

心身障害研究「周産期の医療システムと情報管理に関する研究」班（研究代表者:多田裕、研究分担者:中村肇）が作成した「ハイリスク新生児入院基本情報」を参考にし、さらに、NICHD（National Institute of Child Health and Development）、Vermont Oxford Network、British Association of Perinatal Medicine 等の海外データベースを参考に作成。疾患の定義、重症度の判定などは、データベースマニュアルを作成して一定の定義に従う。現在登録項目数は新生児144、施設13である。

さらに、今後のさらなる診療水準の向上のために必要なデータベース機能の強化を目指す。

（倫理面への配慮）

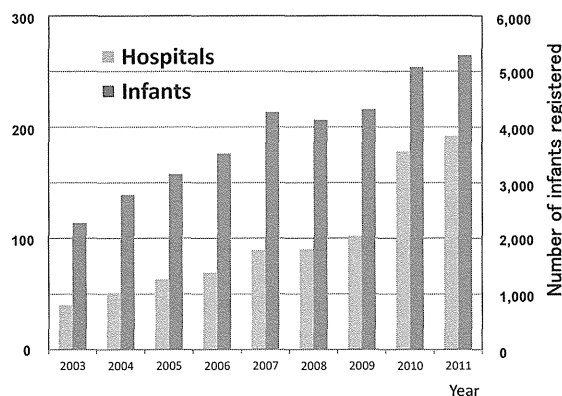
「疫学研究に関する倫理指針」に則り、登録児の情報を匿名化して収集する。また、データ登録に際しては、保護者から同意を得る。

C. 研究結果

1. 登録数

2003年当初は図1に示すように、参加施設は40、登録数は2281例であったが、最新のデータである2011年出生児では、参加施設は192、登録数は5288例となった。これは全国の極低出生体重児の約65%のカバー率である。

図1 参加施設および登録数の推移



2. 報告書によるデータのフィードバック

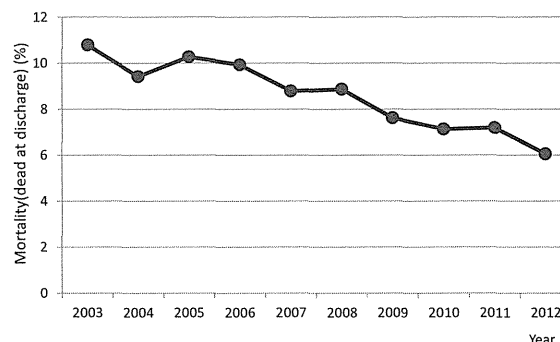
収集データは年次報告書として参加施設別に報告される。報告書の内容は、

- ・施設データ（年度別、全体との比較）
- ・症例データ（年度別、全体との比較、施設ランク）
- ・出生体重で補正した施設ランク）
- ・予後データ（年度別、全体との比較、施設ランク）
- ・年次推移（2003年からの推移、全体との比較）
- ・出生体重および在胎期間別データ（年度別）で、全体で約300頁となっている。そのため、参加施設では、登録データの年次報告書から、当該施設での診療内容の課題を知り、その向上を図ることができる。

3. 死亡率の年次推移

2003年出生児と2012年出生児の死亡退院率を比較すると、図2に示すように、11%から6%と低下しており、10年間で死亡率が約1/2に減少した。このデータベースを通じて、わが国の周産期医療が現在も急速に進歩していることが確実に示された。

図2 死亡退院率の年次推移



4. データベースの機能強化

2015年出生児からは、現在の出生体重のみ

による登録基準から、在胎期間 32 週未満または出生体重 1500g 以下とする。また、登録項目として、〈母体情報〉として、胎児母体間輸血症候群の有無、〈分娩情報〉として臍帯動脈血ガス分析値、〈新生児期情報〉として入院時血液ガス分析値を追加する。

D. 考察

周産期ネットワークデータベースは順調に運営されているが、まだ参加していない施設が存在するので、さらなる拡大が必要である。また、従来の登録基準は出生体重 1500g 以下であったため、在胎期間が進むと子宮内発育制限児の割合が多くなり、分析結果にバイアスが生じていた。そこで、2015 年からは、在胎期間 32 週未満または出生体重 1500g 以下を登録基準とした。この結果、子宮内発育制限児の増加による解析バイアスを回避することが可能となった。また、新たに出生時の情報を追加することで、出生前の胎児の状態と出生後の予後との関係をより詳細に検討できるデータベースとなった。今後のわが国の周産期医療の発展にとって、周産期ネットワークデータベースはさらに重要な役割を果たすことになる。

E. 結論

2003年出生児から登録されている周産期ネットワークデータベースが順調に運営され、さらにその機能が強化された。

F. 研究発表

1. 論文発表

・Shah PS, Lee SK, Lui K, Sjörs G, Mori R, Reichman B, Håkansson S, Feliciano LS, Modi N, Adams M, Darlow B, Fujimura M, Kusuda S, Haslam R, Mirea L; International Network for Evaluating Outcomes of Neonates (iNeo). The International Network for Evaluating Outcomes of very low birth weight, very preterm neonates (iNeo): a protocol for collaborative comparisons of

international health services for quality improvement in neonatal care. BMC Pediatr. 2014; 14:110.

・Morisaki N, Belfort MB, McCormick MC, Mori R, Noma H, Kusuda S, Fujimura M; Neonatal Research Network of Japan. Brief parenteral nutrition accelerates weight gain, head growth even in healthy VLBWs. PLoS One. 2014; 9:e88392.

