

## 登録症例に基づく神経芽細胞腫マスキューニングの効果判定と医療体制の確立

### I. 「前向き介入研究—マスキューニングの実施時期変更の検討と評価」に関する研究

#### (1) 神経芽細胞腫：適切なスクリーニングの時期はいつ？

分担研究者 澤田 淳 京都第二赤十字病院長

#### 研究要旨

わが国で行われていた6ヶ月乳児を対象にした神経芽細胞腫スクリーニングには、時期の設定に問題があることがわかり、適切な時期の検討を行い、1歳6ヶ月頃までに行うことが望ましいと結論した。

#### Summary

Since 1985, a neuroblastoma screening have carried out to 6-month old infants in Japan. Over 2000 cases were detected earlir and their prognoses were excellent. However, We noticed that many cases of them will be regressed spontaneously later. Therefore, we discussed about the appropriate age for the screening for detection of unfavorable neuroblastoma. We concluded that it is desirable to do it near 18-month old.

澤田 淳 (京都第二赤十字病院長)

家原知子、松本良文、細井 創、杉本 徹 (京都府立  
医科大学小児科)

#### A. 研究目的

わが国では予後不良である神経芽細胞腫 (Neuroblastoma: NB と略) の早期発見を目的として HPLC (高速液体クロマトグラフィー) による尿中 VMA, HVA をマーカーとしたマスキューニング (スと略) が6ヶ月乳児を対象に1988年から行われ、多数の乳児期例が発見された。一方、日本で行われた対象よりもはるかに少ない欧米での検討結果では有効性が証明されなかったことから、本邦のNBスは中断された。今回、効果的な神経芽細胞腫スクリーニングのための時期を探索、決定するための検討を行った。

#### B. 研究方法

当研究班に属するスの実施担当者 (6)、NBの分子生物学 (6) およびNBの病理組織研究者 (2) の合計14名を対象に以下の質問をした。

- ① NBスをやめるべき
- ② マスキューニングを実施するとしたら、何時が適当と考えられますか。
- ③ そのEvidenceを教えてください(項目だけで結構です)。

#### C. 調査結果

回答率は8/14 (57%)

i. 必要性なし 1

必要ある 7.

何時 1歳頃まで 1

12 - 14月 1

12 - 18M 1

18M 4

ii. 根拠

(臨床的所見)

a. 6ヶ月ス発見NB例の予後は極めて良好である (98%)

(NBの予後は強く年齢に依存し、1歳未満は良好)

b. 文献上、生後3ヶ月未満乳児期の研究で高頻度 (1/250) に in situ NBが見られ、その一部が消褪・分化し、一部が癌化していくことが知られているが、いずれの頻度も知られていない。

c. 6ヶ月乳児ス発見例には、この時期でも自然消褪・分化成熟する例がかなりの頻度であると考えられる (高分化組織像、N-Myc増幅の低い頻度)

d. これらのNB例への治療介入は過剰治療に当たる

(分子生物学的特徴)

a. N-Myc増幅の頻度は1歳未満例では極めて稀 (>3copies:4.2%, >10copies:2.9%)

b. H-rasやTrk遺伝子の発現と年齢と予後の関係

（組織所見）

- a. 組織的予後良好群：93.3%、不良群：6.7%
- b. 組織像と年齢の関係：乳児・早期幼児には分化像の多い組織像を示し、幼児期以後には未分化な組織像が多く、年齢 18 ヶ月が予後良・不良の境目（CCSG）

#### D. 考察

2002 年の NEJM に掲載された北米のケベック・ミネソタ<sup>1)</sup>とドイツ・スットガルト<sup>2)</sup>からの 2 論文を基に平成 15 (2003) 年 5 月、厚生労働省は「NB マ・ス検査のあり方に関する検討会」を行い、同 7 月、「現行の生後 6 ヶ月時に実施する NB 検査事業は事業による死亡率減少効果の有無が明確でない一方、自然退縮する例に対して手術などの治療を行うなどの負担をかけており、このまま継続することは難しいと判断される。」と結論し、① NB の罹患と死亡の正確な把握、② NB マスの実施時期の変更等、新たな検査法の検討、評価、③ NB による死亡の減少を目指した、臨床診断と治療に向上のための研究と実施体制の確立、を条件として、一旦休止する報告書<sup>3)</sup>を出した。これに伴い厚生労働科学研究班ができ、主として②の検討を行った。この根拠には、検査精度、システムに問題があると思われたが、規模は小さいが、コホートであった外国論文が基盤をなしていた。わが国での精度の高い HPLC での 16 年間の結果では、a. 5 - 6000 人に 1 例と高頻度に NB が発見され、予後極めて良好であった。b. それらの分子生物学的検討では予後不良因子を伴う例はまれであった。c. 組織像では 95% の例に Schwann 細胞様細胞や繊維組織の増生、腫瘍細胞の部分的消失像や腫瘍細胞の分化、繊維化傾向が見られた。退縮傾向が見られた。d. 日小外学会の NB 登録委員会報告では、ス施行後、1 歳未満例は増加したが、1 歳以後の例の有意な減少はない。早期例の増加に対応する進行例の減少はなかった<sup>4)</sup>。以上より、ス発見例には、不明であるがかなりの数の自然治癒例を含んでいる可能性が高いし、それらの例に対する各種の治療介入には問題があると思われた。一方、1998 年リヨンでの NB マ・ス国際シンポジウムでは、6 ヶ月スの有効性は、死亡例の減少で評価すべきだと結論された。平成 10 (1998) 年度に厚生科学研究「NB スの評価」、続いて「NB のマ・スプログラムの疫学的評価」研究班で全国乳児コホートで生後 6 ヶ月以降の NB 死亡率は HPLC ス受検群では 0.234/10 万人年、未受検群では 0.831/10 万人年で有意差があり、群間の累積死亡数の差は 100 万人年当たり 20 - 30 人と推定された<sup>5)</sup>。この数字が有効性を示しているのか、否か、が話題となった。

NB の予後と年齢の関係は 1970 年代に明瞭されている。

当時の報告では 2 年生存率が 12 ヶ月未満で 72% (48/67), 12-23 ヶ月で 28% (12/47), 24 ヶ月以上で 12% (14/120) で、全例では 32% (75/234) あった<sup>6)</sup>。30 年経過した今日でもなお、2 歳を越えた例は予後不良なことが多い。

年齢と予後の結果から、ス実施の重要な時期は 1 - 2 歳の間であり、2 歳以後に臨床的に発症する NB を早期に発見できる時期として、組織像と予後の結果を加味すると 18 ヶ月頃が適当と思われた。

#### E. 結論

NB スの時期として、6 ヶ月スで得られた結果と文献的考察から、ワンポイントで時期を推奨することは困難で、18 ヶ月前に行うことが望ましいと考える。

#### F. 参考文献

- 1) Woods WG, Gao RN, Shuster IJ et al: Screaming for infants and mortality due to neuroblastoma. N Engl J Med 346:1041-1046, 2002.
- 2) Schilling FH et al: The effect of neuroblastoma screening at one-year of age. N Engl J Med 346:1047-1053, 2002.
- 3) 厚生労働省雇用均等・児童家庭局母子保健課：「神経芽細胞腫マスキリーニング検査のあり方に関する検討会」報告書。平成 16 年 7 月。
- 4) 澤田 淳、家原知子、松本良文ほか：神経芽腫マスキリーニング—過去と現在。—日本のマスキリーニングが示したもの— 小児内科 36：1928 - 1932, 2004.
- 5) 林 邦彦：平成 15 年度厚生労働省科学研究。分担研究報告書。神経芽腫マスキリーニングの疫学的評価。平成 16 年。
- 6) Evans AE, D'Angio, JP, Randolph J: A proposed staging for children with neuroblastoma. Cancer 27:374-378, 1971.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

細井 創、家原知子、松本良文、杉本 徹、澤田 淳：神経芽細胞腫マスキリーニングの成果と問題点—マス休止に当たり、文献的考察—日本がん検診・診断学会誌、11(2)：65-70, 2004.

澤田 淳、家原知子、松本良文ほか：神経芽腫マスキリーニング—過去と現在。—日本のマスキリーニングが示したもの— 小児内科 36：1928 - 1932, 2004

I. 「前向き介入研究—マススクリーニングの実施時期変更の検討と評価」に関する研究 (I) 神経芽細胞腫：適切なスクリーニングの時期はいつ？

田中丈夫、家原知子、細井 創ほか：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。小児がん 第41巻第1号：76-80. 2004

家原知子. 乳児神経芽腫統一治療プロトコルのこれまでと今後, 小児がん 第41巻第1号：35-38 2004

杉本 徹、家原知子、細井 創ほか：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. 京母衛誌 第12巻9-12 2004

2. 学会発表

Tanaka T, Iehara T, Sugimoto T. et al: Multivariate evaluation for heterogenous neuroblastomas: the discrimination of progressing risk tumors detected clinically and through infantile mass-screening program. Advances in Neuroblastoma Research, 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> June 2002 (Genova,Italy) 2004

Sugimoto T, Iehara T, Hosoi et al: Treatment and prognostic factors of neuroblastoma in under 1-year-old infants in Japan. Advances in Neuroblastoma Research, 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> June 2002 (Genova,Italy) 2004

Iehara T, Hamazaki M, Tanaka T et al: Infantile Dumbbell-type neuroblastoma. Advances in Neuroblastoma Research, 16<sup>th</sup>-19<sup>th</sup> June 2002 (Genova,Italy) 2004

## 登録症例に基づく神経芽細胞腫マスキリーニングの効果判定と医療体制の確立

### I. 「前向き介入研究—マスキリーニングの実施時期変更の検討と評価」に関する研究

#### (2) 神経芽細胞腫：京都府における18か月児スクリーニング

分担研究者 澤田 淳 京都第二赤十字病院院長

#### 研究要旨

京都府では6ヶ月乳児の神経芽細胞腫（Neuroblastoma:NBと略）スクリーニング（ス）の休止に伴い、予後不良例を早期に発見するために18ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫スクリーニング（ス）を開始するためのシステムと方式を作成し、開始した。

#### Summary

In Kyoto, screening of neuroblastoma was started to 18-month old children for detection of prognostically unfavorable cases instead of 6-month old infant screening. We presented its system and procedure including informed consent about this screening were shown

澤田 淳（京都第二赤十字病院院長）  
家原知子、松本良文、細井 創、杉本 徹（京都府立  
医科大学小児科）、  
沼田公介（大阪血清微生物研究所）、  
松村淳子（京都府子ども未来室）

値（Cut-off point）は6ヶ月スと同様、 $M + 2SD$ 以上を陽性とし、再検、精査を要請する。なお、開始時のカットオフ値は6か月スと同様、検体の高値側の1%を再検査にまわす。その後、自施設で1000, 3000検体測定ごとに設定し、当初のカットオフとする。なお、内部精度管理は従来どおり自施設で行い、外部精度管理は、今後、当研究班の担当検査センターによって行われることが望まれる。

iii. 検査結果など検査にかかわるデータは検査センターでデータベース化し、保存する。

なお、平成17年4月1日から施行される個人情報保護法に則り、従来と同様、秘守義務には十分な注意が必要である。

#### A. 研究目的

6ヶ月乳児に対するNBスの休止に伴い、6ヶ月スで得られたエビデンスから予後不良例を早期に発見できる可能性の高い18ヶ月児を対象としたスを研究的に実施し、NBスの有効性を明らかにしたい。

#### B. 研究方法

i. 対象は京都市を除く京都府内の18ヶ月児で、府内市町村で実施される乳児後期の健診時にNBスクリーニングセットを配布し、セット内のろ紙上に尿を添加し、乾燥後、検査センターへ郵送する。郵送は生後18ヶ月近辺、できれば18ヶ月までが望ましい。なお、京都市を除く京都府の年間出生数は11,000人で、対照は非ス地域の京都市で、年間出生数は12,000人である。

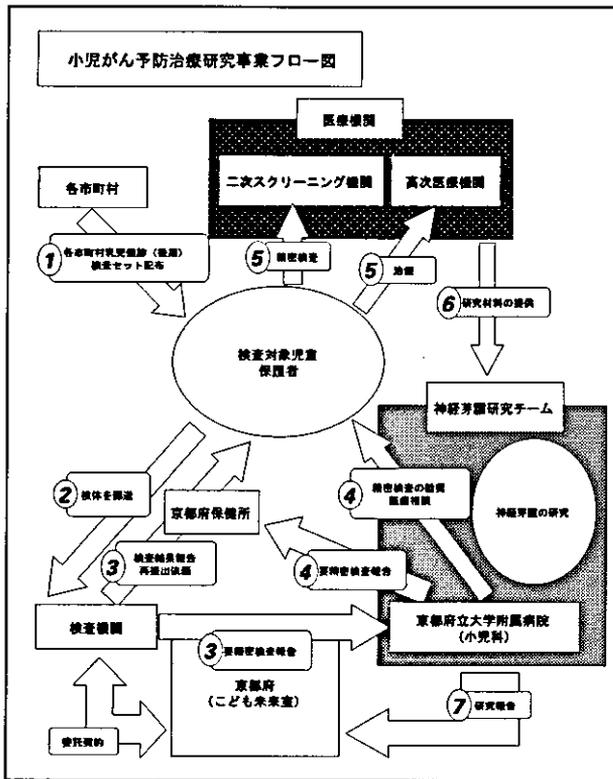
ii. NB腫瘍マーカーは尿中のVMA, HVAとしHPLC法で測定し、結果はクレアチニン当たりで表示する。カットオフ

#### C. 検査実施のシステム（フローチャート）

図1に示した。図内の番号に従って作業を行う。

①各地町村で検査セットを配布（後期乳児健診時）。このスは研究として行うものであることを明記したうえで、セットは本事業の目的、方法、結果の扱いについて十分なインフォームドコンセントを得るための説明書とろ紙、尿添加乾燥ろ紙を入れる封筒、返信用封筒から成り立っている。尿添加乾燥ろ紙を入れる封筒には連絡場所と検査の目的や結果の利用について同意の意思表示のための親の承認印を要求している。生後18ヶ月までに指示に従い、②尿検体を指定の検査センターへ郵送する。郵送料は各自負担してもらう。③検

1. 「前向き介入研究—マスキリーニングの実施時期変更の検討と評価」に関する研究 (2) 神経芽細胞腫：京都府における 18 か月児スクリーニング



検査結果が陽性の時、不良検体の時など、センターは再検の依頼を地区府保健所、府経由で行い、④陽性が続いた時、検査センターから京都府経由京都府立医大付属病院小児科に報告し、小児科医が陽性児家族に直接連絡し、説明と府下5カ所の病院への精密検査、高次医療機関の受診を奨める。⑥診断決定後、治療は医大を中心とした医療機関で行い結果は医大のNB研究チーム、に報告し、NB研究チームは京都府に年間研究報告を提出する。NBに関する医療相談は医大小児科が担当する。各部所には秘守義務には十分の注意が必要である。

なお、検査料は無料。

D. インフォームド・コンセントの充実

実施には十分な注意を払うことが必要である。行政による援助を受けるが、研究的施行であることを十分に伝えること。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。

E. 診断例のデータ記載は日本神経芽細胞腫登録委員会による用紙 (\* 1) を用い、データの集計を行う。全国的な疫学的、臨床的分析に寄与する。この管理には京都府立医大(担当 家原知子医師)が行う。疫学的な改善点の必要性は定期的チェックする。

F. 治療、経過観察は本研究班「治療改善研究班」のプロトコルに従う。

(\* 1) 本研究班の疫学班で作成されたものを使用する。当分は6か月スクリーニングを臨時的に使用する。

(\* 2) 治療法の選択は予後因子の検査結果によってことなる。本研究班「治療改善研究班」のプロトコルに従うが、当分、臨時的に出来なければ乳児神経芽細胞腫プロトコルを使用する。

以上の方針で、京都府では平成 17 年度から配布し始める。この時期の設定はNB 6ヶ月スのセットのダブリを避けることで決めた。

E. 考察

6ヶ月のNBスの休止の理由は前編で述べたように、平成 15 年 7 月の厚生労働省による通達は「生後 6 ヶ月時のNBスは死亡率減少効果の有無が明確でない一方、自然退縮する例に対して手術などの治療を行うなどの負担をかけており、このまま継続することは難しいと判断される。」であったが、本邦の 16 年度の研究班の報告では「生後 6 ヶ月時のNBスの全国乳児コホートを対象に生後 6 ヶ月以降のNB死亡率はHPLCス受検群では0.234/10万人年、未受検群では0.831/10万人年で有意差があり、群間の累積死亡数の差は100万人年当たり20-30人と推定された<sup>5)</sup>。」であった。この死亡率の減少数が効果的であるか否か、と、過剰治療が行われていること、を判断する必要性が問題となった。

当初、6ヶ月スに設定した根拠は、NB例の予後は年齢に強く依存していること、特に「12ヶ月未満例の予後が良好」の報告から、1歳までに治療を開始したい、NBの年齢分布は2峰性で1歳頃を中心とした大きなピークと3-4歳頃の小さなピークが海外と同様本邦でも見られ、第1のピーク例の早期発見でも相当数発見できる可能性がある、しかし、NBには幼若乳児期の高頻度にIn Situ NBもあり、臨床発生頻度から自然治癒例がある可能性が高いために早すぎることは避ける、さらに、検査陽性例の確定診断には3-4ヶ月の期間がかかる、などと、当時、予想したためであった。スの実施の当初は「尿だけでもNBを疑い、発見できる」、「うまく治癒する」であった。当時、主流であった広範な拡大手術、強力な化学療法、放射線療法を含む集学的治療は軽減しても治癒することが分かり、乳児期例の治療プロトコルを作成した。スによるNB発見例の増加に伴い本邦のNB例は増加したが、年齢分布では1歳未満例の著しい増加、すなわち、ス発見による増加が見られたが、1歳以後のNB例—幼児期NB以後の例の減少には繋がらなかった。

同様なことは病期の分布にも見られた。限局例の増加は進行例の減少に繋がらなかった。これらの結果は期待外れであった。6ヶ月では、まだ自然治癒現象を継続している例がかなりの頻度であることを推測させた。そこで、京都では1歳6ヶ月時に2回目のスを研究的に開始した。平成3（1991）年7月から10年間行った。その結果、発見頻度は4/49090(1/12273)で6ヶ月スの約半分、発見4例の内、1例は乳児期ス陰性で、3例は非受検例、病期は1期1例、3期3例であった。1歳6ヶ月の頻度は2度目のスであることから不明。しかし、3期例が多く進行初期例を発見できた。全例生存中。

## F. 結論

今回計画した1歳6ヶ月スでは自然治癒例の多くを避けることができ、治癒可能な段階で予後不良例を発見できる可能性は乳児期スより高いこと、NB死亡数を減少できると推定できる。

京都以外で実施が計画されている地区は、現在、5地域（札幌、静岡、新潟、京都、大阪）で計画され、対象出生数は177,750人/年で、対応する対照地域を準備するだけでなく、計画都道府県が増すことが期待される。

## F. 参考文献

沼田公介ほか：神経芽細胞腫－1歳6カ月児における正常値と問題点。小児科診療 55（7）：1524－1529, 1992。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

沼田公介ほか：神経芽細胞腫－1歳6カ月児における正常値と問題点。小児科診療 55（7）：1524－1529, 1992。

ほか（1）に掲載

## 大阪府における神経芽腫スクリーニングシステム

## —これまでの実績とこれから—

分担研究者 中山雅弘<sup>1</sup>、竹島清美<sup>1</sup>、入江明美<sup>1</sup>、稲岡一考<sup>1</sup>、島本太香子<sup>2</sup>、米田光宏<sup>3</sup>、井上雅美<sup>1</sup>、河敬世<sup>1</sup>

1 大阪府立母子保健総合医療センター

2 大阪府保健福祉部

3 大阪大学医学部小児外科学

**研究要旨**

最初に、大阪府における6ヶ月神経芽腫マススクリーニングの総括を記載した。大阪府立母子保健総合医療センター検査科では、大阪市を除く大阪府下の6ヶ月児を対象として神経芽腫マススクリーニング検査を実施してきており、その受検率はおおよそ80%である。昭和63年4月から平成15年3月までの受検者684,710人を対象とした。受検者数684,710人のうち、精密検査受診者が555人、うち神経芽腫159人、陰性394人であった。神経芽腫159人の病期分類の内訳は、病期Ⅲ期・Ⅳ期が42人発見されており、発症例の早期発見の意義があったと考えられる。

大阪府における1歳6ヶ月神経芽腫マススクリーニング検査再開までの過程を記載した。大阪府では、がん登録の整備がなされてきており、又、スクリーニング陽性後の精密検査担当医療機関も一元化がなされている。このような観点より大阪府では、1歳6ヶ月のスクリーニング検査を実施することとなった。1歳6ヶ月選択の理由は、VMAやHVAの腫瘍陰性例や無治療経過観察群の結果より、検査時期を1歳6ヶ月に変更することで退縮例に対する過剰診療を減少できると考えられる。

又、1歳6ヶ月は、神経芽腫の生物学的差異が出現する時期であり、国際的な病理組織基準（嶋田分類）でも、1歳6ヶ月が予後を分ける重要な判断基準となっている。更に、乳児検診実施時期でもあり、受検率の向上も期待される。

最後に、本年度行った1歳6ヶ月マスのパイロットスタディーの結果を示す。8ヶ月間で、10,692人が受検された。約1万人を検査した時点で、2人の神経芽腫を発見し、その間に1例の疑陽性者は存在したが、自然治癒が予測される症例は認めなかった。受検率は約20%と非常に低かった。次年度は、受検率の向上を目指し、精密検査後の患者に関して詳細な報告をしたい。

**Summary**

Neuroblastoma mass screening system and the result of such screening in Osaka prefecture were described. At Osaka Medical Center and Research Institute for Maternal and Child Health, neuroblastoma mass screening examination of six month-old infants was performed in Osaka prefecture (except Osaka city). The proportion of the population screened by this system has been almost 80%. A total of 684,710 infants underwent examination between April 1988 and March 2003. 555 infants required further medical testing, among those 555 infants, 159 true neuroblastomas were identified, while 394 were negative for tumor on further examination. Two refused for further examination. A breakdown of those 159 neuroblastomas by stage showed that 42 were in clinical stage 3 or 4. From this perspective, infant screening was effective even in the previous 6-month-old infant screening system.

A process of reopening the neuroblastoma mass screening examination for eighteen month-old children in Osaka was described. In Osaka, the preparations for cancer registration have been accomplished, and a further medical examination system is well regulated. Osaka prefecture made a decision to perform screening tests for eighteen month infants based on the documentation of the usefulness of this program. The reason for choosing 18 months as the age of examination is to prevent

or decrease excessive medical treatment for cases undergoing spontaneous regression cases based on the results of serial observations of VMA and HVA.

In addition, it is age at which a biological difference of neuroblastoma appears and important judgment criteria in the international pathology tissue criteria (Shimada classification) become applicable. Furthermore, it is consistent with the general health examination period for infants in Japan, and improvement in the examination rate is also expected.

Finally, the results of a pilot study of the new screening system are described below. During eight months, 10,692 people were examined. Among those, we discovered two neuroblastomas, and one false positive case without tumor on further investigation was recognized, but no cases that seemed to spontaneously regress were detected during that time. The examination rate was very low at about 20%. In the next fiscal year, we want to compile a detailed report of patients after additional work to improve the examination rate.

**A. 研究目的**

大阪府における6ヶ月神経芽腫マスキリーニングの結果を解析した。次いで、1歳6ヶ月スクリーニングのパイロットスタディーの結果を記載した。

**B. 研究方法**

大阪府立母子保健総合医療センター検査科では、大阪府の委託事業として、大阪市を除く大阪府下の6ヶ月児を対象として神経芽腫マスキリーニング検査（以下NBマスと略す）を実施しており、その受診率はおおよそ80%である。

昭和60年1月から平成15年3月までの受検者824,015人のうち、検査法がHPLC法にかわってからの昭和63年4月から平成15年3月までの受検者684,710人を対象とした。検体は6ヶ月児の生尿、測定は東ソー社のHPLC（現在HLC-726VMAⅢ）を使用してVMA、HVA、CRNの同時定量を行った。

1歳半スクリーニングの研究方法を記す。

大阪府立母子保健総合医療センター倫理委員会および大阪府先天性代謝等協議会で承認された方針を2004年5月より実施した。

実施の主体は大阪府であり、保健所・市町村を介して検査物品を1歳6ヶ月児検診後すぐに1つの検査機関（大阪府立母子保健総合医療センター）に送付する。疑陽性者が発見されれば、2カ所の精密医療機関（大阪大学・大阪府立母子保健総合医療センター）のいずれかで精密検査を実施する（図1、表1）。

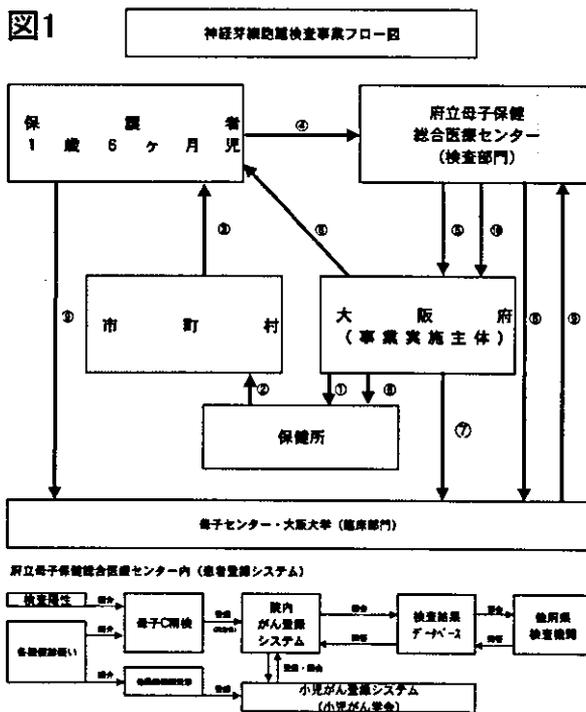


表1 神経芽腫検査フロー図説明

- ①保健所へ検査物品を送付する。
- ②保健所より、市町村に配布する。
- ③市町村が実施する1歳6ヶ月児検診において、保護者に検査用具を配布する。
- ④保護者は同意書に記名押印のうえ1歳6ヶ月児検診後すぐに生尿を所定の用具で採取し、母子センター（検査）に送付する。
- ⑤母子センター（検査）は、疑陽性者が発見されれば大阪府（母子G）に報告する。
- ⑥母子Gは母子センターより報告を受ければ、保護者に連絡し精密検査受診日を調整する。また保健所へ情報提供する。
- ⑦母子Gは母子センターまたは大阪大学（臨床）へ受診日を報告する。
- ⑧母子センター（検査）は母子センターまたは大阪大学（臨床）へ検査データを報告する。
- ⑨精密検査受診
- ⑩母子センターまたは大阪大学（臨床）は⑨診療の結果を母子センター（検査）へ報告する。
- ⑪母子センター（検査）は⑩の写しを母子Gへ送付する。

**C. 研究結果**

1. 大阪府における6ヶ月神経芽腫マスキリーニングの結果  
 受検者数684,710人のうち、精密検査受診者が555人、うち神経芽腫159人、陰性394人であった。神経芽腫159

表2 神経芽腫スクリーニング実績 年度推移

年度	受検者数	精密検査 受診者	神経芽細胞腫							陰性	その他
			I期	II期	III期	IV期	IVs期	不明	合計		
S63	30,178	7	4	1					5	2	
H1	42,018	28	3	5	1	1		1*	11	17	
H2	43,229	32	3	4	3				10	22	
H3	43,656	24		4	3		1		8	16	
H4	45,103	43	7	5	2	2		1*	17	26	
H5	45,664	40	4	5	3			2**	14	26	
H6	46,151	47	5	3	3		1		12	35	
H7	47,292	41	6	4	3	1	1		15	26	
H8	48,380	52	6	2	5	3			16	35	1**
H9	48,854	29	3	2	1				6	22	1**
H10	49,651	47	2	2					4	43	
H11	50,177	67	5	1	3		1		10	57	
H12	48,945	35	4	3	1	1		1**	10	25	
H13	48,539	38	5	2	1		1		9	29	
H14	46,873	25	4	2	5		1		12	13	
合計	684,710	555	61	45	34	8	6	5	159	394	2

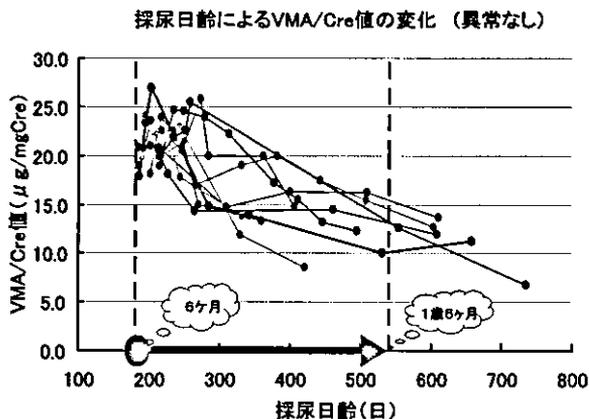
\*1:転院 \*2:他府県に転居 \*3:未受診(保護者の医療不信)

人の病期分類の内訳は、I期61人、II期45人、III期34人、IV期8人、IVs期6人、不明(他府県に転出)5人であった(表2)。

VMA/CRN、HVA/CRN高値のために要精検となり、精密検査で陰性であった症例のうち、その後追跡された例を検討した。

VMA/CRN、HVA/CRNともにほとんど12ヵ月までに、18ヵ月では全例が基準値以下に低下した(図2)<sup>1,2</sup>。更に、

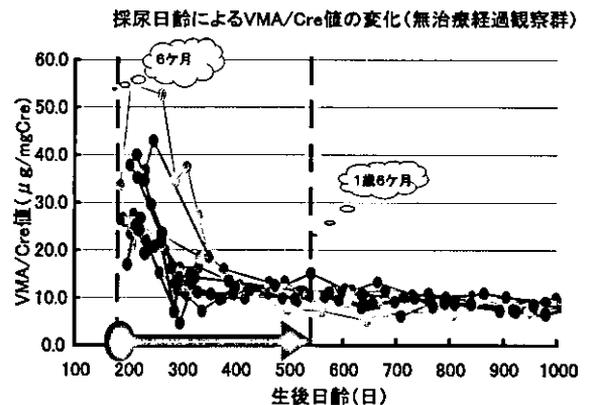
図2



大阪府などで数年来実施している無治療経過観察したI期II期の自然退縮例のその後の追跡結果でも、同様の傾向が見られた(図3)<sup>3,4</sup>。

6ヵ月児神経芽腫マススクリーニング検査では過剰診断、過剰診療の不利益ばかりを強調する記事が大きく取り上げられてきたが、大阪府のNBマスの検査成績を検討すると、病期III期・IV期が42人発見されており、発症例の早期発見の意義があったと考えられる。また宗教上の理由で治療拒

図3



否した神経芽腫（Ⅲ期）症例が3才半までに腫瘍死するという嘆かわしい例も経験している。厚生労働省は6ヵ月神経芽腫マスキリーニング検査休止決定の条件に

- ①罹患と死亡の正確な把握
- ②実施時期変更、新たな検査法の検討・評価
- ③死亡の減少を目指した臨床診断と治療の向上のための研究の推進と実施体制

の確立をあげているが、大阪府では6ヵ月神経芽腫マスキリーニング検査を休止し、1歳6ヶ月に時期を移行してパイロットスタディを行うための検討を重ねてきた（表3）。

表3—大阪府の方針

- ・国の示した3つの条件に沿った体制整備の方針を、国は早急に出すべきである。
- ・平成16年度以降については、
  - (1)大阪府には、実施体制の独自性（一元化検査体制、地域がん登録制度）がある。
  - (2)大阪府はパイロットスタディーとして、1歳6ヶ月の検査を実施する。
  - (3)実施に伴って府立母子保健総合医療センター倫理委員会で倫理審査を受ける。
  - (4)協議会に専門部会を設置する。
  - (5)疫学の専門家を含めた評価委員会を設置する。

## 2. 大阪府における1歳6ヶ月神経芽腫マスキリーニング検査再開までの過程

大阪府では、がん登録の整備がなされてきており、又、スクリーニング陽性後の精密検査担当医療機関も一元化がなされている。このような観点より大阪府では、1歳6ヶ月のスクリーニング検査を実施することとなった。

1歳半選択の理由を以下に述べる。

前述した、VMAやHVAの腫瘍陰性例や無治療経過観察群の結果より、検査時期を1歳6ヶ月に変更することで退縮例に対する過剰診療を減少できると考えている。

又、1歳6ヶ月は、神経芽腫の生物学的差異が出現する時期であり、神経芽腫のバイオロジーにおいて、国際的な病理組織基準（嶋田分類）でも、1歳6ヶ月が予後を分ける重要な判断基準となっている。

更に、乳児検診実施時期でもあり、受検率の向上も期待される。以下に、2004年の日時とともに1歳6ヶ月神経芽腫マスキリーニング検査に関する主な事実経過を記載する。

2004.1 大阪府神経芽腫検査専門部会を設立し運用の詳細を検討してきた。

2004.1 第1回・2回神経芽腫検査専門部会

2004.5 第3回神経芽腫検査専門部会

2004.8 第4回神経芽腫検査専門部会

2004.12 第5回神経芽腫検査専門部会

2004.3 神経芽腫1歳6ヶ月スクリーニング母子センター倫理委員会承認

第28回大阪府先天性代謝異常等検査運営協議会にて承認を受ける<sup>5</sup>。

2004.4 厚生労働省科学研究費（子ども家庭総合研究事業）神経芽細胞腫マスキリーニングの効果判定と医療体制の確立--新規事業開始

2004.5 神経芽腫1歳6ヶ月マスキリーニング開始

2004.11 第20回日本小児がん学会（京都）で“大阪府の神経芽腫スクリーニングシステムについて”発表<sup>6</sup>

2005.1 神経芽腫マスキリーニング普及のためのポスター・パンフレット作成

2005.2 1歳6ヶ月神経芽腫スクリーニング検査のホームページを更新

## 3. 1歳6ヶ月神経芽腫スクリーニング検査の現状と課題

実施後、約半年間の受検状況を表4に示す。8ヶ月間で、10,692人が受検された。その間に発見された要精検者のリストは表5である。症例1の手術後の生物学的分類は、*MYCN* gain, diploid, 嶋田分類 unfavorable という biology からフォローには注意を要すると考えられた。症例3は副腎に大きな腫瘍が発見され、嶋田分類は、favorable 組織であったが、diploid で、上記 biology から推測すると、2例ともに、Brodeur type 2 に属すると考えられ、マスキリーニングによって早期発見された可能性が考えられた。症例2は精密検査の結果、腫瘍の存在は認められなかった。

約、1万人を検査した時点で、2人の神経芽腫を発見し、その間に1例の疑陽性者は存在したが、自然治癒が予測される症例は認めなかった。受検率は約20%と非常に低かった。次年度は、受検率の向上を目指し、精密検査後の患者に関して詳細な報告をしたい。

表4 1歳6ヶ月スクリーニングの月別受検数

	Cases	Reexam.	Suspect	Failure	Delay
5月	519	10	5	4	1
6月	1352	27	17	6	4
7月	1422	36	17	15	4
8月	1387	36	24	10	2
9月	1469	60	38	15	7
10月	1562	44	31	3	10
11月	1541	48	30	9	9
12月	1440	39	21	8	10
合計	10692	300	183	70	47

5. 中山雅弘、竹島清美、入江明美、稲岡一考、河敬世、井上雅美、米田光宏、島本太香子 大阪府立母子保健総合医療センター倫理委員会承認資料 2004年3月
6. 中山雅弘、竹島清美、入江明美、稲岡一考、島本太香子、井上雅美、河敬世 大阪府における神経芽腫マス・スクリーニング 日本小児がん学会 2004年11月

表5--今年度の要精検者のリスト

1.male 2004.10.4

2004.6.9 25.9(VMA), 29.1(HVA)  
2004.7.27 20.6(VMA), 29.8(HVA)  
Osaka university(case-1), 6M-mass(-)

2.female 2003.4.7

2004.11.23 21.1(VMA), 2.0(HVA)  
2004.12.9 18.1(VMA), 11.4(HVA)

No tumor at Osaka University  
2003.10.22 12.8(VMA), 25.6(HVA)-6M-mass

3.male 2003.3.27

2004.12.20 147.6(VMA), 258.4(HVA)  
Osaka Medical Center(case-2), 6M-mass(-)

F. 参考文献

1. 竹島清美、入江明美、稲岡一考、中山雅弘、井上雅美、河敬世 大阪府における神経芽腫マス・スクリーニング 第26回近畿小児がん研究会 2004年3月 大阪
2. 中山雅弘、井上雅美\*、竹島清美、入江明美、稲岡一考、河敬世 大阪府における神経芽腫マス・スクリーニング --- 発見時の臨床病期とVMA, HVA値の推移および今後の1歳6ヶ月スクリーニングについて 第204回堺小児科医会例会、2004.6.5, 堺市
3. 井上雅美、八木啓子、河敬世、虫明聡太郎、中山雅弘、西川正則、森本静夫 当センターにおける神経芽腫マススクリーニング症例の治療方針（自然退縮を期待した無治療経過観察の試み）小児がん 33:197-201 1996
4. Yoneda A, Oue T, Imura K, Inoue M, Yagi K, Kawa K, Nishikawa M, Moromoto S, Nakayama M. Observation of untreated patients with neuroblastoma detected by mass screening: A "wait and see" pilot study. Medical and Pediatric Oncology 36:160-162 2001

# 登録症例に基づく神経芽細胞腫マススクリーニングの効果判定と 医療体制の確立

分担研究者 中川原 章 千葉県がんセンター研究局長

## 研究要旨

神経芽細胞腫マススクリーニングによる腫瘍の早期発見システムの効果判定は、今後の治療戦略決定に重要である。本分担研究では、これまでに集積した664例のマススクリーニング発見症例について腫瘍組織の遺伝子発現やゲノム解析を行い、その生物学的背景の解明を目指す。今回は、予後調査のできた1,220例の中のマススクリーニング発見症例664例の内訳について解析した。

## A. 研究目的

乳児の尿中カテコラミン代謝産物の検査（マススクリーニング）による神経芽細胞腫の早期発見システムの効果判定は、今後の難治性神経芽細胞腫の治療戦略決定に重要である。そこで本分担研究では、これまでに集積したマススクリーニング発見症例について遺伝子発現やゲノム異常などの観点から様々な解析を行い、その生物学的背景の解明を目指す。

## B. 研究方法

1) 神経芽細胞腫の組織バンクの整備と各種予後マーカー測定システムの構築

千葉県がんセンター生化学研究部にて神経芽細胞腫の各種予後マーカーの測定法を確立した。対象とする予後マーカーは *MYCN* 遺伝子のゲノムにおけるコピー数、*TRKA* 遺伝子発現、DNA プロイディなどである。まず、インフォームド consent が得られ、凍結および冷蔵にて送付された神経芽細胞腫のバイオプシーあるいは外科的切除された組織について、凍結組織からは RNA と DNA を調製し、サザン解析およびノザン解析を施行した。冷蔵組織からは腫瘍細胞を LymphoPrep を用いて分離し、フローサイトメーターを用いて DNA プロイディ解析を行った。

2) 遺伝子発現解析とゲノム異常解析

当研究室では、これまでに複数の神経芽細胞腫腫瘍組織より cDNA を作製し、1 万クローンに及ぶ遺伝子断片を収集した。この遺伝子ソースをもとに神経芽細胞腫に特化した 5,340 遺伝子を搭載した DNA チップの作製を終えている。また、このチップを用いた多検体の神経芽細胞腫組織の網羅的遺伝子発現解析を進行中である。

倫理面の配慮としては、本研究に用いるサンプルは、全て組織供与施設において文書によるインフォームド consent を得、匿名化された後に当研究室に供与されたものを用いる。本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って行い、研究実施内容について千葉県がんセンター倫理審査委員会に諮り、すでに承認を得ている。

## C. 研究結果

現在本研究室の腫瘍組織バンクの中で神経芽細胞腫組織は約 1,800 サンプルとなった。患者予後情報が附随する 1,220 サンプルのうち、マススクリーニング発見例は 664 症例であった。表 1 はこれらの症例のマススクリーニング陽性判定時期を示す。また、表 2 は組織採取時月齢、原発巣および病期を示す。

表 1 マススクリーニング発見例

6 カ月時	586
11 カ月時	1
14 カ月時	19
18 カ月時	7
時期不明	51
計	664

表 2A 腫瘍採取時月齢

6mo 未満	19
6mo 以上 12mo 未満	567
12mo 以上 18mo 未満	51
18mo 以上 24mo 未満	11
24mo 以上 32mo 未満	4
32mo 以上 36mo 未満	3
36mo 以上	9
計	664

mo は月数を示す

表 2B 原発巣

副腎	331
縦隔	92
腹部交感神経節	162
前仙骨	8
腹部	32
頸部	3
不明	36
計	664

表 2C 病期 (INSS)

stage 1	329
stage 2	153
stage 3	103
stage 4	24
stage 4S	41
stage 1 or 2	4
stage 4S or 3	1
計	664

病理組織型（島田分類）は、Favorable type が 522 例、Unfavorable type が 30 例、不明 112 例であった。当研究室にて行った各症例のゲノミックサザン解析、ノザン解析およびフローサイトメトリー解析による予後因子解析では、それぞれ、*MYCN* 増幅なし 650 例、*MYCN* 増幅 8 例および検査不能 6 例、*TRKA* 高発現 499 例、低発現 60 例、検査不能 105 例、そして Aneuploidy 444 例、diploidy 132 例、不明 88 例と、ほとんどの症例が予後良好を示す結果であった。実際の予後も大変良好であり、腫瘍死は 1 例のみであった。その他はフォローアップ時生存 579 例、拒癌生存 37 例および不明 47 例であった。

神経芽細胞腫由来遺伝子を搭載した DNA チップによる遺伝

子発現解析については、現在までに 150 症例を超える神経芽細胞腫組織について行い、うちマスキリング発見症例については約 60 症例のハイブリダイゼーションを終えた。

#### D. 考察

マスキリング発見症例はそのほとんどが予後良好なマーカーを示し、臨床経過も極めて良好である。しかし、一部には後に再発を起こす例や死亡例も見られることから、そのような特殊な例の詳細な解析が今後非常に重要と考えられる。

#### E. 結論

今後は一部の予後不良な症例の臨床経過と、再発時の腫瘍を含めた腫瘍組織の網羅的遺伝子発現解析等から、それらの分子背景の解明を行っていききたい。さらに腫瘍組織のゲノム異常解析については、網羅的な解析方法であるアレイ CGH 法を導入し、遺伝子発現とゲノム異常の両方の観点から詳細な分類を行う予定である。

#### F. 参考文献

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. [Nakagawara A, Ohira M.](#) Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. In Special Issue: Neural development and cancer. *Cancer Lett.* 204:23-224, 2004.
2. Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, [Nakagawara A.](#) NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *J. Biol. Chem.* 279: 11327-11335, 2004.
3. Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, [Nakagawara A.](#) Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (*hNLR*) family genes and inverse association of expression of *Nbla10449/hNLR-1* and *Nbla10677/hNLR-3* with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int. J. Oncol.* 24:1457-1466, 2004
4. Ohtori S, Isogai E, Hasue F, Ozaki T, Nakamura Y, [Nakagawara A.](#) Koseki H, Yuasa S, Hanaoka E, Shinbo J, Yamamoto T, Chiba H, Yamazaki M, Moriya H,

- Sakiyama S. Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene abrrative in neuroblastoma. *Mol. Cell. Neurosci.* 25:504-514, 2004.
5. Wang YQ, Seimiya M, Kawamura K, Yu L, Ogi T, Takenaga K, Shishikura T, Nakagawara A, Sakiyama S, Tagawa M and O-Wang J. Elevated expression of DNA polymerase k in human lung cancer is associated with p53 inactivation: negative regulation of POLK promoter activity by p53. *Int. J. Oncol.* 25:161-165, 2004.
  6. Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279:25549-25561, 2004.
  7. Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A, Ohnuma N, Yokoyama T. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *Br. J. Cancer* 91:972-979, 2004.
  8. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, Suzuki Y, Sugano S, Matsunaga T, Hiyama E, Hayashi Y, Watanabe Y, Suita S, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Ohnuma N, Nakagawara A. Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: Identification of high expression of the *Plk1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 23:5901-5911, 2004.
  9. Takahashi M, Ozaki T, Todo S, Nakagawara A. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene ING1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncol Rep.* 12:811-816, 2004.
  10. Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M, Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *Int. J. Cancer* 112:365-375, 2004.
  11. Nakagawara A. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. In *Neuroblastoma*, Eds. S. Cohn & N-K. Cheung, 2005, Springer-Verlag, Heidelberg. (in press)
  12. Kramer S, Ozaki T, Miyazaki K, Kato C, Hanamoto T, Nakagawara A. Protein stability and function of p73 are modulated by a physical interaction with RanBPM in mammalian cultured cells. *Oncogene* 24:938-944, 2005
  13. Abe M, Ohira M, Kaneda A, Yagi Y, Yamamoto S, Kitano Y, Takato T, Nakagawara A, Ushijima T. CpG island methylator phenotype is a strong determinant of poor prognosis in neuroblastomas. *Cancer Res.* 65:828-834, 2005
  14. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Lett.* (in press)
  15. Lin L, Ozaki T, Takada Y, Kageyama H, Nakamura Y, Hata A, Zhang J-H, Simonds W, Nakagawara A, Koseki H. Topors, a p53 and topoisomerase I-binding RING finger protein, is a co-activator of p53 in growth suppression induced by DNA damage. *Oncogene* (in press)
  16. Ozaki T, Hosoda M, Miyazaki K, Hayashi S, Watanabe K, Nakagawa T, Nakagawara A. Functional implication of p73 protein stability in neuronal cell survival and death. *Cancer Lett.* (in press)
  17. Hanamoto T, Ozaki T, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Nakanishi M, Yamamoto H, Kikuchi H, Todo S, Nakagawara A. Identification of protein kinase A catalytic subunit  $\gamma$  (PKA-C $\gamma$ ) as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J. Biol. Chem.* (in press)
  18. Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Isogai E, Kaneko S, Nakagawa A, Hirata T, Kubo H, Goto T, Yamada S, Yoshida Y, Fuchioka M, Ishii S, Nakagawara A. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate-risk neuroblastomas. *Cancer Cell* (in press)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他 なし

# 6ヶ月乳児マススクリーニングで発見される神経芽腫の生物学特徴

分担研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター研究室・室長

## 研究要旨

神経芽腫を早期に発見するために、尿中のカテコールアミン代謝産物を測定するマススクリーニング（マス）が6ヶ月乳児を対象にして日本とカナダ、ドイツで行われた。その死亡率減少効果については相反する結果が報告されている。神経芽腫患者を年齢と発見方法により3群に分類し、それぞれの生物学特徴を分析することにより、マススクリーニングの恩恵を受けている患者の頻度を予想した。453例の神経芽腫を対象にして、1番染色体の数と1番染色体短腕欠失の有無をFISH法で分析した。また、*MYCN*がん遺伝子のコピー数をサザン法で分析した。その結果から、神経芽腫を予後良好なtype 1腫瘍、予後不良なtype 3腫瘍、両者の中間の予後を示すtype 2腫瘍に分類した。type 1、type 2、type 3腫瘍の頻度はマス発見腫瘍の88.2%、10.5%、1.4%にみられ、また、臨床発見乳児腫瘍の68.0%、24.0%、8.0%、臨床発見年長児腫瘍の23.4%、42.3%、34.2%にみられた ( $P < 0.001$ )。3つの臨床群におけるtype 1、type 2、type 3腫瘍の頻度は、それぞれの臨床群の良好な、または不良な予後と密接に関係していた。マス発見type 2腫瘍の病期は早期であり、予後は良好であるが、臨床発見乳児および年長児type 2腫瘍の病期は進行期であり、予後は不良であった。従って、マスのターゲットとなる腫瘍はtype 2腫瘍であり、これはマス発見腫瘍の10%を占める。Type 1腫瘍のごく一部はマスで発見されなければ進行期腫瘍として年長児に発見されると予想される。両者を合わせるとマス発見腫瘍の10-15%がマスの恩恵を受けていると推測される。

## Summary

Mass screening (MS) of neuroblastoma has been carried out by measuring the urinary catecholamine metabolites in infants at the age of 6 months in Japan. We assessed the incidence of neuroblastoma that may be a target for MS by studying tumor biology. FISH on chromosome 1 and *MYCN* analysis was performed on 453 patients that were classified into 3 clinical groups (287 infants found by MS, 51 infants < 12 months diagnosed clinically, and 115 children  $\geq 12$  months diagnosed clinically). The relationship between the biological types of tumors and the clinical outcome was examined. Type 1 (trisomy 1 and normal *MYCN*), type 2 (disomy 1/tetrasomy 1 and normal *MYCN*) and type 3 (disomy 1/tetrasomy 1 and amplified *MYCN*) tumors were found in 88.2%, 10.5% and 1.4% of infants found by MS, in 68.0%, 24.0% and 8.0% of infants diagnosed clinically, and in 23.4%, 42.3% and 34.2% of children diagnosed clinically ( $P < 0.001$ ). Type 1 infants found by MS or diagnosed clinically had earlier stages of the disease ( $P < 0.0001$  and  $P = 0.0005$ ) and better overall survival ( $P < 0.001$  and  $P = 0.005$ ) than type 1 children diagnosed clinically. Type 2 infants found by MS had earlier stages ( $P = 0.06$  and  $P < 0.0001$ ) and better overall survival ( $P = 0.014$  and  $P < 0.001$ ) than type 2 infants or children diagnosed clinically. Type 3 patients in all 3 clinical groups had advanced stages and dismal prognoses. All type 2 and a small proportion of type 1 tumors detected by MS would have progressed to more malignant tumors if undetected by MS, and early treatment of these tumors might have reduced the mortality of the patients.

## A. 研究目的

神経芽腫はもっとも頻度の高い小児固形腫瘍である。乳児期に発見される神経芽腫の予後は良好であるが、年長児になって発見される進行期腫瘍の治癒は困難であるので、予後の改善をめざして日欧でマススクリーニングが実施された。欧米の疫学的研究はマスによる死亡率減少効果を否定したが、日本の研究はわずかであるが、死亡率減少効果があると報告した。マスの効果は疫学的に決定されるべきであるが、マスで発見された腫瘍や臨床的に発見された腫

瘍の生物学的研究は疫学的研究データの背景やマスのターゲットになる腫瘍の頻度を推定するのに役立つ。私たちは、マスで発見された腫瘍と臨床的に発見された腫瘍の生物学的性格を分析することにより、マスにより恩恵を受けている腫瘍の頻度を推定した。

## B. 研究方法

対象は453例の神経芽腫で、1985年から1998年に手術または生検を受けた乳児（12ヶ月未満）または年長児

（12ヵ月以上）である。453例を患者の年齢と発見方法により、MS発見乳児腫瘍287例、臨床的発見乳児腫瘍51例、臨床的発見年長児腫瘍115例の3群に分類した。同時期に全国でMSにより発見された患者は1896例なので、今回分析した287例は全体の15.1%にあたる。287例中269例（94%）のスクリーニングはカテコールアミン代謝産物を定量法により、残り18例は定性法により実施された。患者の病期はINSS病期分類により決定した。第1、2病期の乳児、年長児と第3病期の乳児は手術のみか、vincristineとcyclophosphamideによる化学療法により、第3、4病期の年長児と第4病期の乳児は日本神経芽腫研究グループのプロトコールにより治療を受けた。

腫瘍細胞の1番染色体の数と1番染色体短腕欠失(1p-)の有無を調べるために、1番染色体テロメア端とセントロメア近傍のプロンプを用いて、腫瘍細胞の間核を2色FISH法で分析した。また、サザン法によりMYCNがん遺伝子のコピー数を調べた。腫瘍を1番染色体の数とMYCNのコピー数により、生物学的に3群に分類した。すなわち、type 1(trisomy 1/MYCNコピー数正常)、type 2(disomy 1/MYCNコピー数正常)、type 3(disomy 1/MYCNコピー数増幅)である。

臨床的に分類した3群（マス発見乳児腫瘍、臨床的発見乳児腫瘍、臨床的発見年長児腫瘍）と生物学的に分類した3群（type 1, type 2, type 3）の生存曲線をKaplan-Meier法で求め、各群の予後を比較した。

（倫理面への配慮）

研究は病理診断に用いた検体の残りをを用いて実施した。検体を研究に用いることについて家族よりインフォームドコンセントを取得した。また、研究内容について、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に提出し、承認を得た。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。

### C. 研究結果

FISHによる1番染色体の数と1番染色体短腕欠失(1p-)の有無により、453例の腫瘍を4群に分類した(disomy 1/1p正常群56例、disomy 1/1p-群79例、trisomy 1/1p正常群283例、trisomy 1/1p-群35例)。MYCN増幅はdisomy 1/1p正常群にはみられず、disomy 1/1p-群には高頻度(46/79)であり、trisomy 1/1p正常群とtrisomy 1/1p-群ではまれであった(4/283と1/35)。

trisomy 1/1p正常群とtrisomy 1/1p-群の生存率を臨床的に分類された3群で調べると予後に差はなかったため、両群を一緒にして予後を分析した。disomy 1/1p-群の生存率はdisomy 1/1p正常群に比べて、臨床的分類3群のい

れにおいても不良であった。disomy 1/1p-群でMYCN増幅例の予後はdisomy 1/1p-群でMYCN正常例に比べてMS発見乳児例では不良であったが、臨床的発見乳児群と臨床的発見年長児群では予後に差がなかった。disomy 1/1p正常群とdisomy 1/1p-群でMYCN正常群の予後は分類された3群のいずれにおいても差がなかった。以上の結果から、453例をtype 1(trisomy 1/MYCNコピー数正常)313例、type 2(disomy 1/MYCNコピー数正常)89例、type 3(disomy 1/MYCNコピー数増幅)46例に分類した。

マス発見乳児と臨床的発見乳児type 1腫瘍の病期は臨床的発見年長児type 1腫瘍より早期であった( $P<0.0001$ と $P=0.0007$ )。マス発見乳児type 2腫瘍の病期は臨床的発見乳児type 2腫瘍や臨床的発見年長児type 2腫瘍より早期であった( $P=0.06$ と $P<0.0001$ )。type 3腫瘍の病期は、どの臨床群においても進行期であった。マス発見乳児と臨床的発見乳児type 1腫瘍の予後は臨床的発見年長児type 1腫瘍より良好であった( $P<0.0001$ と $P=0.005$ )。マス発見乳児type 2腫瘍の予後は臨床的発見乳児type 2腫瘍や臨床的発見年長児type 2腫瘍より良好であった( $P=0.014$ と $P<0.001$ )。type 3腫瘍の予後は、どの臨床群においても不良であった。

### D. 考察

最近、カナダ、ドイツ、日本から神経芽腫マスキリーニングの死亡率減少効果に関する疫学的研究結果が報告された。3つの研究ともマスキリーニングにより乳児神経芽腫の発生頻度は高くなることを報告しており、マスは自然退縮腫瘍を多数、発見したことを示唆した。一方、カナダとドイツの研究は死亡率減少効果を否定したが、日本の研究は、わずかであるが死亡率は減少していると報告した。マスの効果は疫学的に決定されるべきであるが、マスで発見された腫瘍や臨床的に発見された腫瘍の生物学的研究は疫学的研究データの背景やマスの恩恵を受けている腫瘍の頻度を推定するのに役立つ。

私たちの研究は1番染色体の数とMYCN増幅の有無から、神経芽腫を予後良好なtype 1腫瘍、予後不良なtype 3腫瘍、両者の中間の予後を示すtype 2腫瘍に分類した。type 1、type 2、type 3腫瘍の頻度はマス発見腫瘍の88.2%、10.5%、1.4%、臨床的発見乳児腫瘍の68.0%、24.0%、8.0%、臨床的発見年長児腫瘍の23.4%、42.3%、34.2%を占めた( $P<0.001$ )。3つの臨床群におけるtype 1、type 2、type 3腫瘍の頻度は、マス発見腫瘍の良好な、または年長児腫瘍の不良な予後と密接に関連している。マス発見type 1腫瘍の予後は極めて良好であり、その頻度は高い。一方、臨床

的発見年長児 type 1 腫瘍の予後は中間であり、頻度は低く、その進行期腫瘍には 1p- が高頻度にみられた。以上の所見から、マス発見腫瘍のごく一部は、マスにより発見されなければ、進行期年長児腫瘍として発見されることが推測される。マス発見 type 2 腫瘍の病期は早期であり、予後は良好である。一方、臨床的発見乳児および年長児 type 2 腫瘍の病期は進行期であり、予後は不良である。この所見から、マスのターゲットとなる腫瘍は type 2 であることが予想される。これに対して、type 3 腫瘍はどの年齢でも、どの発見方法でも進行期であり、予後は不良であるので、マスのターゲットにはならないと考えられる。type 2 はマス発見腫瘍の 10% を占め、これにマスで発見されなければ進展すると推測されるごく一部の type 1 腫瘍を加えると、マス発見腫瘍の 10-15% がマスの恩恵を受けていると考えられる。マスの死亡率減少効果について、日欧で異なる疫学的研究結果が出た背景には、マスで恩恵を受ける患者の頻度が低いので多数例の分析により始めて有意な差を示す結果が得られたと考えられる。

#### E. 結論

マススクリーニングの恩恵を受ける腫瘍は type 2 腫瘍の全てと type 1 腫瘍のごく一部であり、マス発見腫瘍の 10-15% と推測された。

#### F. 参考文献

1. Wood WG, Gao RN, Shuster JJ, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 2002;346:1041-1046.
2. Schilling FH, Spix C, Berthold F, et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002;346:1047-1053.
3. Yamamoto K, Ohta S, Ito E, et al. Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: cohort study in seven prefectures in Japan. *J Clin Oncol* 2002;20:1209-1214.
4. Hayashi K, Fujita T, Katanoda K, et al. Effectiveness of mass-screening program on neuroblastoma mortality in 1995-2000 birth cohort of Japan: nationwide neuroblastoma mortality study. Presented at 11th conference on advances in neuroblastoma research, Genoa, Italy, June In abstract p93. 2004; 16-9.
5. Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, et al. Current urinary mass screening for catecholamine metabolites at 6

months of age may be detecting only a small portion of high-risk neuroblastomas: a chromosome and N-myc amplification study. *J Clin Oncol* 1990;8:2005-2013.

6. Kaneko Y, Kobayashi H, Maseki N, et al. Disomy 1 with terminal 1p deletion was frequent in mass screening-negative/late-presenting neuroblastomas in young children, but not in mass screening-positive neuroblastomas in infants. *Int. J. Cancer* 1999;80:54-59.
7. Kerbl R, Urban CE, Ambros LM, et al. Neuroblastoma mass screening in late infancy: insights into the biology of neuroblastic tumors. *J Clin Oncol* 2003;21:4228-4234.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, et al. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. 投稿中

##### 2. 学会発表

Kaneko Y, Watanabe N, Tomioka N, et al. Neuroblastoma that might benefit from mass screening. Presented at 11th conference on advances in neuroblastoma research, Genoa, Italy, June In abstract p72. 2004; 250.1.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 予後不良神経芽腫の特異的腫瘍マーカーの検索 —プロテオーム解析から

長谷川朝美<sup>1</sup>、久保田耕司<sup>1</sup>、青木悠里<sup>1</sup>、升島 努（分担研究者）<sup>1</sup>、前田昌子<sup>2</sup>、檜山英三<sup>3</sup>

1 広島大学大学院 医歯薬学総合研究科

2 昭和大学薬学部

3 広島大学 自然科学研究支援開発センター

## 研究要旨

神経芽細胞腫は小児期特有の悪性腫瘍であり、早期発見・治療を目指したマススクリーニングの対象疾患の一つであった。しかしスクリーニング法の問題等の理由から有効性がないとされ昨年度をもって休止が決定した。しかしながら、神経芽細胞腫は今もなお予後不良な疾患でありマススクリーニングは小児の癌による死亡を減少させるためには必須である。

そこで我々はマススクリーニング再開のため、腫瘍のタイプ・予後を判断することのできる検査法の確立、さらには新しいマーカー候補分子の検索を試みた。現行のスクリーニングでは注目されていなかったカテコールアミンの中間代謝物も対象とし、LC-MSを用いた尿中・血中カテコールアミン代謝物の一斉分析法の確立を進めた。また新検出法 MALDI-TOF 質量分析法により、高分子タンパク質を標的とした新しいマーカーの検索法の検討を行った。

## Summary

Neuroblastoma is a malignant tumor especially found at an infant period, and the mass-screening was conducted. However, the mass-screening was suspended last year because the screening is not effective. We believe that neuroblastoma is still a convalescent unsatisfactory disease and therefore, mass-screening is vital to decrease the morality of infantile cancer.

In order to restart the mass-screening, we started to establish a testing method that can determine a type of the tumor and observe its convalescence. We also searched for molecules that could be new accurate determinants of the tumor. Metabolic substances of catecholamine were considered to be the insignificant subject of the present screening however, we targeted it to set up the analytical method of total metabolic substances of catecholamine within urine and blood by applying LC-MS and to find a new marker in metabolites. In addition, we attempted to establish the methodology to search new protein markers by the application of new MALDI-TOF/MS with a new type of detector.

## A. 研究目的

神経芽細胞腫は小児特有の悪性腫瘍であり、その診断は昨年度までマススクリーニングにより行われてきた。スクリーニングは尿中 VMA, HVA 濃度を測定することで行われてきたが、測定値の正確性やカットオフ値の設定など問題点が挙げられ、またスクリーニング実施後の神経芽細胞腫による死亡の推移からは現行のスクリーニングには有効性がないとし、厚生労働省の委員会において、スクリーニング休止の結論に至った。しかし、否定的な見解とは反対にマススクリーニングにより死亡率が減少したという見解もあり、再開の必要性も挙げられている。

そこで我々は、陽性患者の中に良性あるいは退縮性の患者が含まれてしまう、というこれまでのスクリーニングにおける問題点を解決するため腫瘍のタイプ・予後を判断することのできる検査法の確立、さらには新しいマーカー候補分子の検索を試みた。標的は尿・血液中低分子及び高分子タンパク質とし、LC-MS 及び MALDI-TOF/MS を用いて実験を行った。以下 3 章にわけ詳細を報告する。

1. 血液中カテコールアミン一斉分析 LC-MS の為の前処理濃縮法・分離法の確立
2. 尿中カテコールアミン一斉分析 LC-MS の為の前処理濃縮法・分離法の確立

3. 新検出法 MALDI-TOF 質量分析法による高分子タンパク質検出法の確立

1.1 LC-MS によるカテコールアミン代謝物一斉分析系の確立

B. 実験方法

1. 標準液の調整

カテコールアミン代謝物の標準物質として、DOPA、DOPAC、Dopamine、Ephinephrine、Norephinephrine、Metanephrine、Normetanephrine、HVA、VMA を用いた。それぞれの調整には超純水を用い、1mg/mL になるよう作成した。さらに条件検討のために全ての標準試料を混合し、超純水により希釈を行い最終濃度が 20 µg/mL となるよう調整した。また標準試料混合溶液を FBS により希釈し模擬血清とした。

2. LC-MS 条件

LC での分離には逆相 ODS カラムを用い、移動相は 5% メタノール / 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.05) から 10 分後に 45% メタノール / 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 3.05) へ上昇させ、流速 0.2 mL/min で試料の分離を行った。

MS へ導入するためには流速を 5 µL/min まで落とす必要があるため、ティーを用い流量を 1/40 になるよう調整した。ESI-TOF/MS ポジティブイオンモードで測定を行った。

3. 試薬

DOPA、DOPAC、Dopamine、Ephinephrine、Normetanephrine、Metanephrine、HVA、及び VMA は SIGMA、Norephinephrine は Fulka より購入した。

4. 試液

本研究で使用した水は全て Milli-Q<sup>®</sup> Academic A10 (Milipore) で精製した超純水を用い、メタノールは関東科学 (株)、蟻酸は米山薬品工業 (株)、酢酸アンモニウムは片山化学工業 (株) より購入した。

5. 機器

LC は日本分光 (株) の Gulliver Series (DG-980-50, 3-Line-Degasser, LG-1580-02, Tertiary Gradient Unit, PU-980, Intelligent HPLC Pump, UV-970, Intelligent UV/VIS

Dectet) を、カラムは Synergi 4u Fusion-RP 80A (150 x 4.6 mm, Phenomenex) を用いた。

MS は Applied Biosystems 社製の Mariner<sup>™</sup>, ESI-TOF を用い、データ処理は同社の Date Explorer<sup>™</sup> により行った。

(倫理面への配慮)

現在までの研究は市販の FBS を使用した模擬血清を使用しており、倫理上の問題はないものと考えられる。しかしながら今後、患者血清の使用も考えており、インフォームドコンセントの実施及びプライバシーの保護に十分配慮する必要がある。

C. 結果及び考察

標準物質混合試料を上記の条件で測定したところ、Fig.1 のような LC クロマトグラム及び MS クロマトグラムが得られた。

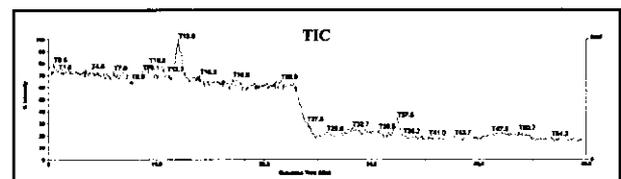
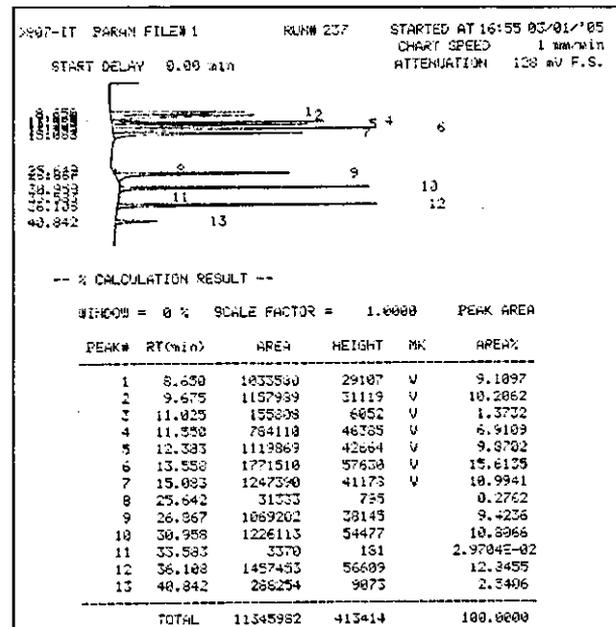


Fig.1 LC クロマトグラム (上) 及び MS クロマトグラム (下)

1. アミン型、アミノ酸型の試料の分離・測定

今回使用した緩衝液 (pH 3.05) の条件下においては、カテコールアミン代謝物の挙動はアミン型及びアミノ酸型とカルボン酸の2つのグループに大別される。アミン型である Dopamine、Norepinephrine、Ephinephrine、Normetanephrine、Metanephrine 及びアミノ酸型である DOPA は非常に構造が類似しており、分離は非常に極性の高い溶媒を使用しなければならない。今回は 5% メタノール / 10 mM ギ酸アンモニア緩衝液により、よりよい分離を得ることができ、その溶出は Norepinephrine、Ephinephrine、Normetanephrine、Dopamine、Metanephrine、DOPA の順であった。それぞれの試料の XIC を Fig.2-1 から 5 に示す。Norepinephrine においては、 $[M-H_2O]^+$  と考えられる m/z 152 のピークが主に観測され、 $[M+H]^+$  の m/z 170 のピークも観測できた。同様に Ephinephrine では  $[M+H]^+$  の m/z 184 のピークが、Normetanephrine では  $[M-H_2O]^+$  の m/z 166 のピークと  $[M+H]^+$  の m/z 184 のピークが、Dopamine では  $[M+H]^+$  の m/z 154 のピークが、Metanephrine 及び DOPA では  $[M-H_2O]^+$  の m/z 180 のピークと  $[M+H]^+$  の m/z 198 のピークが観測された。

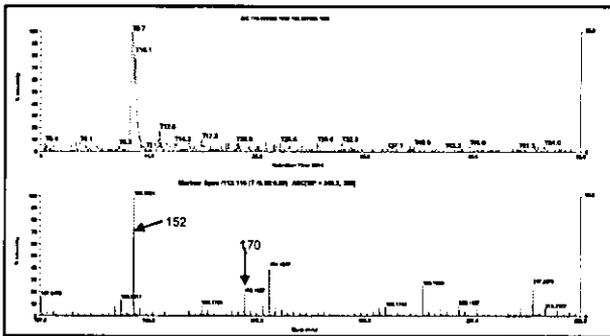


Fig.2-1 Norepinephrine m/z 152( $[M-H_2O]^+$ ), m/z 170 ( $[M+H]^+$ )

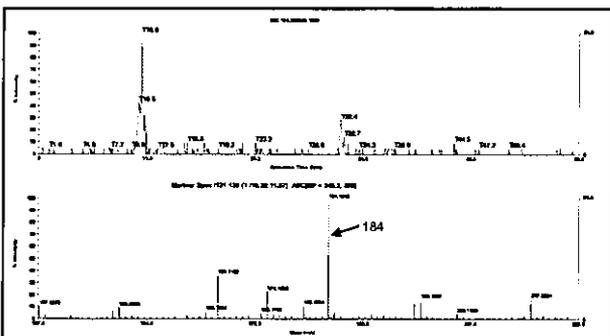


Fig.2-2 Ephinephrine m/z 184 ( $[M+H]^+$ )

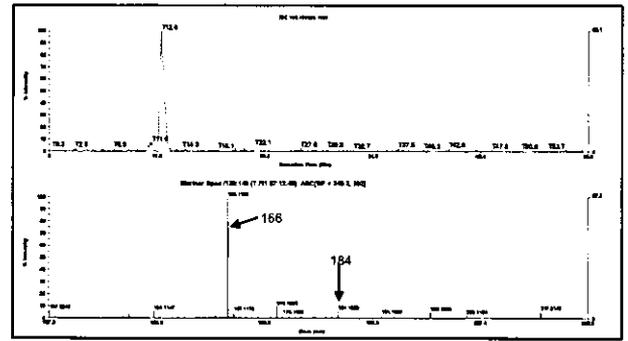


Fig.2-3 Normetanephrine m/z 166 ( $[M-H_2O]^+$ ) m/z 184 ( $[M+H]^+$ )

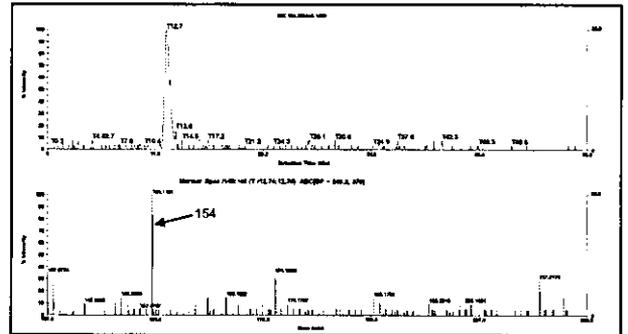


Fig.2-4 Dopamine m/z 154 ( $[M+H]^+$ )

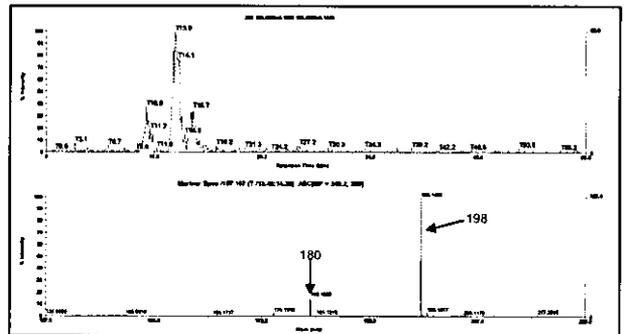


Fig.2-5 Metanephrine DOPA m/z 180 ( $[M-H_2O]^+$ ) m/z 198 ( $[M+H]^+$ )

2. カルボン酸の分離・測定

カルボン酸型である DOPAC、HVA、VMA は、5% メタノール / 10 mM ギ酸アンモニア緩衝液の条件下では分子型で存在しており、溶出は非常に遅くなる。そこで分離開始 9.9 分から 10.0 分の間に、メタノール濃度を 5% から 45% まで上昇させ溶出を早めた。これにより全分析時間を 1 時間以内に行うことができた。この 3 種類の試料の溶出は VMA、DOPAC、HVA の順となった。さらに ESI-MS のポジティブイオンモードでの結果を Fig.3-1,2 に示す。DOPAC では、 $[M+H]^+$  の m/z 168 のピーク、 $[M+NH_4]^+$  の m/z 186 のピーク、 $[M+Na]^+$  の m/z 191 のピークが観測され、緩衝液由来の  $NH_4^+$  が付