

200500402 A 4/2

厚生労働科学研究費補助金
(子ども家庭総合研究事業)

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

平成17年度研究報告書 (1 / 2冊)

平成18年4月

主任研究者 檜山英三

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
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
平成17年度研究報告書

目 次

班員名簿

総括研究報告

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	3
主任研究者 檜山 英三	
平成17年度経過報告	23

分担研究報告

マスキリーニング発見例の後ろ向きコホート研究

血清遊離 DNA を用いた神経芽腫 MYCN 増幅判定	45
分担研究者 杉本 徹 他	
乳児神経芽腫プロトコール登録例における再発症例の検討	49
分担研究者 杉本 徹 他	
宮城県における神経芽腫 18 ヶ月二次マスキリーニングの報告	53
分担研究者 林 富 他	
1 歳代に臨床発見された神経芽腫症例の検討	59
分担研究者 福澤 正洋 他	
ワイブル・ガンマハザードモデルの適用による小児神経芽腫患者の初診時所見データに基づく予後予測	65
分担研究者 大瀧 慈	

前向き介入研究

京都における 18 ヶ月神経芽細胞腫スクリーニングの問題点	73
分担研究者 澤田 淳 他	
大阪府における 1 歳半神経芽腫スクリーニング	77
分担研究者 中山 雅弘 他	
マスキリーニングの有効性検証のための前向き介入研究計画の具体的検討	83
分担研究者 赤澤 宏平 他	

マスキリーニング症例の腫瘍特性解析

神経芽腫マスキリーニング発見症例の生物学的特性と予後に関する研究	91
分担研究者 中川原 章	
神経芽腫における血清 NM23H1 蛋白質の臨床的意義	95
分担研究者 金子 安比古	

予後不良神経芽腫の特異的腫瘍マーカーの検索.....	99
	分担研究者 升島 努 他
「マススクリーニング症例の病理組織研究と腫瘍特性」- 神経芽腫の組織型とその予後および生物学的特性との関連.....	111
	分担研究者 浜崎 豊
神経芽細胞腫の網羅的遺伝子異常と特性解析.....	117
	主任研究者 檜山 英三 他
研究成果の刊行に関する一覧表.....	123