2. 学会発表

・Kusuda S. Outcomes of Infants Born at 22and 23 Weeks Gestation. Hot Topics in Neonatology 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

慢性肺疾患を中心に極低出生体重児長期予後を改善する NICU 介入の全国調査

担当責任者 難波 文彦 埼玉医科大学総合医療センター小児科講師
研究協力者 田村 正徳 埼玉医科大学総合医療センター小児科教授

研究要旨

新生児慢性肺疾患（chronic lung disease of infancy、CLD）は早産・低出生体重児にとって高頻度で重篤な合併症の一つであり、神経学的後遺症を残す。中でも近年、新生児期のみならず、幼・小児期・成人期にも呼吸器合併症が引き続くことが問題となっている。今回我々は、①CLD 全国調査、②CLD 動物モデルを用いた疾患関連遺伝子のスクリーニングとその機能解析、③CLD 重症化に関連する遺伝子多型解析、④シベレスタットナトリウム（以下、シルベスタット）を用いた CLD 新規治療・予防法に関する臨床試験、を目的に研究を行った。2015 年 CLD 全国調査の質問票を作成し、アンケート調査研究の準備を行った。新生仔期高濃度酸素暴露 CLD 動物モデルを用いて、CLD 回復期に重要な遺伝子 Hapln1 を同定した。Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 解析のため早産・低出生体重児より血液を採取し genomic DNA を抽出した。CLD 薬物療法に関する全国調査を行い、シベレスタット使用施設が判明した。新生児に対するシベレスタットの有効性について後方視的に検討を行っている。引き続き CLD の現状と病態把握、新規バイオマーカーの探索と治療・予防法の開発のための研究を行っていく。

A. 研究目的

本研究の目的は、新生児慢性肺疾患（chronic lung disease、以下 CLD）の現状と病態把握、新規バイオマーカーの探索と治療・予防法の開発のために、①CLD 全国調査、②CLD 動物モデルを用いた疾患関連遺伝子のスクリーニングとその機能解析、③ CLD 重症化に関連する遺伝子多型解析、④シベレスタットナトリウムを用いた CLD 新規治療・予防法に関する臨床試験、を行うことである。

B. 研究方法

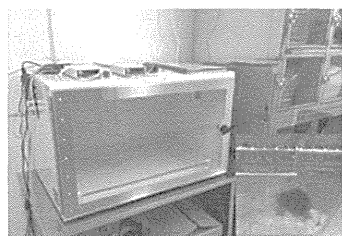
1. CLD 全国調査

5 年毎に行われる CLD 全国調査を行う。2010 年に行われた調査票（①体重別入院症例調査、②CLD 症例調査、③CLD 管理方式調査）を入手する。追加項目を検討し、調査票を更新、埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会に提出する。同倫理委員会承認後、全国の日本周産期・新生児医学会周産期（新生児）専門医基幹および指定施設に送付する。

2. 遺伝子発現解析

マウスは C57BL/6 マウスを用いる。生後 12 時間以内の新生仔マウスに 95%酸素を 96 時間（4 日間）動物チャンバー内で暴露し、CLD マウスモデルを作製する（図 1）。3 日間 21%酸素（以下、ルームエア）で回復

させた日齢7のマウスから肺を摘出し、mRNAを抽出する。microarrayを用いて網羅的に遺伝子発現解析を行う。コントロールはルームエアで飼育した日齢7マウスとする。同定した遺伝子の発現量はqPCRを用いて確認する。



Animal chamber
O₂ controller
CO₂ controller

図1. 動物チャンバー
動物チャンバー内で新生仔マウスに対して95%酸素を96時間暴露する。

3. 遺伝子多型解析

両親へのインフォームドコンセント後、在胎期間32週未満かつ出生体重1250g未満の早産・低出生体重児から末梢血2mLを採取する。採血はEDTA入り採血管に行い冷蔵庫保存する。Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)を用いてDNAを抽出し、注目する遺伝子の遺伝子多型をTaqMan® SNP Genotyping Assaysを利用して解析する。

4. シベレスタットナトリウム

全国の総合周産期施設におけるCLDに対する薬剤使用の状況を把握するためにアンケート調査を実施する。シベレスタット使用経験施設(11施設)とCLDに対するシベレスタット投与に関する後方視的研究を行う。対象は2007年から2013年の7年間に入院した在胎期間28週未満かつ出生体重1000g未満の早産・低出生体重児とする。カルテを後方視的にレビューし、新生児に対するシベレスタット投与の効果について非投与群と予後、特に呼吸器系予後を比較検討する。

C. 研究結果

1. CLD全国調査

2010年に行われたCLD全国調査の調査票を高槻病院小児科、南宏尚先生から入手した。①体重別入院症例調査、②CLD症例調査、③CLD管理方式調査のうち、CLD管理方式調査に近年話題となっている、INSURE (intubation-surfactant-extubation)、カフェイン、シベレスタット、HFNC (high-flow nasal cannula)、NAVA (neurally adjusted ventilatory assist)等の項目を追加した。現在、本調査研究について、埼玉医科大学総合医療センター倫理委員会に申請中であり、承認後には日本周産期・新生児医学会周産期(新生児)専門医基幹および指定施設に質問票を送付する予定である。

2. 遺伝子発現解析

生後12時間以内の新生仔マウスに95%酸素を96時間暴露し、CLD動物モデルを作製した。96時間以降はルームエアで飼育した(回復期)。新生仔期の高濃度酸素暴露により、肺胞発達は停止し、数の少ない大きさの大きい肺胞構造を示した(肺胞の単純化)。肺胞の単純化は少なくとも回復期(日齢14)まで持続した(図2、図3)。

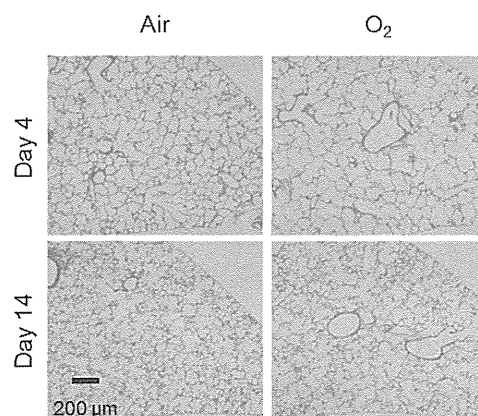


図2. 肺組織像(H.E.染色)

新生仔期高濃度酸素暴露により肺胞は単純化し、影響は日齢 14 まで続いた。(Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

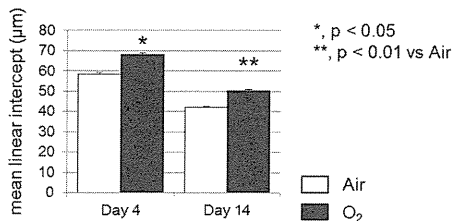


図 3. Mean Linear Intercept (MLI)

MLI (肺胞径の指標) は高濃度酸素暴露群で有意に大きく、この有意差は日齢 14 まで続いた。(Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

新生仔期 96 時間高濃度酸素暴露後 3 日間ルームエア下でリカバリーさせた日齢 7 のマウス肺を用いて遺伝子発現解析を行った。ルームエア下で 7 日間飼育したマウス肺をコントロールとした。コントロールと比較して肺で 2 倍以上有意に発現量の異なる遺伝子をスクリーニングし、結果以下の 5 つの遺伝子、Ccdc3、Prnd、Cpa3、Hapln1、Fhl5 を同定した。(図 4、図 5)

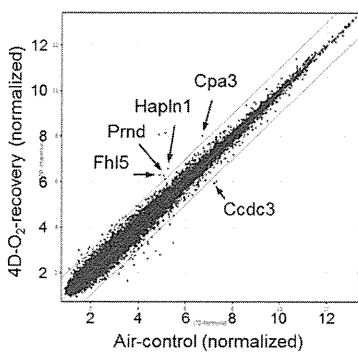


図 4. 遺伝子発現解析 (マウス肺)

両群間 (O₂ 対 Air) で有意に 2 倍以上発現量の異なる遺伝子 5 つを同定した。(Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

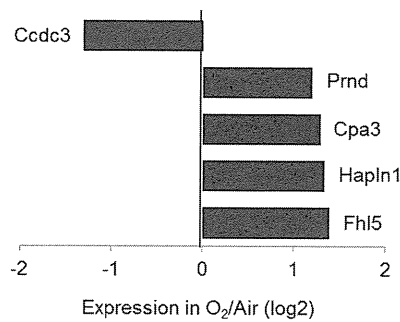


図 5. 候補遺伝子

候補遺伝子の発現量の比 (O₂/Air) (Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

同定した 5 つの候補遺伝子の中から、細胞外基質で重要な役割を果たし、その欠損マウスは生後すぐ呼吸不全で死亡し、日本人の遺伝子多型が報告されている Hapln1 遺伝子に注目し、以降の解析を行った。まず、microarray の結果の妥当性を確認するため、Hapln1 の発現量を qPCR を用いて確認した。Microarray の結果と同様に高濃度酸素暴露群ではコントロール群と比較して、Hapln1 遺伝子の発現量が 2 倍以上有意に増加していた (図 6)。

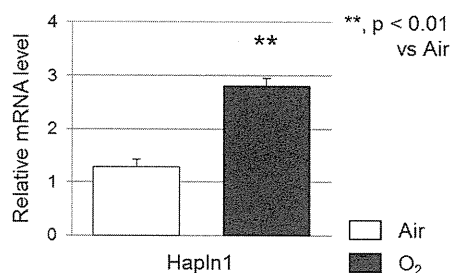


図 6. Hapln1 遺伝子発現量の比較

高濃度酸素暴露群では Hapln1 遺伝子発現量がコントロール群と比較して有意に増加した。(Air、21%酸素；O₂、95%酸素)

次に Hapln1 遺伝子の発現量を同様に qPCR で時系列に定量したところ、Hapln1 遺伝子発現量は高濃度酸素暴露後の回復期

にコントロールと比較して有意に上昇し、この有意差は成獣期まで持続した（図 7）。

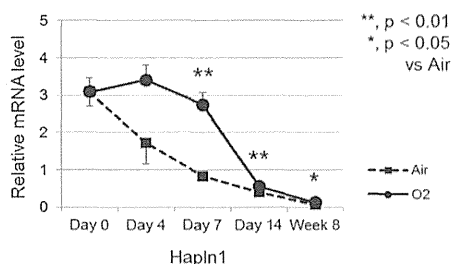


図 7. Hapln1 遺伝子発現の時間的推移
コントロール群と比較して、高濃度酸素暴露群では暴露後回復期に Hapln1 遺伝子の発現量が増加し、その増加は成獣期まで続く。（Air、21%酸素；O2、95%酸素）

今後は細胞・組織培養系を用いた *in vitro* の解析やノックアウトマウスを用いた *in vivo* の解析により、Hapln1 が CLD の病態にどのように関与しているかどうかについて解析を行っていく予定である。

3. 遺伝子多型解析

埼玉医科大学総合医療センターおよび埼玉医科大学の倫理委員会の承認を得て、研究を開始した。対象患児の両親の同意を得た後、末梢血 2 mL を採取した。末梢血全血からキット（Wizard® Genomic DNA Purification Kit、Promega）を用いてゲノム DNA を抽出し、今後の SNP タイピングのため、4 °C で保存中である。SNP 解析の候補遺伝子として Hapln1 の遺伝子多型をタイピング予定である。また、新生児慢性肺疾患コンソーシアムを立ち上げ、現在多施設共同研究体制を構築中である。参加予定施設は、当センターの他、秋田大学、大阪大学、大阪府立母子保健総合医療センター、久留米大学、慶応大学、国際医療福祉大学、聖マリアンナ医科大学、筑波大学、東京女子医科大学、獨協医科大学越谷病院、富山大学、北海道大学、横浜市立大学附属市民

総合医療センター、りんくう総合医療センターである。

4. シベレスタットナトリウム

CLD に対する予防薬・治療薬の使用状況について全国の総合周産期施設 96 施設にアンケート調査を行った。回答率は 80% (77/96) だった（図 8）。

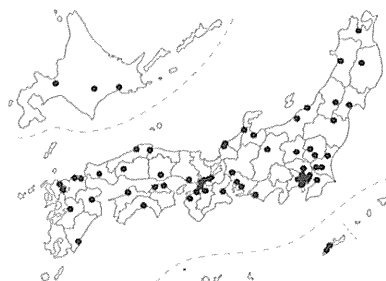


図 8. 回答のあった総合周産期施設
回答率は 80% (77/96)。

CLD 予防を目的とした薬剤のうちシベレスタットは 96 施設中 15 施設（16%）で使用されていた（図 9）。

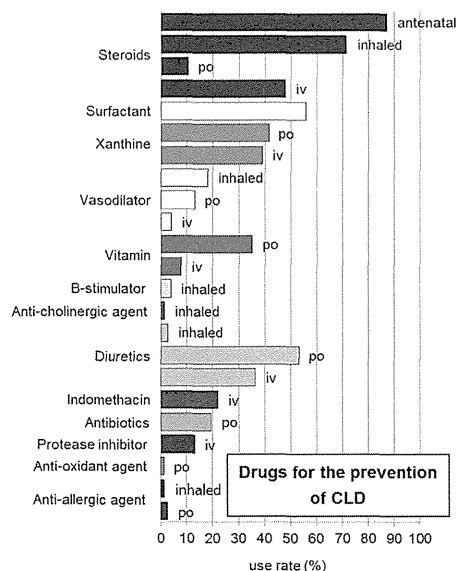


図 9. CLD 予防を目的とした薬剤使用率
96 施設中 15 施設でシベレスタットを CLD 予防に使用していた。

15施設中11施設の賛同のもと、「CLDに対するシベレスタット投与の予防・治療効果に関する研究班」を立ち上げた。参加施設は、安城更生病院、大分県立病院、岡山医療センター、北九州市立医療センター、高知医療センター、聖マリアンナ医科大学、名古屋第一赤十字病院、名古屋第二赤十字病院、奈良県立医科大学、広島市民病院、三重中央医療センターである。現在、早産・低出生体重児に対するシベレスタットの有効性について、後方視的カルテレビューによる検討を行っている。将来的には多施設によるランダム化比較試験を行う計画である。

D. 考察

CLDは、めざましい新生児医療の発展にもかかわらず、未だ早産・低出生体重児にとって高頻度で重篤な合併症の一つであり、神経学的後遺症を残す。出生体重1000g未満の超低出生体重児に限っては50%以上が罹患する。中でも近年、新生児期のみならず、幼・小児期にも呼吸器合併症が引き続くことが問題となっており、呼吸器感染症や喘息様疾患で頻回の再入院を必要とする。この症状は思春期・青年期でも引き続き、長期の薬剤によるコントロールを必要とすることもあり、医療経済学上大きな問題となっている。今回われわれは、CLDの現状と病態把握、新規バイオマーカーの探索とその機能解析、薬剤を用いた新規治療法の開発に向けて研究を行った。

まず、CLDの現状把握のため2015年に予定しているCLD全国調査の準備を行った。本調査に関しては2015年春には調査票を送付する予定である。過去の全国調査と比較することにより現在のCLD対策に関する問題点を抽出することができ、その結果を今後のCLD対策とそのための研究材料として

使用できることが期待される。また、新しいCLD対策として期待されているINSURE、HFNC、NAVA等も質問事項に加え、これらの国内での認知度を知るとともに今後の情報提供に役立てることができる。

CLDの予後判定や治療法の開発のためには新規バイオマーカーの同定が必須である。今回われわれは、CLDマウスモデルの回復期肺を用いた遺伝子発現解析を行った結果Hapl1に注目し、以降の解析を行った。Hapl1遺伝子発現はCLDマウスモデルの回復期に増加し、その増加は成獣期まで持続した。今後は胎児肺の培養系やHapl1遺伝子欠損マウスを用いた表現型解析により、肺内Hapl1の機能について解析予定である。

さらに、CLDは多因子疾患であり、過去の双胎研究等により遺伝もCLDの病因の一つとして報告されている。現在、患者血液よりgenomic DNAを収集中である。CLD動物モデルで候補遺伝子として同定され、日本人での遺伝子多型もすでに報告されているHapl1を最初の候補遺伝子としてSNP解析を行っていく予定である。

CLDのその他の病因の一つとして胎内感染／炎症の重要性が近年指摘されている。胎内感染／炎症の病態は絨毛膜羊膜炎であり、それは主に母体好中球浸潤による急性炎症である(Namba F, et al. *Pediatr Res* 2010)。また、好中球がCLDまたはCLD重症化に関与することを示唆する報告も多い。シベレスタットは選択的好中球エラスターゼ阻害剤であり、好中球エラスターゼ阻害による重症化予防がCLDの新規予防・治療法として期待されている。今回われわれは新生児に対するシベレスタット投与の有効性を後方視的に検討するために、シベレスタット使用施設を調査した。現在、カルテから抽出した臨床データを収集・解析中である。同時に小児に対するシベレスタ

ット投与に関する系統的レビューも行って
おり、将来的には多施設共同ランダム化比
較試験を計画中である。

E. 結論

- 2015年 CLD 全国調査の質問票を作成し、アンケート調査研究の準備を行った。
- CLD 動物モデルを用いて、CLD 回復期に重要な遺伝子 Hapln1 を同定した。胎児肺組織培養や遺伝子欠損マウス等を用いた機能解析を行う。
- SNP 解析のため患者血液より genomic DNA を収集中である。Hapln1 の SNP を解析予定である。
- シベレスタット使用施設を調査した。新生児に対するシベレスタットの有効性について後方視的に検討中であり、将来的には多施設ランダム化比較試験を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

- **Namba F**, Go H, Murphy JA, et al. Expression level and subcellular localization of heme oxygenase-1 modulates its cytoprotective properties in response to lung injury: a mouse model. PLoS One 2014; 9: e90936.
- Itakura R, **Namba F**, Arakawa A, et al. EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in a ten-year-old girl accompanied by posterior reversible encephalopathy syndrome and disseminated herpes simplex virus infection: A case report. J Saitama Medical University 2015; in press.
- Ogawa R, Mori R, **Namba F** et al. Drug therapies in bronchopulmonary dysplasia in Japan: questionnaire survey. Pediatr Int 2015; in press.
- **難波文彦**. 病態—出生後因子とその対応 ②酸素障害. 最新版 慢性肺疾患、

周産期医学、2014; 44 (8): 1053-1057. 東京医学社.

- モハメド・ハメド・フセイン、**難波文彦**、加藤稲子ら. 呼吸管理の実際 HHHFNC. 最新版 新生児呼吸管理、周産期医学、2014; 44 (12): 1571-1576. 東京医学社.
 - **難波文彦**. 新生児慢性肺疾患. 今日の治療指針、2015; 1: 1272. 医学書院.
- ##### 2. 学会発表
- Ogawa R, Mori R, Sako M, Kageyama M, Tamura M, **Namba F**. Drug therapies for bronchopulmonary dysplasia in Japan: A questionnaire survey. Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, 2014.5: Vancouver, Canada, poster presentation.
 - 小川 亮、森 臨太郎、佐古 まゆみ、影山 操、田村 正徳、**難波 文彦**. わが国における新生児慢性肺疾患薬物療法：アンケート調査から、第 50 回日本周産期・新生児医学会、2014. 7: 浦安、一般講演
 - **難波文彦**、小川亮、伊藤誠人、新井幸男、郷勇人、加藤稲子、田村正徳. 動物モデルを用いた新生仔期高濃度酸素暴露の長期的影響と肺傷害修復過程における重要分子の同定、第 59 回日本未熟児新生児学会、2014. 11: 松山、一般講演

G. 知的財産権の出願・登録状況

- なし

厚生労働科学研究委託費（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

低出生体重児出生予防のための妊娠中の適正体重増加と食事摂取保健指導の
介入研究

担当責任者 大田えりか（成育医療研究センター研究所政策科学研究部 室長）

研究要旨

日本において、痩せ型の女性が20年前に比べ2倍に増加しており、痩せ型女性の妊娠中の体重管理が低出生体重児増加の大きなリスク要因となっている。妊婦健康診査（以下、妊婦健診という。）での効果的な介入に関するエビデンスをまとめたパッケージは未だなく、効果のある介入につながるエビデンスの構築が急務である。本研究分担任では、低出生体重児出生予防のための妊娠中の適正体重増加と食事摂取保健指導の介入研究を実施するために、適正な体重増加量の範囲および効果のある介入パッケージを作成することを目的とした。妊娠中の適正体重増加量に関する系統的レビューおよび低出生体重児出生予防のための妊娠中効果のある介入研究のオーバービューレビューを実施している。来年度には、科学的根拠のまとめが報告できる予定である。

研究協力者

Olukunmi Omobolanle Balogun 東京大学
Amarjagal Dagvadorj 成育医療研究センター
研究所
Mizanur Rahman 東京大学
Juan Pablo Peña-Rosas 世界保健機関

A. 研究目的

近年日本では、低出生体重児が全出生のおよそ10%にまで増加している。低出生体重児は、将来生活習慣病になるリスク要因であることが、多くの疫学調査から明らかにされている。低出生体重児が増加する要因の多くは母体要因であり、女性の喫煙率の増加や、高齢出産の増加に加え、アジア諸国に特有の妊娠前Body Mass Index(BMI)が痩せ型(BMI<18.0kg/m²)の女性の増加が要因であると報告されている。特に日本において、痩せ型の女性が20年前に比べ2倍に増加しており、痩せ型女性の妊娠中の体重管理が低出生体重児増加の大きなリスク要因となっている。妊婦健診での効果的な介入に関するエビデンスをまとめたパッケージはいまだなく、効果のある介入につながるエビデンスの構築が急務である。本研究分担任では、低出生体重児出生予

防のための妊娠中の適正体重増加と栄養指導の介入研究を実施するために、適正な体重増加量の範囲および効果のある介入パッケージを作成することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 妊娠中の適正体重増加量に関する系統的レビューの計画書(プロトコール作成)

妊娠中の適正な体重増加量を明らかにするために、系統的レビューを実施する。

研究疑問：妊娠前BMI別に、周産期リスクを予防するために妊娠中の体重増加量の適正な範囲はどの程度か？

検索データベース：PubMed, EMBASE, CINAH, British Nursing Index, Web of Scienceにて検索を実施する。

研究デザイン：population-basedのprospective, retrospective研究

対象者：妊婦

暴露要因：妊娠中の体重増加量は、妊娠前の体重(self-reportでも可)または妊娠初期の初回の体重から出産直前の体重の変化量と

する。

アウトカム：主なアウトカムは、small for gestational age (SGA) 児または、large for gestational age (LGA) 児出生とする。副次的なアウトカムとして、早産児、低出生体重児、巨大児、周産期死亡の児の出生とする。

研究の質の評価：方法の質の評価は、Newcastle-Ottawa Scaleを用いる。

分析方法：データは、BMIカテゴリーを（18.5未満、18.5-25未満、25以上）の3群に分けて、アウトカムになるリスクの範囲をメタ分析で統合し、適正範囲を計算する。

- 2) 低出生体重児出生予防のための妊娠中に効果があるとされている介入研究のオーバービューレビューの計画書（プロトコル）

低出生体重児出生を予防するための妊娠期の適切な体重増加量・身体活動量・食事摂取量・生活習慣などの妊婦健診での保健介入についてオーバービューレビューを作成し、エビデンスを集約し、効果のある介入に関して明らかにする。

研究手法：オーバービューレビュー

分析対象となる研究：randomized controlled trials (RCTs)を対象とするコクランレビューなどの系統的レビュー

対象者：妊産婦、または妊娠前の女性

介入方法：行動介入（栄養摂取、運動、生活習慣、サプリメント摂取など）

結果測定方法：出生体重、低出生体重児(2500g未満)出生率（%）

先行研究探索方法：The Cochrane central register for controlled trials (CENTRAL), Cochrane database of systematic reviews などのオンラインデータベースを用いて、2009年以降にアップデートされている

Pregnancy and childbirth group のコクランレビューの中で、低出生体重児をアウトカ

ムとして行われたすべての介入研究を対象に検索を行い、分析を行う予定である。

（倫理面への配慮）

出版されたデータの二次利用であるので、倫理委員会の承認は要さない。

C. 研究結果

- 1) 妊娠中の適正体重増加量に関する系統的レビュー

本分担研究班および WHO の栄養部と共同研究で、妊婦の体重増加量の系統的レビューを実施している、添付資料 1 の“Global, regional and national optimal gestational weight gain in pregnant women: a systematic review and meta-analysis”の計画書 (protocol) を作成した。検索を実施したところ、合計 5963 の文献が 5 つのデータベースから検出され、現在スクリーニングを実施している（表 1）。

Protocol は PROSPERO という系統的レビューの登録システムに、登録申請をしている。Protocol も論文として、英文医学誌に出版する予定である。

表 1 検索結果

Database searched	Date searched	Number of results
CINAHL (EBSCO) 1982 to feb 2015	5/2/15	390
MEDLINE & Medline in Process (OVID) 1946 to 4/2/15	5/2/15	1659
EMBASE (OVID) 1974 to 4/2/15	5/2/15	3922
British Nursing Index 1994 to Feb 2015	5/2/15	13
Web of Science (SCI, SSCI, CPCI-S, CPSI-SSH) to Feb 2015	5/2/15	294
Total		6279
After de-duplication		5963

2) 低出生体重児出生予防のための妊娠中効果のある介入研究

WHO Global Nutrition Targets 2025: Low Birth Weight Policy Briefのドラフト作成（特に、サプリメントによる介入の有効性の部分を加筆した）に貢献した（添付資料2）。低出生体重児を2025年までに30%減少させるという目標に向けて、日本から貢献するために、妊娠中に効果のある介入のパッケージを作成するために、来年度overview reviewを作成する。

ポリシーブリーフでは、低出生体重児出生予防に効果のある介入として以下のものがあげられた。引き続き、これらの効果のある介入をまとめる論文を作成する予定である。

D. 考察

上記の系統的レビューをもとに、低出生体重児の出生を予防するための科学的根拠を明らかにすることができる。それをもとに、妊娠中に効果のある介入のパッケージを作成する。WHOとの共同研究で進めることにより、日本のみならず世界の低出生体重児出生予防にも貢献することができる。低出生体重児出生予防のために、痩せ型の妊婦の体重増加量をどのように増やしていくかが今後の課題だが、文化的な背景もあるため、今後心理の専門家などと相談しながら、計画している系統的レビューにより明らかになった科学的根拠を日本でどのように応用するかを明らかにする必要がある。

E. 結論

系統的レビューは順調に進んでおり、低出生体重児を予防するための科学的根拠を明らかにすることができる。今後、日本で増加するやせ型の体型の妊婦が、適正な体重増加ができるような有効な介入方法を文化的な背景を含めて検討していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Kita M, Gilmour S, Ota E. Trends in perinatal mortality and its risk factors in Japan. 20th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility, Paris Marriott Rive Gauche Hotel & Conference Center, Paris, France, 2014, Dec.5.
- 2) Kita M, Gilmour S, Ota E. Estimating trends in the optimal birth weight in Japan, 1979-2010. 20th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility, Paris Marriott Rive Gauche Hotel & Conference Center, Paris, France, 2014, Dec.6.

G. 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

Proposal

Global, regional and national optimal gestational weight gain in pregnant women: a systematic review and meta-analysis

Background and rationality

The monitoring gestational weight gain (GWG) during pregnancy reflects of measuring nutritional status and physical activity during pregnancy. The effects of gestational weight gain on perinatal outcomes have been well recognized. A systematic review of the outcomes of maternal weight gain have suggested that low birthweight (LBW), small for gestational age (SGA), macrosomia and large for gestational age (LGA) have strong correlations with gestational weight gain, while cesarean section has a moderate correlation and preeclampsia has a weak correlation with gestational weight gain.¹ The updated guideline by the Institute of Medicine in the US regarding appropriate gestational weight gain published in 2009. There is no comprehensive updated review for appropriate GWG during pregnancy globally.

Aim: The main aim of this study is to determine the appropriate gestational weight gain (GWG) for women at global, regional level.

Objective: We will conduct a systematic review with meta-analysis of the literature to assess appropriate GWG and its range for each maternal body mass index (BMI) category (underweight, normal, overweight, or obesity) at the global, regional, and country level.

Methods

Population: All pregnant women

Exposure: GWG and it will be defined as the differences between the weights recorded at the third trimester closed to the date of delivery and the weight recorded at the pre-pregnancy or first antenatal visit. First visit in in the first trimester will be treated as fist antenatal visit.

