, Yamashita F, Asada T, Hirose H, Saito I, Fujieda S, Hizawa N, Sakamoto T, Masuko H, Nakamura Y, Nomura I, Tamari M, Arinami T, Yoshida T, Saito H, Matsumoto K. *PLoS Genet*. 7: e1002170, 2011
 22. Human eosinophils produce and release a novel chemokine, CCL23, in vitro. Matsumoto K, Fukuda S, Hashimoto N, Saito H. *Int Arch Allergy Immunol*. 155 Suppl 1: 34-39, 2011
 23. Peripheral blood mononuclear cells from patients with bronchial asthma show impaired innate immune responses to rhinovirus in vitro. Iikura K, Katsunuma T, Saika S, Saito S, Ichinohe S, Ida H, Saito H, Matsumoto K. *Int Arch Allergy Immunol*. 155 Suppl 1: 27-33, 2011
 24. Analysis of cell characterization using cell surface markers in the dermis. Hasebe Y, Hasegawa S, Hashimoto N, Toyoda M, Matsumoto K, Umezawa A, Yagami A, Matsunaga K, Mizutani H, Nakata S, Akamatsu H. *J Dermatol Sci*. 62: 98-106, 2011
 25. Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. Harada M, Hirota T, Jodo AI, Hitomi Y, Sakashita M, Tsunoda T, Miyagawa T, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Masuko H, Sakamoto T, Hizawa N, Suzuki Y, Yoshihara S, Adachi M, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakajima T, Mathias RA, Rafaels N, Barnes KC, Himes BE, Duan QL, Tantisira KG, Weiss ST, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 44: 787-793, 2011
 26. Effect of Th1/Th2 cytokine pretreatment on RSV-induced gene expression in airway epithelial cells. Yamada Y, Matsumoto K, Hashimoto N, Saikusa M, Homma T, Yoshihara S, Saito H. *Int Arch Allergy Immunol*. 154: 185-194, 2010
 27. IL-33 mediates inflammatory responses in human lung tissue cells. Yagami A, Orihara K, Morita H, Futamura K, Hashimoto N, Matsumoto K, Saito H, Matsuda A. *J Immunol*. 185: 5743-5750, 2010
 28. Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis. Watanabe K, Penfold ME, Matsuda A, Ohyanagi N, Kaneko K, Miyabe Y, Matsumoto K, Schall TJ, Miyasaka N, Nanki T. *Arthritis Rheum*. 62: 3211-3220, 2010
 29. IQGAP1 and vimentin are key regulator genes in naturally occurring hepatotumorigenesis

- induced by oxidative stress. Tsubota A, Matsumoto K, Mogushi K, Nariai K, Namiki Y, Hoshina S, Hano H, Tanaka H, Saito H, Tada N. *Carcinogenesis*. 31: 504-511, 2010
30. Defining cell identity by comprehensive gene expression profiling. Toyoda M, Hamatani T, Okada H, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. *Curr Med Chem*. 17: 3245-3252, 2010
31. Overexpression of LEDGF/DFS70 induces IL-6 via p38 activation in HaCaT cells, similar to that seen in the psoriatic condition. Takeichi T, Sugiura K, Muro Y, Matsumoto K, Ogawa Y, Futamura K, Kaminuma O, Hashimoto N, Shimoyama Y, Saito H, Tomita Y. *J Invest Dermatol*. 130: 2760-2767, 2010
32. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 18581-18586, 2010
33. Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits. Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, Matsumoto K, Saito H, Tsuji K, Sekiya I. *Arthritis Res Ther*. 12: R206, 2010
34. Analysis of signal transduction pathways involved in anti-CD30 mAb-induced human eosinophil apoptosis. Matsumoto K, Terakawa M, Fukuda S, Saito H. *Int Arch Allergy Immunol*. 152 Suppl 1: 2-8, 2010
35. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the Mdx model of duchenne muscular dystrophy. Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, Matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. *J Cell Physiol*. 223: 695-702, 2010
36. beta(2)-adrenoceptor agonists enhance cytokine-induced release of thymic stromal lymphopoietin by lung tissue cells. Futamura K, Orihara K, Hashimoto N, Morita H, Fukuda S, Sagara H, Matsumoto K, Tomita Y, Saito H, Matsuda A. *Int Arch Allergy Immunol*. 152: 353-361, 2010
37. Proactive treatment appears to decrease serum immunoglobulin-E levels in patients with severe atopic dermatitis. Fukuie T, Nomura I, Horimukai K, Manki A, Masuko I, Futamura M, Narita M, Ohzeki T, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. *Br J Dermatol*. 163: 1127-1129, 2010
38. Identification of a polyI:C-inducible membrane protein that participates in dendritic cell-mediated natural killer cell activation. Ebihara T, Azuma M, Oshiumi H, Kasamatsu J, Iwabuchi K, Matsumoto K, Saito H, Taniguchi T, Matsumoto M, Seya T. *J Exp Med*. 207: 2675-2687, 2010

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし