

11. 神経芽細胞腫スクリーニング精度管理の結果と問題点
鈴木恵美子、成瀬 浩
(財団法人 日本公衆衛生協会スクリーニング精度管理センター)

討論：

- ▶ マスクリーニングの時期、方法、精度
- ▶ マスクリーニングの前向き研究について

第 2 回班会議

日時：平成 16 年 10 月 3 日（日）
場所：東京八重洲ホール 9 階 902（中）会議室
住所 東京都中央区日本橋 3 丁目 4 番 13 号（本館）
TEL03-3201-3631（代表）
最寄駅 東京駅八重洲口から歩いて 3 分
<http://www.yaesuhall.co.jp/map.htm>
時間：10:00～16:00

出席者：檜山英三、澤田淳、家原知子、中山雅弘、赤澤宏平、大瀧慈、成瀬浩、鈴木恵美子、島本太香子、原田正平、田中丈夫、西 基、花井潤師、浅見直、三間屋純一、長谷川朝美、山岡裕明、林邦彦、以上 18 名

班会議開催の挨拶・主旨説明 檜山英三
今回は、前向き研究の実施に関する班会議として、この研究の分担研究者である澤田 淳先生と相談の上、参加していただく方を選定し、討論する会議とした旨説明された。

アンケート調査の報告から 澤田 淳
前向き研究のあり方についてアンケート調査され、その集計結果が澤田 淳分担研究者から報告された。

集計結果から、1 名を除き、マスクリーニングの時期を考慮して行うべきとの意見であったが、その施行時期については様々であった。

マスクリーニングをやるとしたら、いつがよいのかとを決めるのは、過剰診療を減して、進行例が治療の手遅れにならない時期でということになる。その根拠、それを示している論文としては、

1. 浜崎分担研究者報告では、乳児期の神経芽腫の病理組織は成熟しているものが多い。
2. 嶋田分類は 1 才 6 ヶ月で分けている。
3. COG の最近のデータでは 18.8 ヶ月（573 日）診断前後で予後が変わる。

などの結果から、18 ヶ月までにマスクリーニングを行うべきであるが、三間屋先生から、4 例の報告があり、18 ヶ月より少し早めが適切との意見も出されたが、12 から 18 ヶ月の間を決める根拠が乏しい。統一した時期で行うべきとの意見が多かった。

特別講演

「全国乳児コホートを対象とした神経芽細胞腫死亡におけるスクリーニング受検・未受検の比較研究」

群馬大学医学部保健学科 林 邦彦 教授

昨年までの 6 ヶ月神経芽腫マスクリーニング事業で、厚生労働科学研究黒田班の分担研究として行われた事業の概略と結果を説明された。

死亡によって、マスクリーニングを受けたグループと受けないグループの比較で明らかな神経芽腫による死亡率の減少が確認された（1 年間の出生児あたり、5 才までに 30 人前後の死亡が減少）ことが示された。発症、死亡とも他の報告とほぼ一致しており、カナダのケベックのデータは濾紙法であること、ドイツのデータは対照群の死亡がきわめて少ないことなど問題点も明らかにされた。

腫瘍死と治療関連死の区別、晩期死亡、患者追跡の方法などが討論された。

研究成果発表

1. 「1986 - 1995 年追跡調査例の解析」

大瀧 慈

(広島大学原爆放射線医科学研究所)

1,800 症例が、記載の不備例を除く 1,295 例で解析し、マスを受けた症例は、12 から 23 ヶ月で発症無く、また初発症状なければ、ほとんど死んでいないことが示された。マスクリーニング陰性で発症したものが、最も悪く、マスクリーニングで見つかることは、Stage I～III の予後の良く、マスクリーニングを受けると、同じ Stage でも死亡が減る傾向にあった。これは、マスクリーニングの効果かどうかは不明。

HPLC 導入後の解析、生年月日別の解析、マス非受診群のみの解析の必要性が討論された。

2. 「札幌市の生後 1 歳 2 か月児の神経芽細胞腫スクリーニング」

花井潤師

(札幌市衛生研究所)

札幌での 14 ヶ月での施行例の結果が報告され、有効性が認められたが、過剰診断が残存するためにこれら

に対して討論された。

3. 「前向きコホート調査の疫学的な問題点」

西 基

（北海道医療大学生命基礎科学講座）

今回の研究班の前向き研究では、有意な結果無理なので、適当に施行時期をトライしてみよう傾向をつかむことが大事である旨が報告された。

4. 「18 か月スクリーニングの経験」

家原知子

（京都府立医科大学小児科学）

京都府での18ヶ月二次スクリーニングの結果が報告された。

18ヶ月の症例では死亡例がないことが報告されたが、陰性例も存在することなどが討議された。

5. 「京都府の実施計画と現状」

澤田 淳

（京都第2赤十字病院）

10月から実施開始の京都府のマスキリーニングの現状について説明された。

IC（インフォームドコンセント）の問題が提起され、実施時期に治療やその後の追跡についてICを行うか否かの討議が行われ、診断がついた後に治療やその後の追跡のICを行うのがベターで、マスキリーニング施行時期には検査のICのみ行うことが現実に即しているという意見が大半であった。

6. 「大阪府における神経芽腫マス・スクリーニングの現状」

中山雅弘

（大阪府立母子保健総合医療センター 検査科）

大阪府での18ヶ月マスキリーニングの実施方法、18ヶ月を選んだ理由などが説明された。検査方法、マスキリーニングのターゲット、進行例の治療などが討議された。

成瀬先生から、1才6ヶ月に決めないで、もう少し早く行っても良いのではとの意見も提出された。

7. 「新潟県で非行政的に再開した神経芽細胞腫マスキリーニングの経過報告」

新潟県保健衛生センター 浅見 直

（新潟大学小児科）

新潟で行われている1才のマスキリーニングにつ

いての説明がなされた。1歳前後で、自己負担3000円で行い、現在450人程度である旨説明された。

討論：

➤マスキリーニングの時期、方法、精度

マスキリーニングの施行時期として、1才から1才6ヶ月の間が適切であることはほぼ全員の一致するところであった。ただ、一時期に決めるにはエビデンスが少なすぎることが指摘され、後ろ向き研究の早急の集計と結果が必要であることが指摘された。

第3回班会議

日時：平成17年1月10日（月）－11日（火）

場所：大阪大学中ノ島センター 本館9階 会議室

住所 〒530-0005 大阪市北区中之島4-3-53（本館）

TEL06-6444-2100（代表）

最寄駅 阪神本線 福島駅より JR東西線 新福島駅より 徒歩約9分

地下鉄四つ橋線 肥後橋駅より 徒歩約10分

<http://www.onc.osaka-u.ac.jp/index.html>

時間：平成17年1月10日13:00～平成17年1月11日17:00

出席者：Charles Patrick Reynolds、Hiroyuki Shimada、檜山英三、杉本徹、家原知子、林富、福澤正洋、米田光宏、大瀧慈、宮原裕夫、田尻達郎、山岡裕明、澤田淳、中山雅弘、成瀬浩、鈴木恵美子、西基、花井潤師、小田辺なお子、石山洋、沼田公介、金子安比古、浜崎豊、秦順一、田中丈夫、檜山桂子、原田正平、竹内浩視、井上雅美、竹島清美、堀川洋子、福士勝、堀越泰雄、大平美紀、長谷川朝美、以上35名

前向き介入研究議事録：マス・スクリーニングの実施時期変更の検討と評価

2005 proposal for prospective study group

By Hiyama

1) Timing of mass-screening test: In previous meetings, it has reached consensus to perform mass-screening test before 18-month-old. However, there is no evidence to decide the most suitable timing of mass-screening between 12 and 18 months old in the world.

実施時期の検討： 1歳6ヶ月までに行うべきとのコンセンサスは得られているが、それ以前の1才から1才6ヶ月の間でどの時期が適切かの最終結果は得られていない。

Now, the mass-screening programs in elder children have already been started at 14 (Sapporo) and 18 (Osaka & Kyoto) months old. It is difficult to make the timing of screening common in these districts. It will be better the mass-screening group receiving at 12-18 months old with non-receiving groups.

ただし、既に1才2ヶ月（札幌）、1才6ヶ月（京都・大阪）にて施行を開始した地域が存在するために、今後これらを無理に一本化することは難しい。そこで、ある意味で1才から1才6ヶ月でスクリーニングを行った群とそれに対する対照群とコホートの方が実際には好都合かもしれない。

There are three choices at present

1. Study design to decide the timing of screening

This is scientifically reasonable but requires more than several hundred-thousand children for cohort study and several times of testing

2. Study to evaluate mass-screening for children within 14 and 18 months of age

This is easy to perform but scientifically qualified result is not guaranteed. This timing will practically distribute between 13 and 19 months, and this study is difficult to decide the preferable timing of mass-screening. If the significance is obtained in this study, next study to decide preferable timing is needed.

3. Study to evaluate mass-screening in the restricted districts where it is performed at 18 months of age

This is the most recommended study. This study with the population size as the much as that in Quebec study is preferable.

It is possible to launch two independent studies conducting mass-screening at 14-month-old and 18-month-old. But sample size in each study is the most critical problem.