Outcomes: Small for gestational age (SGA) or large for gestational age (LGA)

Study Inclusion criteria:

- Pregnant women aged 15-49 years
- Singleton deliveries
- Self-reported weight as well as measured weight
- Population-based cohort studies particularly prospective or retrospective types
- No restrictions on language or time.
- No restrictions on country or region.
- Published articles and unpublished work including conference proceedings, and working papers.
- Multiple publication from the same study data: if they provide mutually exclusive information, both publications were included

Study exclusion criteria:

- Women weights recorded after first trimester.
- Cross-sectional studies and case-control studies
- High risk population in the cohort: women with HIV/AIDS, malaria, heart diseases, diabetes, preeclampsia or pregnancy-induced hypertension
- RCTs addressing the any intervention during pregnancy
- Systematic review

Search Strategy:

We will conduct a systematic review with meta-analysis according to Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) census statement.² We will perform a search for studies on maternal anthropometry and risk of perinatal outcomes particularly SGA or LGA with the assistance of an information specialist. A comprehensive literature review using the databases PubMed, EMBASE, CINAHL, and British Nursing Index will be performed with the assistance of an information specialist. A separate search of Web of Science will be undertaken in order to capture any grey literature. Further searches for eligible studies were conducted by reviewing references within identified papers and relevant journals. No limit will be applied to the databases either in terms of publication date or language, with all databases searched from inception.

Three search themes will be merged using the Boolean operator “AND.” The first theme, pregnant women, combined exploded versions of Medical Subject Headings pregnant women OR pregnancy OR title and abstract text mother* OR pregnan* OR gravid OR obstetric OR antenatal OR antepartum OR gestation*. The second theme, maternal anthropometry, combined exploded versions of Medical Subject Headings terms Body Mass Index OR Body Weight OR gestational weight gain OR title and abstract text BMI* OR weight* OR attained weight OR height*. The third theme, pregnancy outcomes combined exploded versions of Medical Subject Headings terms infant, low birth weight

OR gestational age, OR birth weight OR text words small for gestational age OR birth weight.

Study Quality Assessment Checklist: We employed a specific a specific checklist to assess the methodological quality of all included cohort studies using the Newcastle–Ottawa Scale (NOS) recommended by Wells and colleagues.³ Two authors will assess the study quality independently.

Data Extraction Strategy: Two authors will manually enter data into a standard data extraction form for each study and then synthesize into tables.

Measurement of appropriate GWG: Appropriate GWG and its ranges differ according to maternal body mass index (BMI) at pre-pregnancy or first trimester. The range of optimal GWG will be determined depending on the joint predicted risk of either SGA or LGA births in relation to maternal BMI categories (underweight, overweight, or obesity) proposed by WHO.

Analysis: We will summarize baseline characteristics, cases and events in exposed and non-exposed cohorts, and odds ratio (OR) or relative risk (RR) according to individual study sample size and design. RR will be used as the common outcome measure in observational studies. Where the incidence of an outcome is not common (<10) in the study population, the OR is approximately equivalent to RR, but this is not true for common outcomes of interest. In these cases, we will convert OR into RR according to Zhang's proposed methodology.¹ We will directly consider RRs when a study reports

hazard ratios and incidence density ratios. If the RR or OR is unavailable, we will estimate the unadjusted RR with 95% CI from raw data and use this estimate in the meta-analyses. We will estimate mean difference for continuous data.

Pooled risk estimates will be performed according to maternal BMI categories. If random-effects analyses will be conducted, the results will be presented as the average treatment effect with 95% confidence intervals, and the estimates of Tau^2 and I^2 . If there are few studies, or small sample size, it may be impossible to estimate between-study variance with any precision. In that case a random-effects analysis would provide poor estimates of the distribution of intervention effects, therefore we would use a fixed-effect model. We used Funnel plots and Egger's regression asymmetry test to examine publication bias.² To account for these publication biases in meta-analysis, we additionally performed trim-and-fill procedures.³

We will perform subgroup and meta-regression analyses according to study design, sample size, confounding factors, study quality, World Bank country income category, WHO regions, ethnicity, and country-specific. We will undertake sensitivity analyses to determine differences in summary effects by dropping a small number of highly influential studies.

References:

Viswanathan M, Siega-Riz AM, Moos MK, et al. Outcomes of maternal weight gain. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 2008(168):1-22

厚生労働科学研究委託費（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

早産のエピジェネティクス分析

担当責任者 高橋尚人 東京大学医学部附属病院総合周産期母子医療センター
准教授

研究要旨 低出生体重児は冠動脈疾患・肥満・2型糖尿病・メタボリックシンドロームをはじめとした成人後疾病発症のハイリスクとされ、エピジェネティックな変化がそのメカニズムの一つとして想定されているが、その証明はなされていない。本研究は極低出生体重児に焦点を当て、臍帯血・生後末梢血・胎盤絨毛膜板を用いて網羅的 DNA メチル化解析と遺伝子発現解析を行うことにより、出生時・出生後の栄養状態・治療がエピジェネティックな修飾状態と遺伝子発現に与える影響およびそれらの関連を検証することを目的とする。東京大学医学部附属病院と国立成育医療研究センターの倫理委員会の承認を得て、2014年11月より検体の回収を開始し、2015年1月末までに、35例の検体を採取した。今後、さらに検体採取を進めるとともに、解析を行う。メチル化解析・発現解析の過程で有意な情報が得られた場合は、DNA メチル化や発現に影響を与える遺伝因子について、SNP(single nucleotide polymorphism;一塩基多型)アレイ解析などを用いた検討を追加する。

A. 研究目的

近年、胎児期の環境が将来の生活習慣病の発症に影響するという仮説が提唱され、DOHaD (developmental origins of health and disease)と呼ばれている。この仮説は疫学的検討および動物実験では実証されつつあるが、ヒトにおけるそのメカニズムはまだ不明である。そのメカニズムの一つとして、環境に合わせて遺伝子発現を調節するエピジェネティクスが想定されている。一方、極低出生体重児（出生体重 1500g 未満の児）をはじめとする

多くのハイリスク新生児が生存可能となっているが、これらハイリスク児には子宮内環境のみならず出生後にも医療など様々な環境要因が負荷される。従って、極低出生体重児には出生前のみならず出生後においてもエピジェネティクスの面で、様々な変化があることが想定される。

現在、これら胎生期から新生児期にかけてのエピジェネティクスについては、正期産児および late preterm の児についての検討はいくつか報告されているが、さ

らなる早産児や極低出生体重児に絞った解析はなされておらず、特に網羅的解析についての報告は皆無である。

本研究では、極低出生体重児の臍帯血および生後の末梢血、さらに胎盤から DNA を抽出し、網羅的メチル化解析および遺伝子発現解析を行うことにより、出生時・出生後の栄養状態・治療がエピジェネティックな修飾状態と遺伝子発現に与える影響およびその関連を検証する。さらに、この解析過程で有意な情報が得られた場合は、DNA メチル化や発現に影響を与える遺伝因子について、SNP アレイ解析および全エクソン配列解析を用いた検討を追加する。

B. 研究方法

本研究は東京大学（以下、東大）医学部産婦人科・小児科と成育医療研究センター周産期病態研究部の共同研究とする。東大が主たる研究施設となる。

主な対象は東京大学医学部附属病院（以下、東大病院）で出生する極低出生体重児とするが、同時に出生体重 1500g 以上の新生児についても、比較対照として同様に検体採取を行う。検体は胎盤、臍帯血、生後の末梢血とする。これら新生児の出生後に臍帯血 2ml と胎盤 3cm³ を採取する。また、新生児がそのまま東大病院新生児集中治療部に 2 週間以上入院する場合、受胎後 36~42 週の時点で末梢血を 1-2ml 採取する。

東大小児科において、これら採取した

血液からリンパ球を分離し、DNA と RNA を抽出した後、成育医療研究センターに搬送する。胎盤については、東大にて小片を取り分けた後、速やかに凍結保管とし、成育医療研究センターに搬送し、その後 DNA と RNA を抽出する。

これらの DNA について、成育医療研究センターにおいて DNA のメチル化を網羅的に解析する。その後、DNA のメチル化の状況を、在胎週数や出生体重、胎児発育遅延の有無(SGA vs non SGA: *SGA; small for gestational age)、母体因子などの臨床情報、児への治療内容(呼吸管理、栄養状況など)、遺伝背景および各遺伝子の発現状態と照らし合わせて、統計学的解析を行う。もしこの過程で有意な情報が得られた場合は、DNA メチル化に影響を与える遺伝要因について、成育医療研究センター周産期病態研究部で、一塩基多型(SNP)アレイ解析および全エクソン配列解析、遺伝子発現アレイを用いた検討を追加する。全ゲノムシーケンス解析は行わない。

（倫理面への配慮）

研究は東京大学医学部附属病院ヒトゲノム倫理委員会・成育医療研究センター倫理委員基へ申請を行い、承認を得た（審査番号: 東大 G10036、成育 234）。その申請内容に基づき、検体・資料の匿名化を行い、個人情報保護した。臍帯血・胎盤絨毛膜板に関しては、母児に負担をかけずに採取を行っている。生後の末梢血に関しても、検体量は 1-2mL と直後の貧

血につながる量ではない。あくまで生後の児血の採取は定期採血と同時に行うこととしており、本研究のためだけの児からの採血は行っていない。また、児の全身状態が不安定と主治医が判断した際には生後末梢血採取は行っていない。研究参加者は新生児のため、その保護者に口頭ならびに文書にて説明し同意書を取得している。

C. 研究結果

2014年4月～10月の間は、検体処理プロトコルの作成、予備実験など研究開始にあたっての基盤作りを行なった。予備実験では健常成人血液検体を用いて単核球分離後、核酸精製ができることを確認した。2014年11月から臨床検体(臍帯血、生後の末梢血、胎盤絨毛膜板)の回収を開始し、2015年1月31日までに極低出生体重児9例、比較対照の児26例から検体回収し、全例のDNA回収に成功している。RNAに関しては生後の末梢血が1例回収できなかったが、残りの対象症例に関しては回収できている。これまでの研究参加症例35例の内訳は、35例全体の中で男児15例、女児20例、SGA児10例(男児5例、女児5例)、non SGA児25例(男児10例、女児15例)であった。在胎週数に関しては23週2日から40週2日の範囲(中央値37週3日)で、出生体重に関しては300gから3576gの範囲(中央値2540g)である。在胎週数32週以下の症例は9例でこのうちSGA児は5例、non SGA

児は4例であった。

D. 考察

予算執行が10月末からで、検体採取開始が遅かったこともあり、現時点で網羅的メチル化解析は行っていないが、年度内に開始する予定である。検体採取が順調に進んでいることから、今後さらに検体回収を進める。極低出生体重児の検体回収も進んではいるが、進捗速度の改善が望まれるため、現在、他の施設の当研究への参入を検討中である。

今までに検体を採取した対象について、週数・出生体重・SGAの頻度を考慮した症例の多様性もあり、今後の研究を進める上で十分に検討の対象になるものと考ええる。

メチル化解析・発現解析の過程で有意な情報が得られた場合は、DNAメチル化や発現に影響を与える遺伝因子について、SNPアレイ解析などを用いた検討を追加する予定で、その準備も開始している。

E. 結論

研究初年度で、倫理申請、検体処理プロトコルの作成、予備実験など研究開始にあたっての基盤作りを行なった。2014年10月末の予算執行後、同年11月より検体(臍帯血、生後の末梢血、胎盤絨毛膜板)の回収を開始し、回収状況は順調である。平成27年度は残りの検体回収を行う。メチル化解析・発現解析の過程で有意な情報が得られた場合は、DNAメチル化や