いつの時点でスクリーニングすればよいのかのエビデンスは、世界的にも確立されていないと思います。そうすると、この時点で考えられる選択肢は以下ようになります。

1. スクリーニング時期を決定する研究でデザインを組む
科学的には合理的かもしれませんが、数十万例のコホートを作り、健常時点からのサンプルを定期的に収集しないと確証的なエビデンスは得られないと思います。
2. 1歳2ヶ月から1歳6ヶ月の幅を持たせて症例を集積しスクリーニングの有用性を検証する
現実的で各自自治体が受け入れやすい方法ですが、科学的な結果が得られるかどうか疑問です。実際にはスクリーニング実施月のプラスマイナス1ヶ月ぐらいの誤差で検体を提出してきますので、1年1ヶ月から1年7月のデータを集積することになります。この方法では、有意さが出ても、次に時期を決定するための研究を新たに始める必要がある。
3. 1歳6ヶ月にて実施している地域に限定したスクリーニングを行い、スクリーニングの有用性を検証する。
この案をケベックスタディと同程度以上のスタディを行うことを提案します。それでも有用性が得られるようであれば、1歳6ヶ月で10年後もいけばよいと思います。もし、有用性が否定されたならば、10年後に1歳2ヶ月に引き下げるプロジェクトを開始してもよいと思います。要するに、結論の白黒が他に比べてはつきりつくところがこの研究の利点である。

1歳2ヶ月スクリーニングと1歳6ヶ月スクリーニングの2つを同時スタートさせて、ケベックスタディを再現するという方法も考えられます。サンプルサイズの問題が最大のネックになる。

これらに対し、両者のメリットとデメリットが討議され、1点で行ってもある程度受診日には幅がでるために、14ヶ月から18ヶ月に広く行い、その副次的解析としてどの時点が最適化をも検討するスタディが提唱されたが、休止に至った経緯が過剰診断であったことから、札幌の14ヶ月のデータでもかなり過剰診断が存在することが示され、18ヶ月で行う妥当性が示されたと結論された。

また、既に黒田班の林先生の解析で6ヶ月マススクリーニングの有効性が報告されたようにある程度の対象人口を解析すれば、有用性は証明できる。しかし、コストベネフィットの問題は解決していないのでそれについての検討が必要との意見で一致し、欠席であった赤澤先生に依頼することとなった。

2) Selection of mass-screening population and control population

Decision of study period

実施地域・対照地域、実施期間の選定

Now, mass-screening is performed in Sapporo City, Kyoto prefecture (expect Kyoto City) and Osaka prefecture (expect Osaka city). It is also tried in Niigata prefecture and Kawasaki City with charge. Sizuoka prefecture is discussing to start MS program at 2006.

現在、札幌市、京都府（京都市を除く）、大阪府（大阪市のぞく）がスタートし、新潟県、川崎市が有料で施行している。静岡県は18年度から開始の方向で検討中。

We are now calculating the sample size from data presented by Dr. Nishi at Oct. 3, 2004, with an assumption that the overall mortality rate for 10 years be 2 in 100,000 MS-receiving population and 5 in 100,000 non-receiving population, with 5% of the significance and 90% of detection power. When the detection power is supposed as 80%, sample size in each group needs more than 650,000. Thus, we must considered when the mass-screening receiving population reach to 700,000, which decide the period to be investigated. As shown in Quebec study, the prefectures where mass-screening is not performed may become the control population.

西先生が10月3日の班会議に出されました資料でサンプルサイズの推定(受検群の10年間累積死亡率は10万人対2、未受検群のそれは10万人対5と仮定、有意水準5%、検出力90%の検定を実施することを仮定)を行っております。西先生の計算結果は、検出力を90%の場合、1群80万人と推定しておられますが、検出力を80%に設定して計算しますと（臨床試験や疫学研究では80%でも許容範囲と考えます）、1群あたり65万人となります。マスキリーニング実施自治体で採取できる総数が70万人に達するのにどれくらいかかるかが問題となります。

ケベックスタディのように未実施の自治体をコントロール群とすることも可能です。そうすれば、コントロール群の70万人の集積も可能となります。

Is the size of MS-receiving population enough for prospective study?

対象人口は充分か？

The periods to reach the size of Quebec study (500,000) are as follows:

Sapporo, Kyoto, & Osaka: 6 years

Added with Kawasaki, Niigata, Sizuoka: 3-4 years

Added with other possible prefectures: 2 years

Neuroblastoma cases detected in these populations should be followed up for more than 5 years

ケベックの解析数（50万人）に至るまでは、出生数から換算すると、現在施行中の地域では6年、川崎、新潟、静岡を加えても3-4年、その他さらに可能性のある地域を加えれば2年以内に達成可能となる。これらの症例を5年間は追跡することになる。

Birth babies

| Prefecture | Birth a year | Neuroblastoma cases (1/7000 birth) |
|------------------------------|--------------|------------------------------------|
| Sapporo City | 15000 | |
| Kyoto (excluding Kyoto City) | 11000 | |
| Osaka (excluding Osaka City) | 63000 | |
| (subtotal) | 89000 | 12.7 |
| Kawasaki City | 13000 | |
| Niigata | 21000 | |
| Sizuoka | 35000 | |
| (Subtotal) | 158000 | 22.6 |
| Kanagawa | 69000 | |
| Aich | 74000 | |
| Hiroshima | 27000 | |
| Total | 328000 | 46.8 |

目的によって対照と対象人口を選定することが重要との意見で一致した。

1. マスキリーニング未実施地域との比較
2. 6ヶ月マスキリーニング施行時期と比較:すでに、6ヶ月マスキリーニングの有効性は証明されている（死亡率10万人対マス受診群0.234 / 非受診群0.84）のであるから、過剰診断の程度を比較する。当然、臨床的にも予後良好な神経芽腫は見つかるのだから、治療不要な腫瘍発見を0にする必要はない。
3. 受検日の違いによる検討も行えれば行う。
4. マスキリーニング検討地域として化血研が検討中であり、熊本県にも施行可能性があり、打診して、スタディへの参加を要請する。

3) Mass-screening system 実施方法

- ① Cut-off value カットオフ値の設定・標準化
- ② Accuracy management 精度管理

Sapporo, Kyoto : VMA, HVA and creatinine in spotted urine on the filter paper are measured using HPLC (High-performance liquid chromatography).

札幌・京都：ろ紙尿によるHPLCによるVMA,HVA,クレアチニン測定

Kyoto's proposal : Accuracy management should be performed in each group. At first, as performed in 6-month-old infants' mass-screening, the top 1% cases in the levels of urinary in each group should be examined in detail. After the MS-received cases reach to more than 1000, positive cases are defined when their urinary VMA or HVA showed higher than mean + 2.5 SD. Then, accuracy management will be checked by Dr. Naruse and/or the measuring institution.

京都案：最終的に精度管理はグループ内で行うが、それまでは6か月時と同様、1%の高値例を再検とし精査にまわす。1000例まではこの方式に従い、その後 $M+2.5SD$ （平均値M、標準偏差SD）を高値として陽性と判断する。その後、外部精度管理を成瀬先生や測定施設とで行ってもらおう。

Osaka: VMA, HVA and creatinine in raw urine are measured using HPLC.

大阪府：生尿によるHPLCによるVMA,HVA,クレアチニン測定

Is there any bias to measure the urinary levels of VMA, HVA and creatinine between spotted urine and raw urine?

これらの検査での、カットオフ値の設定、測定誤差などのデータを提示してください。

採取法の違いによるバイアスはありませんか？

採取法の違いによるバイアスはあまりないと考えられる。

HPLCの検査への習熟度によるバイアスが大きいので、精度管理が重要であり、LC-MSなどの導入による管理も必要である。

③ Database in measurement center 検査センターでのデータベース化

The information items for MS-receiving children

受検者の特定のために、次のデータ項目を登録します。

- ① 氏名（漢字、カナ） Name
- ② 性別 Gender
- ③ 生年月日 Birth date
- ④ 住所（カナ） Address
- ⑤ 検査実施日 Date of measurement
- ⑥ 検体採取日 Date of sampling
- ⑦ 検査結果（VMA、HVA、クレアチニン値）
Laboratory Data (VMA, HVA, Creatinine)

④ Strategy of diagnosis for MS-positive cases 陽性例の診断法

To keep quality of diagnosis, diagnosis of neuroblastoma in MS-positive cases should be performed in restricted institution in each district.

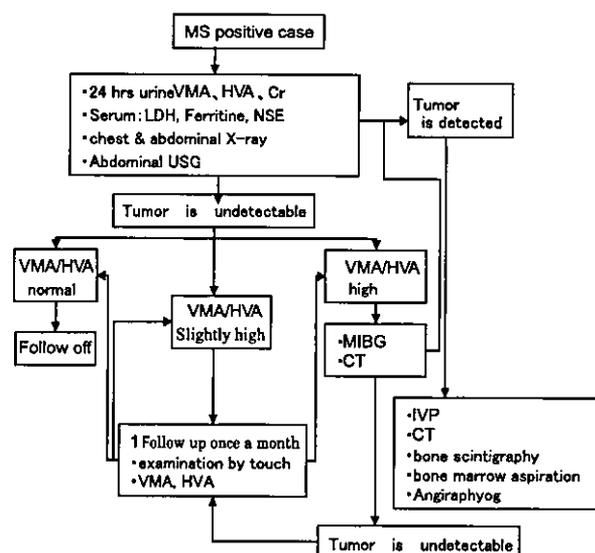
診断の質を保つために、MS陽性例の診断は、各地区とも限られた診療施設で行うべきと思います。

地域により、施設を限定し、同一レベルで陽性者の診断を行う。

治療介入は、全例に行うことを原則とし、無治療経過観察はしないことのICを診断前に行う。

Strategies for neuroblastoma diagnosis using mass-screening system

診断手順



⑤ Informend consent & ethical problems インフォームドコンセントと倫理的問題

In Osaka prefecture, the IC form has been already prepared.

大阪府では、ICの用紙は既に作成されています。

Kyoto: IC is important, because this study is research project with administrative support. It should be stated that the data will be used in future study when neuroblastoma is detected with sufficient consideration for their privacy.

京都：行政による援助を受けるが、研究の実施であることから十分にICを行うこと。NBが発見・診断されたときには、そのデータを今後の研究の発展に利用する事を明記すること。ただし、診断例でも個人が特定できないことへの十分な配慮をすること。

Managements for ethical problems may be different in each district. Approval by Ethical committees in Scientific Society and University fulfills the social responsibility. It is necessary to respect the law for the protection of individual information.

各自治体によって対応が異なってくると思います。研究班としては、学会ならびに大学の倫理審査委員会の承認を得る手続きを取れば、社会的責任は果たせると思います。個人情報保護法を意識する必要もありません。

4) 登録・集計・解析方法 Registration and Analysis

登録・集計は、JNBGSにおけるデータセンターに依頼し、全数登録から我々の研究班で必要となるデータを収集し、解析する体制づくりを推進することで一致した。詳細の登録項目、追跡調査項目等は以下のごとくで、問題点は指摘されてなかったが、中央病理診断と腫瘍特性解析のデータを正しく評価し、リンクさせることが重要との意見で一致した。

① Information items as follows should be obtained at registration of neuroblastoma cases:

1. Age, gender, birth day, and address
2. INSS staging classification
3. Primary site

4. Pathological classification (INPS)
5. Serum levels of LDH, NSE, Ferritin, urinary levels of VMA and HVA
6. N-myc, DNA ploidy, trk expression
7. biological data for the decision of treatment

収集されるべきデータ項目としては、以下のものを考えています。

1. 年齢、性別、生年月日、現住所などの基本情報
2. INSS基準でのステージ分類、
3. 原発部位
4. 病理分類
5. LDH、NSE、フェリチン、カテコラミン代謝産物、
6. N-myc、DNA ploidy、trk 遺伝子発現
7. 治療プロトコールに基づく生物学的データ

② Follow-up Survey 追跡調査

Electrical data including the list of MS-target cases and mass screened cases should be obtained from each prefecture.

Neuroblastoma case is registered from all over Japan when tumor is detected by close examination. All neuroblastomas including non-screened cases should be registered. Other available registration system should be used.

対象データとして、検査事業主体（自治体）から、MS受検資格者リストと受検例リストを、電子媒体で作成したものを提供いただければベストです。

神経芽腫症例の登録は、①全国の神経芽細胞腫の受け入れ診療機関において、精密検査で神経芽腫と判明した場合には、「小児神経芽細胞腫登録書（仮称）」に必要事項を記入してデータセンターに届け出ることを義務化する、②MS以外で発見された例についても登録を義務化する、③小児慢性特定疾患事業の登録症例データを利用する、④人口動態統計（死亡統計）のデータを利用する、⑤日本小児外科学会の登録症例データを利用する、の方法で行います。

対象データに疎漏がなければ、転入・転出の問題はある程度解決できるものと思います。実際の転入・転出の追跡は住民票を照会することによって行います。

To identify whether the registered case has been

screened or not is as follows:

1. The cases whose age is before the MS-targeting age are considered to be as non-screened.
2. The cases whose age is after the MS-targeting age should be referred in the list of MS-received cases obtained from the prefectures.
3. When there are no matching cases, this case is considered to be a non-screened case.
4. When there are more than 2 matching cases, address or other precise information should be used to identify the individual.
5. "Screened" or "non-screened" information written in the registration form is accepted after its reliability is examined.

具体的に、登録症例が MS 受験者かどうかの確認作業は下記のように行います。

1. MS 実施月齢前の発症の場合、その症例は MS 受検なしとする。
2. MS 実施月齢後の発症の場合、対象自治体データすべての MS 受験者リストとマッチングをする。キー項目は氏名、性別、生年月日である。
3. 2. でのマッチング件数が 0 の場合、MS 未受検例とする。
4. 2. でのマッチング件数が 2 件以上ある場合、登録書の内容を精査の上、住所などで MS 受験者であることを特定する。
5. 登録書で「MS 受検あり」のある場合には、その記載の信頼性を精査した上で、採用する。

③ Statistical Analysis 統計的に解析する際の方法、指標

1. the MS receiving rate
 2. Follow-up period
 3. Follow-up rate
 4. Logistic figure of the rate of neuroblastoma detection
 5. Person-year in each age
 6. SIR and 95% confidence Interval
- 統計学的な解析としては、以下の指標を用います。
1. 受診率
 2. フォローアップ期間
 3. フォローアップ率
 4. 発見率を示す Logistics 図
 5. 年齢別人・年
 6. SIR とその 95% 信頼区間（年齢別、Stage 別など、

日本全国での 1 歳における罹患率を基準とする)

5) Treatment protocol for MS-detected cases 発見例の治療指針

MS-detected cases should be diagnosed by restricted pediatric oncologists in restricted hospitals. IC for treatment should be performed also by these doctors. The treatment protocols should be standardized. Kyoto's proposal is the use of the Japanese Infant Neuroblastoma protocol. Is this enough to treat the tumors diagnosed at elder age (18 months old) than infants?

It is necessary to obtain all treatment information including surgery, chemotherapy, radiation therapy, and others in each patient.

MS 陽性例の診断を限られた施設と医師とで行うこととし、治療介入のインフォームドコンセントについても、診断をつけたこれらの施設・医師が行うこととします。治療プロトコルは標準化することがのぞましい。京都案では、乳児神経芽腫プロトコルを用いることになっていますが、これで 18 ヶ月の症例の治療に充分ですか？したがって、外科治療、化学療法、放射線療法など、治療方法の詳細についてもデータを取る必要があります。

1 歳 6 ヶ月で行ったマススクリーニング陽性例の治療指針は、はっきりとしたエビデンスはない。ただ、マススクリーニング非施行地域との治療方法の違いによるバイアスがかからないように、治療方針の統一化が必要と考えられた。本年度の大阪の 1 歳 6 ヶ月マススクリーニングでの発見例 2 例が照会され、進行例で通常の進行神経芽腫治療を行い、経過観察中であることが報告された。

研究成果発表

《前向き研究について》

班会議開催にあたって

檜山英三（広島大学 自然科学研究支援開発センター）

1. 受験月例別の受験者数の分布
西 基（北海道医療大学生命基礎科学講座）
2. 札幌市の 1 歳 2 ヶ月児の神経芽細胞腫スクリーニング

花井潤師（札幌市衛生研究所）、
藤田晃三、西 基、飯塚 進、内藤春彦

3. 前向きグループで、1歳6ヶ月スクリーニングについての
のコンセンサス

澤田 淳（京都第二赤十字病院）、
家原知子、杉本 徹、沼田公介、松村淳子

4. 大阪府における1歳半スクリーニングの試行の結果
中山雅弘（大阪府立母子保健総合医療センター）

5. 日本のマスキリーニングの精度管理の方針と歴史
成瀬 浩・鈴木恵美子
（（財）日本公衆衛生協会スクリーニング精度管理センター）、
辻 章夫

後向き解析グループ議事録

目的：1979年から小児外科学会悪性腫瘍委員会に登録されている神経芽腫群症例5100例（うちマス発見例2494例）を中心に、小児がん学会神経芽腫委員会の登録データも加えて解析する。これらのうち追跡調査を行いえた症例について、死亡例を死亡票と照らし合わせ、死亡統計から得られる神経芽腫による死亡数から各年度の登録率、を算定し、統計学的処理にてマスによる死亡数の減少効果を算定する。発見症例の増加率、それらの医療、予後、合併症も検討し、コストベネフィットからのマスの効果を可能な限り後ろ向きに評価する。

一方、これらの結果から、平成16年度以降、マス休止に伴う神経芽腫の発生動向を推定するとともに、登録率、登録症例の質ともに良好な地域を選別し、前向き研究の材料とする。一方、米国との同時期、同程度の治療での成績と比較し、16年度中には、後ろ向きの疫学調査をほぼ終了し、公表する。また、マスで発見される腫瘍のどの程度が治療が必要な腫瘍であったかを検討し、マス休止後の神経芽細胞腫の発生状況をシミュレーションし、実際の発生動向と比較検討する。これらにも、疫学、統計学グループによる詳細な検討を加える。

16年度経過報告

1. 小児外科学会登録症例の集計

- 1) 1981-1997年症例の解析：年次登録3407例（うちマス例1537例）

5年追跡調査例2600例（マス例1,000例）の解析

- 2) 1991-1997年症例の解析：年次登録1,816例（うちマス例1270例）

5年追跡調査例1100例（マス例700例）の解析

16年度施行

Biologyからみたリスク分類の再調査

INPC, INSS分類と予後の再調査

2. 小児がん学会神経芽腫委員会マスキリーニング発見登録例との照合

- 1) 1981-1997年症例の解析（1771例）

厚生労働省発表 2124例

- 2) 1991-1997年症例の解析（1320例）

厚生労働省発表 1677例

3. 死亡票との照合による登録症例の検討

厚生労働省大臣官房統計情報部 企画課 審査解析室から、厚生労働省・総務省調査所管課の事前審査中（3-4月頃の許可の見込み）

- 1) 登録率の把握

- 2) 登録率の良い地域選別

登録率の高い地域の選定を行い、人口単位の罹患率、死亡率の推移を検討する。

4. 病理所見の検討

マスキリーニング陽性例10例以上を経験した施設に連絡し、腫瘍の病理標本の送付を依頼

Retrospectiveな中央病理診断（浜崎先生、嶋田先生に依頼し検討中）

17年度計画

【 目 標 】

- (1) 後ろ向き研究によるマスキリーニングの効果判定

- (2) マス休止後の神経芽腫発症の動向の推定

- (3) Favorable腫瘍, unfavorable腫瘍の動態把握

- ① 治療が最小限ですむ腫瘍の選別のガイドライン作成

- ② リスク分類への提言

- (4) 前向き研究への示唆

- ① 登録率の良い地域の選定

- ② マスキリーニングの施行時期へのエビデンス

ス

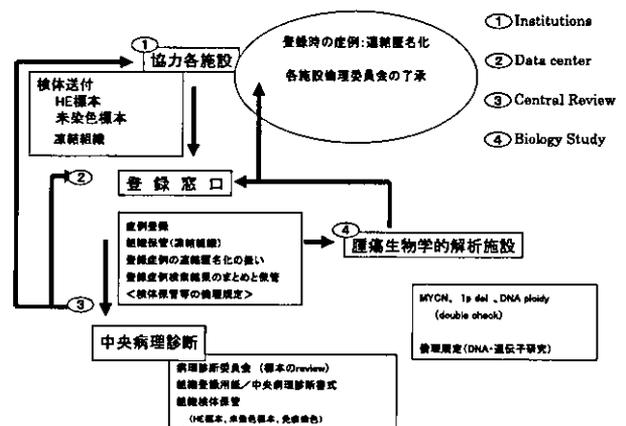
【解析方法】

- (1) 月例別発症数からみた神経芽腫の発症機構の推定
高・中・低リスク別の神経芽腫の発症頻度
 - ① 病理所見からの検証
浜崎先生の結果からリスク分類する。また、これらのまとめを秦先生・嶋田先生と協議し、マススクリーニング例の病理所見をまとめる
 - ② 腫瘍特性からの検証
腫瘍解析グループとの連携
- (2) 同時期出生の臨床発見例の分布
 - ① 特に1-2歳児の病期、タイプ別の発生頻度
 - ② 米国、欧州、アジア諸国との発症例の分布と比較
- (3) マススクリーニング休止後の発症数を推定と検討
 - ① 休止後の発症数を推定
 - ② 発症数の把握
 - ③ Favorable 腫瘍の動態から、1歳前後で発見されてくるこの種の腫瘍を推定、検証

研究成果発表

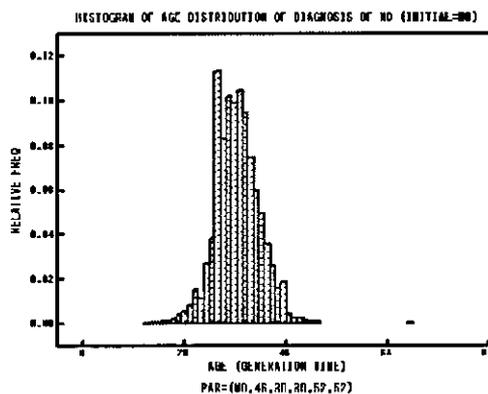
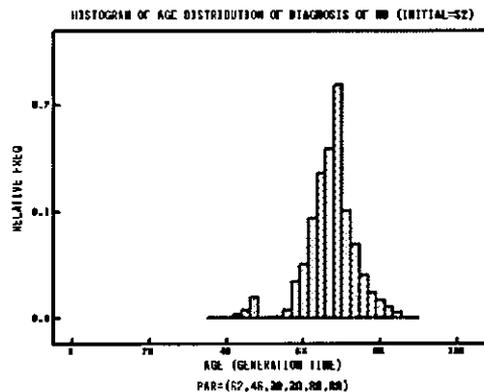
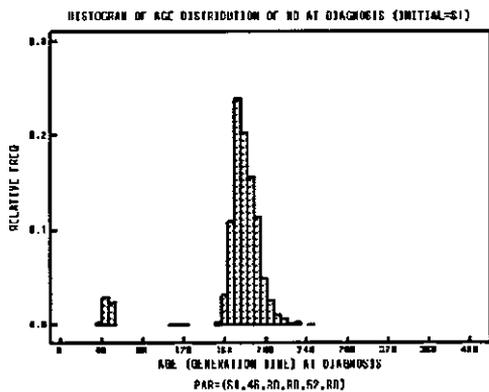
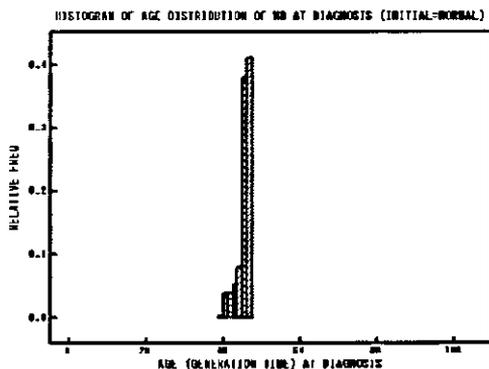
1. 神経芽腫の組織型とその年齢分布
浜崎 豊 (静岡県立こども病院)
2. Age-Distribution of Neuroblastoma and Its Mathematical Mode
大瀧 慈 (広島大学原医研計量生物研究分野)
3. 神経芽腫マススクリーニング休止後に予想される臨床像の変化
米田光宏 (大阪大学小児外科)、
草深竹志、福澤正洋、原 純一、
(大阪府立母子保健総合医療センター)
tumor board、大植孝治、窪田昭男、
井上雅美、河 敬世、中山雅弘
4. 神経芽腫マススクリーニングのターゲットは？
家原知子 (京都府立医科大学)、杉本 徹、澤田 淳
議事録

1. COGのデータでは過去20年間でLow Risk39.7%、High Risk 42%、残りがIntermediate Riskである。予後は、Low Riskは手術のみ、Intermediate Riskは手術と化学療法を行い、90%以上の生存に対して、High Riskは幹細胞移植などを組み合わせた治療でも30%以下である。High Risk症例の治療に重点をおいている。
2. 浜崎分担者からの組織分類からの解析(4施設、533例)の検討から、マススクリーニング開始後の神経節腫が有意に減少したことが報告され、分化成熟する腫瘍が早期発見されていることが示された。無治療経過観察症例の後日切除標本の病理所見から年齢と分化成熟が示された。これらから、組織学的にマススクリーニング発見の分化、退縮する腫瘍と予後不良な腫瘍、臨床で発見される予後良好な腫瘍・不良な腫瘍の年齢別頻度が示された。また、中央病理診断の方法、項目さらに登録と腫瘍特性解析との関連の組織図が提案された(図)。これに対し、組織学的に分化と退縮することを分けるマーカーがないことが示された。また、原発巣が退縮したのちに骨転移として発症した症例が報告された。病理所見が臨床データの解析や腫瘍解析さらにパンキングには必須であり、組織所見の確認されていないものは、解析することに疑問が投げかけられた。組織学的確認のある症例だけを検討、あるいはパンキングすることができれば、それが好ましいことが確認された。



3. 瀧分担研究者からの、統計学的解析データが示された。小児外科学会の登録データを解析した結果から、Mathematical Modelによって仮説の基に解析された。癌遺伝子(M)、癌抑制遺伝子(S)、分化(D)へのスイッチの3因子の想定のもと解析され、出生直後には良性

と考えられる腫瘍が発生し、その後、Sのうち一方が機能していない症例（S1）では、一旦生後良性腫瘍が発生した後、360世代ぐらいから悪性腫瘍が発生する。Sのうち両方が機能していない症例（S2）では生直後に加え、60-80分裂あたりで悪性腫瘍が発生することが示された。癌遺伝子（M）も異常が出生までに腫瘍が発生し、多くは出生しない。あくまでも、細胞の有限分裂回数は46と仮定されたシミュレーションではあるが、一回の分裂が1週間とかんがえるとかなり現実に近いことが確認された。神経芽細胞腫は家族性のもは希であるが、germ lineの細胞に異常を来していることを示唆しており、こうした観点からの解析の重要性が示唆された。



4. 大阪大学から、神経芽腫マスキリング休止後に予想される臨床像の変化について報告された。1985-2003年の間にマスキリング発見例100例を後方解析し、臨床で発見され得なかった53例、臨床で発見され得た19例、分別不可能28例に分類された。臨床で発見されうる症例の多くはtype 2A/2B例で、これらが今後進行神経芽腫として発見されてことが示唆された。他の研究でも同様の傾向であること報告された。
5. 京都府立大学から、乳児神経芽腫プルトコールで治療された症例の検討から、MYCN増幅と嶋田分類が予後因子として有用との結果であった。MYCN増幅のあった症例をマスキリング発見例と臨床発見例と比較検討され、マスキリング発見例が予後良好であること、臨床発見例の中にマスキリング陰性例が5例認められた。予後は、マスキリング発見例の法が良好であった。今後、18ヶ月マスキリングでのターゲットとなる腫瘍群はtype 2であることが確認された。

以上の研究と討論から、マスキリングの結果、多くの得べき知見が山積みされており、これらを解析し、世界に発信すべきであることは指示された。

そこで、現在、後ろ向きにまず、病理のスライド標本を収集し、中央病理診断にて神経芽腫の確認と、それらの組織分類を行うことが、クオリティを上げる意味で重要であると考えられ、1985年から10例以上の報告のある施設に、スライド標本の貸し出しを依頼し、病理所見を浜崎先生を中心に検討することとした。嶋田教授にサポートしていただくことを依頼した結果、快く了承された。

腫瘍特性の解析結果を収集し、リスク分類をすることで、統計的、病理組織的に検討された神経芽細胞腫の内部構成とそれぞれの自然歴がより明らかになるとの合意から、腫瘍特性の解析結果の収集も精力的に行うことで合意した。

神経芽細胞腫の腫瘍特性解析議事録

目的：現在、神経芽細胞腫は、腫瘍特性と病期、組織分類、年齢因子などからリスク分類され、治療法を選択する時代となっており、リスク分類を統一化する方向に進んでいる。マスで発見される腫瘍のどの程度が治療が必要な腫瘍であったかを検討し、また、逆に治療が軽減できる腫瘍をマスキリング発見腫瘍の検討から抽出し、それらの腫瘍特性を検討することは、リスク分類に対し、きわめて有用なエビデンスとなる。そこで、マスキリング発見例とさらに同時期の臨床発見例の生物学的特性と組織分類から、腫瘍のリスク分類を行い、神経芽細胞腫を構成する腫瘍群とその自然歴を明らかにし、リスク分類や治療法選択に有用なエビデンスを提供し、さらには臨床の場で有用なリスク分類の指標を明らかにする。

対象と解析方法

1. 既存の予後因子の解析とその解析法

MYCN増幅, 1p loss, DNA ploidy, 17q gain, 11q loss, TrkA, Ha-ras 発現、テロメラーゼの活性化が予後に関連する因子としてあげられているが、マスキリング症例とそれ以外の症例でどの程度これらの因子に異常が検出されるのかを多くの症例で集積し検討する。

1) MYCN増幅：

MYCNのコピー数と特性解析

マス陽性例中でMYCN増幅例の検討

2) 1p loss, 11q loss, 17q gain：これらの異常の検出法と意義の検討

FISH法

Microsatellite marker

CGH法

Array-based CGH法

SNPs array

3) DNA ploidy: 検出法と意義の検討

Flow cytometry

FISH法

4) 遺伝子発現： Trk A, Ha-ras

Northern 法

RT-PCR

Immunohistochemistry

これらの膨大なデータを整理し、真に神経芽細胞腫のリスク分類に有用なマーカーを決定し、治療成績向上につなげる。

2. 新たなマーカーの検索

1) RASSF1A 遺伝子のメチル化 (金子先生)

2) 血清中のDNA 検索 (杉本先生)

3) 血中・尿中カテコラミン分画などを含めたプロテインマーカー検索 (升島先生)

17年度の計画は、上述の1. と2. の二つに分け、2. の新たなマーカー検索は個々分担研究者にお願いし、成果を出して頂きたいと考えています。

また、1. について、研究班として重点的に解析を進めたいと考えています。来年度にむけて以下のA. B. を計画したいと存じます。

A. 解析済みデータの集積と結合

1) 測定された項目とその結果

2) 測定法と判定基準

3) 臨床データ

これらのデータは、連結不可能匿名化された形でお互いに共有し、臨床データ(年齢、マス受診歴、発見経路、原発部位、病期、病理分類、予後、治療歴など)が確認された材料とする。

これらのデータを各施設から集積し、どのデータが最も予後因子として有用で、どれだけの因子をどうい

方法で判定すべきかの指針を提示することを最終目標とする。

B. Virtual Tumor Bank の立ち上げ

— JNBSG への要望

1) 保存検体の登録

検体の種類と残量を登録する

① 凍結腫瘍検体

1. 原発巣
2. 転移巣
3. 再発巣
4. 治療後切除標本

② 凍結切片

③ 抽出核酸

④ 抽出蛋白

⑤ 血清

⑥ 尿

⑦ 初代培養細胞

⑧ カルノア固定細胞

⑨ 樹立細胞株

⑩ 他

2) 保存検体の使用について

登録された検体に関しては、それを使用する際には、研究計画をあらかじめ審査委員会に提出し、審査後に必要サンプルを各施設から供与していただくこととする。バンキングや審査委員会は、JNBSG に設立をこの研究班として強く要望する。さらに、外部審査委員を嶋田先生など COG にお願いする。

検査法の違い、判定法の違い、検体の種類などでその結果が相反し、予後因子としての重要性が判定できない因子（Ploidy、1pLoss など）があります。17年度はこうした結果の違いを科学的に検証し、最も確実にトランスレーショナルリサーチとして有用な検査法を提示するために、多施設の検体を同一のプラットフォームで検証することを是非行いたいと考えています。（この際、使用する検体は厳密に抽出することが必要。）

解析済みデータとそれぞれの検体の残存検体について、登録票を作成し、解析済みのデータの集積と Virtual Tumor Bank への参加の意志を頂くことからはじめた。すでに、昨年のアンケートでは、検体供与に賛同して頂いた施設

が大多数であり、Virtual Tumor Bank の立ち上げは可能と考えられた。

今回、腫瘍解析データの有無と凍結腫瘍の保存状況についてアンケートを行った。回答が得られた 10 施設からは、1196 症例（マスキリーニング症例 716 例）のデータが保存されており、さらに 1025 症例の凍結保存検体が存在していることが明らかになった。倫理審査の問題はあるが、これらを検討対象として研究を進める予定である。

研究成果発表

1. 神経芽腫での血清遊離 DNA を用いた MYCN の測定と再発のマーカーとしての意義

杉本 徹（京都府立医科大学）、
後藤高弘、家原知子、細井 創、澤田 淳

神経芽腫症例 58 症例の血清 200ul から抽出した DNA を、定量の PCR 法によって MYCN 増幅を検討した結果、2 番染色体単腕近位の内部標準に比べ 10 倍以上と以下で分別可能で、診断、治療効果、再発に関して有用なマーカーと考えられた。

腫瘍の MYCN の状態を鋭敏に反映しており、有効な検査法であり、多サンプルでの検証の必要性が示唆され、腫瘍検体のみならず、血清、尿などのサンプルのバンキングの必要性とそれらを用いた解析システムの設立が必要であることが討議された。

2. LC-MS による新規マーカー探索の方針について

長谷川朝美（広島大学大学院医歯薬学総合研究科
分子治療解析・デバイス研究室）、
青木悠里、久保田耕司、升島 努、前田昌子、檜山英三

神経芽細胞腫の新規マーカー探索として、尿中のカテコラミン代謝物の網羅的解析として、蛋白抽出法の検討、さらに血中の低分子マーカーの探索として LC-MS による網羅的解析のための新たな HPLC 注入による除蛋白法、さらに培養細胞上清や血清中の高分子蛋白解析のためのプロテインチップの開発と高分子専用 MALDI-TOF/MS (macromizer) による選択的タンパク質検索法の確立が報告された。

これに対し、神経芽腫細胞が、NSE、VIP など様々な蛋白を産生することは古くから知られており、こうしたマーカー探索は網羅的に蛋白が解析できるプロテ

オームの時代に行うべき研究として、再確認された。

3. マスクリーニング発見神経芽腫の生物学的検討により何が言えるのか？

金子 安比古 (埼玉県立がんセンター)

マスクリーニング発見神経芽腫の初代培養細胞の染色体分析から、1p、11q、17qなどの異常が検出されることを示し、11q、17q異常はリスクとは関連が薄いことを報告した。1p、MYCN増幅などの判定には、染色体数把握の必要性が示された。

これに対し、2-カラーFISHの必要性が討議され、これを生物学的特性の指標とすべきであるということが討議された。MYCNの増幅とgainとの差異についても討議された。サザン法、マイクロサテライト法との整合性を証明し、有用かつ簡便な方法の確立が必要で、染色体分析の標本などのバンキングの必要性が確認された。

4. 腫瘍マーカーからみたマスクリーニング症例の腫瘍解析

田中丈夫 (国立病院機構呉医療センター)

マスクリーニング症例248例を、病期、INPC(Shimada分類)、MYCN増幅、Ha-ras/trk A発現からリスク分類した結果、Low、Intermediate、Highに層別化可能であった。さらに、Low、Intermediateの症例の中のいくつかは臨床的には将来Highリスクになると考えられ、併せて25% HighあるいはHighリスクになる腫瘍が含まれていると結論された。

これに対し、COGではtrk Aは有意な予後因子であるが、MYCN、1p、嶋田分類を加えると有意でなくなったためリスク分類に入れていないことが示された。今後、病理切片から標本をバンキングし、これらの症例の解析の必要性が確認された。

5. マスクリーニング症例のマイクロアレイ解析

大平美紀 (千葉がんセンター生物科学部)、中川原章

神経芽細胞腫株からえられたcDNAを用いた約6000のcDNAマイクロアレイによる神経芽細胞腫臨床検体の層別化が示され、さらにマスクリーニング発見例の特徴が報告された。現在、70遺伝子を用いた簡易アレイの試作と試験が行われていることが紹介され、これもRNAやcDNAなどの核酸のバンキングの必要性を示した。

また、これらの発現を市販のAffymetrix等の発現解

析との相関を取ることで、国内外の多くのデータとの関連が示され、より有効な情報になることが指摘された。

6. SNPsアレイを用いた神経芽腫の特性解析

檜山英三 (広島大学 自然科学研究支援開発センター)

MYCN増幅や1p異常を始め、神経芽細胞腫のゲノム異常を網羅的かつ簡便に検出する目的で、10K、100KのSNPsを同時に測定するSNPsアレイのデータが紹介された。MYCN増幅は、その増幅倍数、増幅領域が明らかになり、また1p欠失などは欠失領域が同定可能で、今後多くの症例の検証が必要であることが示された。

以上の報告から、これらの腫瘍特性の解析には、マスクリーニング発見症例、臨床例を問わず、既に保存されている腫瘍検体、血清、尿、カルノア固定標本などのバンキングが必要で、その制度のもとマスクリーニング症例の後ろ向きな腫瘍特性解析、マーカー検索を行うことが20年にわたりマスクリーニングを続けてきた日本の使命であり、重点的に行うべき研究であることと結論され、来年度にかけてJNBGSにバンキング制度設立に向け倫理性や使用規定などを含めてプロポーザルを行うと共に、精力的に腫瘍特性の情報、解析を行い、日本の財産であるマスクリーニング発見例の腫瘍特性の解析を通じて神経芽細胞腫の病態を探索することが必要であることが確認された。

分 担 研 究 報 告

神経芽細胞腫マス・スクリーニングの効果判定と医療体制に関する研究

スクリーニング発見乳児神経芽細胞腫の臨床像

分担研究者 杉本 徹 京都府立医科大学小児科教授

研究要旨

乳児神経芽腫統一治療プロトコル登録例において、マス発見例と臨床例の比較検討を行った。マス発見例は非マス例に対して、予後不良因子を持つ症例は少なく、その予後も良好であった。さらに、*MYCN*増幅例での比較では、マス例が早期に*MYCN*増幅例を検出しており、その結果、非マス例に比べて予後良好で有ることがわかった。これらの症例はマスのターゲットであると考えられた。

Summary

We compared cases detected by screening and those diagnosed clinically, in the registration cases for Japanese infantile neuroblastoma cooperative study group. The cases detected by screening with the poor prognostic factors is less than cases diagnosed clinically. The cases detected by screening have good prognosis. In cases with *MYCN* amplification, the cases detected by screening are early stages and have good prognosis. It is considered that these cases are target of the screening.

A. 研究目的

乳児期の神経芽腫は予後良好とされており、特にマス・スクリーニング（マス）発見例は予後良好であることが知られている。今回、乳児神経芽腫におけるマス発見例と非マス・スクリーニング発見例（非マス例）の比較検討を行い、その臨床像を明らかにすることにより、マスのターゲットを明確にする。

B. 研究方法

1994年6月より2003年6月末までの9年間に、乳児神経芽腫統一治療プロトコルに登録された636例を対象に検討を行った。

(倫理面への配慮)

乳児神経芽腫統一治療プロトコルに登録の際には、治療後の経過についても検討を加える旨を文章にて親権者の同意を得ている。

C. 研究結果

マス例は525例、非マス例は111例であった。初診時平均月齢は、マス例が7.9か月に対し、非マス例が4.1か月

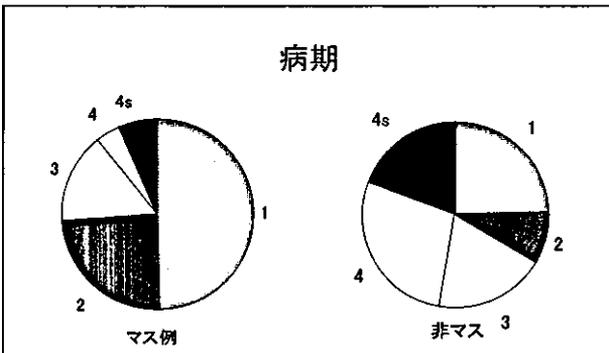
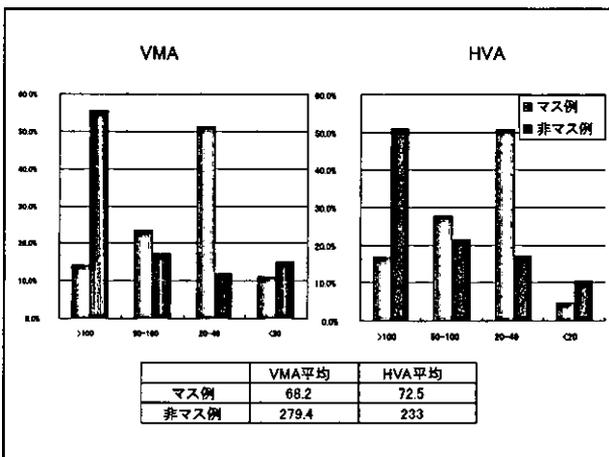
と非マス例の診断時期は早期であった。マス例の病期が1- 49.5%, 2A/2B- 24.1%, 3- 15.5%, 4- 4.2%, 4s- 6.7%に対し、非マス例が1- 24.5%, 2A/2B- 9.1%, 3-19.1%, 4- 28.2%, 4s- 19.1%と進行例の比率が多かった。診断時のVMA/HVAの値は、マス例が68.2/72.5 (μ g/mg・Cr)に対して、非マス例は279.4/233と高値であった。*MYCN*遺伝子増幅10倍以上(3倍以上)の症例は、マス例は1.5%(3.2%)に対し、非マス例は9.7%(15.1%)であった。さらに、*MYCN*遺伝子増幅例の診断時月齢は、マス例がマス時期の6か月前後に集中しているのに対して、非マス例は2か月以前の乳児期早期と9か月以降の後期に集中していた。マス例の*MYCN*遺伝子増幅症例は69.2%が非進行例(病期1,2,4s)で病理組織型は全例がFavorable histologyであったが、非マス例の*MYCN*遺伝子増幅症例は非進行例が30.8%のみであり、Favorable histologyは22.2%にすぎなかった。*MYCN*遺伝子増幅症例の4年無病生存率はマス例が63.3%、非マス例が50.5%とマス例の方が有意に予後良好であった($p=0.01$)。嶋田分類Unfavorable histologyはマス例の1.8%、非マス例の12.5%に認められた。再発、死亡はマス例の4.2%、0.8%に対し、非マス例は7.6%、11.2%と予後不良であった。

D. 考察

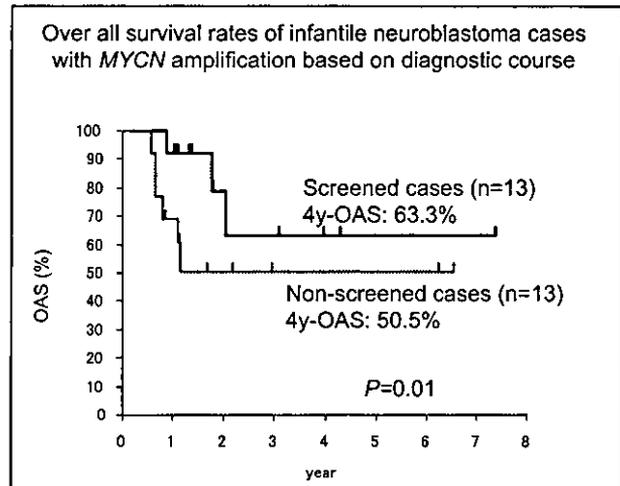
マス発見例は予後不良因子を持つ症例は少なく、その予後も良好であった。また、最も強力な予後不良因子である MYCN 増幅症例での検討では、マス発見例では非マス例に比べて進行例や病理学的に Unfavorable な症例は少なく、その 4 年無病生存率は有意に高かった。これらの症例はマスの早期発見によって良好な予後が得られたと予測され、マスのターゲットであると考えられた。

E. 結論

乳児例におけるマス例と非マス例の比較では、マス例で予後不良因子を持つ症例は少なく、その予後は良好であった。



| | | screened | non-screened |
|---------|-------------|----------|--------------|
| N-myc | >10 | 1.5% | 9.7% |
| | >3 | 3.2% | 15.1% |
| | (-) | 96.8% | 84.9% |
| Shimada | UF | 1.8% | 12.5% |
| | F | 98.2% | 87.5% |
| 1p- | (+) | 4.2% | 7.5% |
| | (-) | 95.8% | 92.5% |
| Ploidy | Diploidy | 26.8% | 25.8% |
| | Tetraploidy | 1.6% | 1.5% |
| | Ane ploidy | 68.1% | 66.7% |
| | Triplody | 3.6% | 6.1% |



F. 参考文献

- 1) 家原知子, 杉本 徹, 水田祥代, 澤田 淳. 乳児神経芽腫における治療の軽減. 小児外科; 第 33 巻 11 号 2001 年
- 2) 家原知子, 細井 創, 長村敏生, 清澤伸幸, 杉本 徹, 澤田 淳. 進行神経芽腫の診断と治療. 京都第二赤十字病院医学雑誌; vol.22.2001 年
- 3) Iehara T, Hamazaki M, Sawada T. Cytogenetic analysis of infantile neuroblastomas by comparative genomic hybridization. Cancer Letter. .178(1) 83-89,2002
- 4) 浜崎 豊, 家原知子, 澤田 淳, 八反田洋一. マスキリーニング発見神経芽腫（乳児神経芽腫）の病理学 Pathology of the infantile neuroblastoma, mostly detected by VMA/HVA mass screening. 小児がん; 第 38 巻第 1 号 .26-30,2001 年
- 5) Tanaka T, Matsumura T, Iehara T, Sawada T and Japanese infantile neuroblastoma cooperative study, risk of unfavorable character among neuroblastomas detected through mass screening. Medical and Pediatric Oncology 35:705-707.2000.
- 6) Tadashi Sawada, Motoi Nishi, Takeo Takeda, Tomoko Iehara, Mass Screening for Neuroblastoma in Japan, Medical and Pediatric Oncology ;31. 429-434 .1998.
- 7) Matsumura T, Sawada T, Shikata T, et al : Management for neuroblastoma infants in Japan. The Korean J Pediatr Hematol / Oncol 4:18-28, 1997.

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Antitumor activity of gefitinib in malignant rhabdoid

- tumor cells in vitro and in vivo. Kuwahara Y, Hosoi H, Osone S, Kita M, Iehara T, Kuroda H, Sugimoto T. Clin Cancer Res. 10 5940-5948 (2004)
- 2) Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells. Osone S, Hosoi H, Kuwahara Y, Matsumoto Y, Iehara T, Sugimoto T. Int J Cancer. 112 219-224, (2004)
 - 3) Translocation(1;22)(p36;q11.2) with concurrent del(22)(q11.2) resulted in homozygous deletion of SNF5/INI1 in a newly established cell line derived from extrarenal rhabdoid tumor. Misawa A, Hosoi H, Imoto I, Iehara T, Sugimoto T, Inazawa J. J Hum Genet .49 :586-589 (2004)
 - 4) 乳児神経芽腫統一治療プロトコルのこれまでと今後, 家原知子. 小児がん 第41巻第1号: 35-38 (2004)
 - 5) 生物学的指標によるマス・スクリーニング発見神経芽腫の腫瘍進展リスクの評価, 田中丈夫, 家原知子, 細井 創, 杉本 徹, 水田祥代, 澤田 淳. 小児がん 第41巻第1号: 76-80. (2004)
 - 6) 神経芽細胞腫マス・スクリーニングの成果と問題点, マス休止にあたり, 文献的考察, 細井 創, 家原知子, 松本良文, 杉本 徹, 澤田 淳. 日本がん検診・診断学会誌 11 68-73 (2004)
 - 7) 神経芽腫の早期発見・治療と子どものQOL: 休止となった神経芽腫マス・スクリーニングの成果と問題点, 杉本 徹, 家原知子, 細井創, 澤田淳. 京母衛誌 第12巻9-12 (2004)
2. 学会発表
- 1) Prediction of *MYCN* amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative PCR
Gotoh T, Hosoi H, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Iehara T, Kuroda H, Sugimoto T
Advances in Neuroblastoma Research, 16th-19th June 2002 (Genova, Italy) (2004)
 - 2) Treatment and prognostic factors of neuroblastoma in under 1-year-old infants in Japan
Sugimoto T, Iehara T, Hosoi H, Hamazaki M, Tanaka T, Tajiri T, Kaneko M, Sawada T
Advances in Neuroblastoma Research, 16th-19th June 2002 (Genova, Italy) (2004)
 - 3) Infantile Dumbbell-type neuroblastoma
Iehara T, Hamazaki M, Tanaka T, Hosoi H, Kaneko M, Sugimoto T, Sawada T
Advances in Neuroblastoma Research, 16th-19th June 2002 (Genova, Italy) (2004)
 - 4) Localized neuroblastoma with *MYCN* amplification in infants. A report of 3 cases
Kikuchi K, Iehara T, Tanda K, Tuji K, Tuchiya K, Hosoi H, Tokiwa K, Iwai N, Sugimoto T
Advances in Neuroblastoma Research, 16th-19th June 2002 (Genova, Italy) (2004)
 - 5) Multivariate evaluation for heterogenous neuroblastomas: the discrimination of progressing risk tumors detected clinically and through infantile mass-screening program
Tanaka T, Iehara T, Sugimoto T, Hamazaki M, Teramukai S, Tsuchida Y, Kaneko M, Sawada T,
Advances in Neuroblastoma Research, 16th-19th June 2002 (Genova, Italy) (2004)
 - 6) Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells
Osone S, Hosoi H, Kuwahara Y, Matsumoto Y, Iehara T, Sugimoo T
Advances in Neuroblastoma Research, 16th-19th June 2002 (Genova, Italy) (2004)

Involvement of reactive oxygen species and caspase activation in apoptosis of a neuroblastoma cell line, NB-39-nu, induced by retinoic acid or fenretinide

Yutaka Hayashi

Department of Pediatric Surgery, Tohoku University School of Medicine

Abstract

Background: In several neuroblastoma cell lines, retinoic acid (RA) can induce apoptosis independently of differentiation, but the precise mechanism(s) remains unknown. NB-39-nu is a human neuroblastoma cell line that has the oncogene *MYCN* amplification and a near-triploid karyotype. In the previous ANR meeting, we presented that, in this cell line, RA not only down-regulated *MYCN* protein, but also induced apoptosis independently of differentiation. **Aims:** In this study, we further investigated if RA or fenretinide(4HPR)-induced apoptosis of this cell line would depend on generation of reactive oxygen species (ROS) or activation of caspases. **Methods:** After cells were cultured for three days in the presence of RA or 4HPR at 5 mM in combination with or without N-acetyl-L-cysteine (NAC), apoptosis was evaluated by measuring the subG1 fraction by PI staining and FACS, and the expression of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and caspases (3, 8 and 9) were examined by Western blot analysis. **Results:** A combination of NAC reduced two-thirds of subG1 fraction in 4HPR-treated cells, while NAC had no effect on that of RA-treated cells. Cells treated with RA or 4HPR showed the cleavage of PARP and activation of caspase-9. Interestingly, caspase-8 was activated in 4HPR-induced apoptosis of NB-39-nu, whereas caspase-8 was not involved in RA-induced apoptosis. **Conclusions:** Although RA or 4HPR-induced apoptosis of NB-39-nu was dependent on effector caspases-3 and -9, its upstream apoptosis pathway in RA-induced apoptosis may be distinct from that induced by 4HPR, in which caspase-8 activation and ROS generation may play indispensable roles.

A. Introduction

Neuroblastoma (NB) is the most common solid tumor of childhood with a marked clinical heterogeneity. Since the majority of patients with NB over 1 year of age develop aggressive disease with dismal outcome despite of current improvements in clinical therapeutics, the previously accumulated observations that NB may spontaneously regress by differentiation and apoptosis have increased considerable interest in Retinoids that can induce both differentiation and apoptosis of NB. Although retinoid therapy for NB has been suggested to be promising through clinical trials with 13-cis-retinoic acid (RA) or fenretinide (N-(4-hydroxyphenyl) retinoid) (4HPR), the precise mechanisms by which 4HPR or RA induces apoptosis of NB have not thoroughly understood.

In experiments with NB cells or cell lines, RA induces a variety of cellular or molecular alterations including growth inhibition with G1 arrest, morphological or biochemical neuronal differentiation, down-regulation of

MYCN expression, apoptosis. Although there have been several reports using NB cell lines that undergo apoptosis predominantly in response to RA, precise molecular mechanisms by which RA induces apoptosis, rather than differentiation, of NB cells remain to be thoroughly understood.

Apoptosis is characterized by a number of features including cellular morphological change, chromatin condensation, DNA fragmentation, and activation of a family of cysteine proteases called caspase. Caspases can be grouped into "apoptotic initiator", such as caspase-8, and "apoptotic effector", such as caspase-3 according to their substrate specificities and target proteins.

There are two independent pathways of caspase activation that converge in the activation of apoptotic effector caspase-3. The first is initiated by ligation of specialized cell-surface death receptors, in which the recruitment of adapter proteins and procaspases, such as caspase-8, results in activation of effectors or downstream caspases. The

second pathway is mediated by the changes in mitochondria and the generation of free radicals. Upon stimulation, cytochrome c is released from mitochondrial membrane to cytosol and binds to Apaf-1, which leads to subsequent autocatalytic activation of procaspase-9 and activation of downstream caspase-3.

Reactive oxygen species (ROS) may play an important role in apoptosis induction, because generated ROS can directly activate the mitochondrial permeability transition, leading to the loss of mitochondrial membrane potential and the promotion of cytochrome c release from mitochondria.

NB-39-nu is a NB cell line that has the oncogene *MYCN* amplification and a unique karyotype with 47,XXY with various abnormality or markers. (Figure 1) As we previously reported, in response to all-trans retinoic acid (RA), NB-39-nu cells undergo apoptosis, but little differentiation, at the cellular level and the *MYCN* expression decreases at the molecular level. (Rikiishi et al. ANR2002) In this study, we investigated whether 4HPR or RA-induced apoptosis of NB-39-nu cells would be dependent on the activation of caspases or the generation of reactive oxygen species.

B. Methods

Materials and NB cell line

All-trans retinoic acid (RA) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis) and 4HPR from Dr. Breitman, NIH, and aliquots of these compounds were stored at -80°C in a lyophilized state. NB-39-nu was kindly provided by Dr. Y. Ishizaka, and cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin and streptomycin at 37°C in air containing 5% CO_2 .

Stimulation with RA or 4HPR and determination of apoptosis

One day after cells (2×10^4) were plated in 6-well culture plates, RA or 4HPR was added into culture at the final concentration of 5 mM and cells were incubated for 3 days. For analyzing the proportion of cells in the sub-G1 fraction, cells were harvested, washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and stained in PBS with 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide (PI) (Molecular Probes) and RNase (0.5 mg/ml). Then, cells were analyzed in a linear scale with a FACscan cytometer (Becton Dickinson) and data were analyzed with CELLQuest software.

Western blot analysis

One day after cells (10^5) were plated, 4HPR or RA was added at concentration of 5 mM. In the course of 3 days incubation, cells were sequentially harvested, washed with cold PBS, and then resuspended in cell lysis buffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl pH 7.4, 2.5 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM NaVO_4 , 1 % Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1 % SDS and protease inhibitor cocktail (Complete, Mini, Roche Diagnostics)) were added. The crude proteins were mixed with 2XSDS sample buffer (125 mmol/L, Tris-HCl pH 6.8, 4% glycerol, 100 mmol/L DTT, 0.02% bromophenol blue) and boiled at 95°C for 5 min. A total of 50 to 80 μg of protein extract was separated by electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat

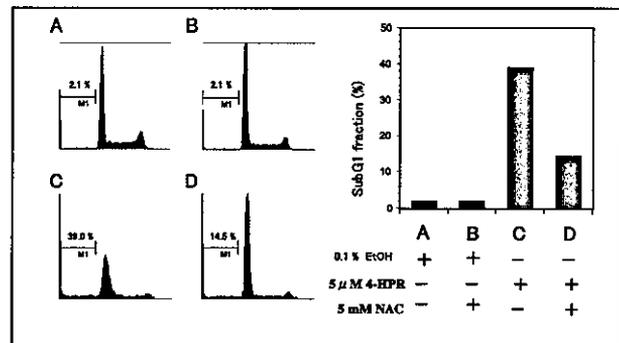


Figure 1. 4HPR-induced apoptosis in the absence or presence of 5 mM NAC (day3)

milk in TBS with 0.5% Tween-20 (TBS-T) for 1 hr and then immunoblotted for 1 hr with rabbit polyclonal antibodies against caspases-3, 9, 8, poly ADP-ribosylase (PARP) and BID (Cell signaling technology) or α -tubulin (Santa Cruz). After incubation with anti-rabbit Ig conjugated with horseradish peroxidase (1:1000), membranes were washed three times for 15 min with TBS-T, proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham) and autoradiography (Kodak).

C. Results

NAC effect on 4HPR- or RA-induced apoptosis.

As shown in Figures 1 and 2, the proportion of subG1 fraction of NB-39-nu cells was increased after 3 days culture up to 39.0% with 4HPR stimulation or 17.3% with RA, respectively, as compared with that in the absence of stimulation (2.1 to 3.4%). We previously confirmed by using TUNEL method that these increases in subG1

fractions were attributed with increased levels of apoptosis. We added 5 mM NAC, an antioxidant, into the culture to study whether the generation of ROS would play important roles in 4HPR or RA-induced apoptosis of NB-39-nu cells. Interestingly, NAC partially inhibited the extent of 4HPR-induced apoptosis (62% inhibition), whereas NAC had no effect on RA-induced apoptosis of NB-39-nu cell.

4HPR or RA induces degradation of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-9

We investigated the cleavage of PARP, which responds to DNA breaks and is used as another hallmarks of apoptosis induced by caspase-3. As shown in Figure 3, the cleavage of PARP was detected in cells treated with either of 4HPR or RA at 5 mM in a time-dependent manner, although the cleaved form of caspase 3 was not detected. The extent of cleavage of PARP was more intense to stimulation with 4HPR than that to RA, which is consistent with the extent of apoptosis induced either by 4HPR or RA. Regarding to caspase-9 that activates caspase-3, the cleaved form of caspase-9 was detected in stimulation with 4HPR and also in RA with lesser extent (Figure 4).

4HPR, but not RA, induces activation of caspase 8

To study whether the activation of initiator caspase would be involved in the apoptosis of NB-39-nu cells induced by 4HPR or RA, we investigated the cleaved form of caspase-8 and BID. As shown in Figure 5, the cleavage of caspase-8 was detected in 5 mM 4HPR-stimulated cells in a time-dependant manner, whereas no cleaved form of caspase-8 was detected in 5 mM RA-stimulated cells. For stimulation with either 4HPR or RA, however, there was no cleavage of BID, which is activated by caspase-8 and induces cytochrome c release from mitochondria after translocation from cytosol to mitochondria.

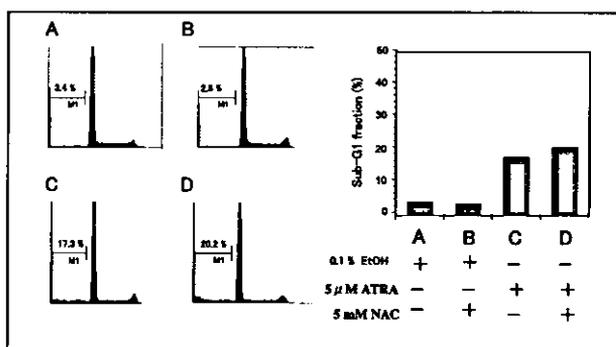


Figure 2. ATRA-induced apoptosis in the absence or presence of 5 mM NAC (day3)

D. Discussion

In the present study, we demonstrated that either 4HPR or RA-treated NB-39-nu cells showed DNA breakage, PARP cleavage and caspase-9 activation. These findings indicated that 4HPR or RA-induced apoptosis of NB-39-nu clearly involved caspase-3 since PARP cleavage was marker of caspase-3 activation and caspase-9, an upstream effector of caspase-3, was activated. Although a slight difference in the extent of PARP cleavage and caspase-9 activation was observed between 4HPR and RA, it is suggested that apoptotic effector caspases may be similarly involved in either 4HPR or RA-induced apoptosis of NB-39-nu cells.

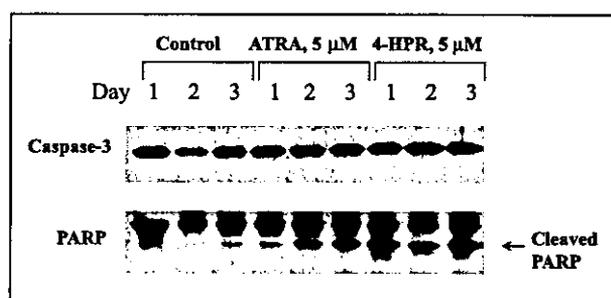


Figure 3. Western analysis of caspase-3 and PARP in NB-39-nu treated with 4HPR or RA at 5 mM

By contrast, there observed marked differences in regard to the activation of caspase-8 and the generation of ROS between 4HPR and RA stimulation. Namely, both of activation of caspase-8 and generation of ROS were detected in 4HPR-induced, but not RA-induced, apoptosis of NB-39-nu cells. Moreover, 4HPR-induced apoptosis was inhibited partly, if not completely, by addition of caspase-8 inhibitor or of an antioxidant, NAC, suggesting that an essential, in part at least, involvement of caspase-8 activation and ROS generation in 4HPR-induced apoptosis of NB-39-nu, whereas neither caspase-8 inhibitor nor NAC had significant effect on RA-induced apoptosis of cells.

In many malignancies including NB, 4HPR induces high

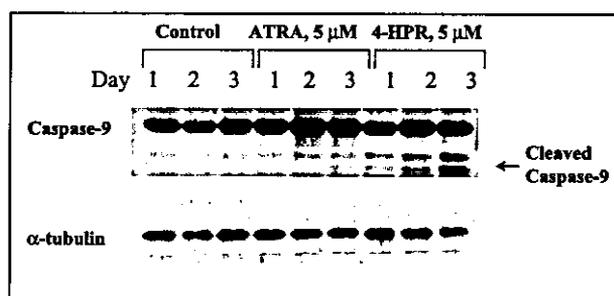


Figure 4. Western analysis of caspase-9 and a-tubulin in NB-39-nu treated with 4HPR or RA at 5 mM