厚生労働科学研究費補助金
(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研究班
班員名簿

厚生労働科学研究費補助金 (子ども家庭総合研究事業)
 神経芽細胞腫マスクリーニング研究班
 班員名簿〔平成18年3月31日現在〕

	氏名	所属	肩書	住所	備考
主任研究者	檜山英三	広島大学自然科学研究支援開発センター	教授	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 Tel.082-257-5951 Fax.082-257-5416 eiso@hiroshima-u.ac.jp	
分担研究者	澤田 淳	京都第二赤十字病院	院長	〒602-8026 京都府京都市上京区釜座通丸太町 上ル春帯町355-5 Tel.075-231-5171 Fax.075-256-3451 prswada@koto.kpu-m.ac.jp	
"	杉本 徹	京都府立医科大学大学院医学研究科 小児発達医学	教授	〒602-8566 京都府京都市上京区河原町通広小 路上る梶井町465 Tel.075-251-5569 Fax.075-252-1399 tosugimo@koto.kpu-m.ac.jp	
"	中山雅弘	大阪府立母子保健総合医療センター検査科	部長	〒594-1101 大阪府和泉市室堂町840 Tel.0725-56-1220 Fax.0725-56-1858 nkymmsr@mch.pref.osaka.jp	
"	福澤正洋	大阪大学大学院医学系研究科外科学講座 小児成育外科学	教授	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-1 Tel.06-6879-3753 Fax.06-6879-3759 fukuzawa@ped surg.med.osaka-u.ac.jp	
"	林 富	東北大学大学院医学系研究科小児医学講座 小児外科学分野	教授	〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1 Tel.022-717-7237 Fax.022-717-7240 yhayashi@ped-surg.med.tohoku.ac.jp	
"	赤澤宏平	新潟大学医歯学総合病院医療情報部	教授	〒951-8520 新潟県新潟市旭町通1-754 Tel.025-227-2471 Fax.025-227-0850 akazawa@med.niigata-u.ac.jp	
"	大瀧 慈	広島大学原爆放射線医学科学研究所 計量生物研究分野	教授	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 Tel.082-257-5852 Fax.082-256-7106 ohtaki@hiroshima-u.ac.jp	
"	中川原章	千葉県がんセンター研究局	局長	〒260-8717 千葉県千葉市中央区仁戸名町666-2 Tel.043-264-5431 Fax.043-265-4459 akiranak@chiba-cc.jp	
"	金子安比古	埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所	所長	〒362-0806 埼玉県北足立郡伊奈町大字小室818 Tel.048-722-1111 Fax.048-723-5197 kaneko@cancer-c.pref.saitama.jp	
"	升島 努	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座分子治療・ デバイス学研究室	教授	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 Tel.082-257-5300 Fax.082-257-5304 tsutomu@hiroshima-u.ac.jp	
"	浜崎 豊	静岡県立こども病院臨床病理科	医長	〒420-8660 静岡県静岡市漆山860 Tel.054-247-6251 Fax.054-247-6259 mhamasan@sch.pref.shizuoka.jp	
研究協力者	秦 順一	国立成育医療センター	総長	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1 Tel.03-5494-8265 Fax.03-3416-0336 jhata@nch.go.jp	
"	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	施設長	〒355-0002 埼玉県東松山市東平656-1 Tel.0493-22-5639 Fax.0493-21-3732 hi_naruse@hkg.odn.ne.jp	
"	田中丈夫	独立行政法人国立病院機構呉医療センター 中国地方がんセンター	内科系診療部長 兼小児科科長	〒737-0023 広島県呉市青山町3-1 Tel.0823-22-3111 Fax.0823-21-0478 ttanaka@kure-nh.go.jp	
"	檜山桂子	広島大学原爆放射線医学科学研究所 遺伝子診断・治療開発研究分野	助教授	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 Tel.082-257-5841 Fax.082-256-7105 khiyama@hiroshima-u.ac.jp	

"	高原裕夫	徳島大学病院小児外科・小児内視鏡外科	科長	〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町2-50-1 Tel.088-633-7138 Fax.088-631-9698 takehara@clin.med.tokushima-u.ac.jp
"	佐々木文章	北海道大学小児外科	教授	〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目 Tel.011-706-7381 Fax.011-706-7384 sskfmk@med.hokudai.ac.jp
"	杉山正彦	東京大学医学部附属病院小児外科	助手	〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1 Tel.03-5800-8671 Fax.03-5800-5104 SUGIYAMA-psu@h.u-tokyo.ac.jp
"	近藤知史	名古屋市立大学大学院医学研究科 病態外科学腫瘍・免疫外科学	講師	〒437-8601 愛知県名古屋市中区瑞穂区瑞穂町川澄1番地 Tel.052-853-8231 Fax.052-853-6440 s.kondo@med.nagoya-cu.ac.jp
"	田尻達郎	九州大学病院小児外科	講師	〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 Tel.092-642-5573 Fax.092-642-5580 taji@pedsurg.med.kyushu-u.ac.jp
"	山岡裕明	広島大学病院小児外科	講師	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 Tel.082-257-5216 Fax.082-257-5219 yama2@hiroshima-u.ac.jp
"	西 基	北海道医療大学生命基礎科学講座	教授	〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757 Tel.0133-23-1211 Fax.0133-22-1835 motoi@hoku-iryu-u.ac.jp
"	藤田晃三	札幌市衛生研究所	所長	〒003-8505 北海道札幌市白石区菊水9条1丁目 Tel.011-841-2341 Fax.011-841-7073 kozo.fujita@city.sapporo.jp
"	浅見 直	新潟青陵大学看護学科	教授	〒951-8121 新潟県新潟市水道町1-5939 Tel.025-266-0127 Fax.025-267-0053 tasami@n-seiryu.ac.jp
"	小田辺なお子	財団法人新潟県保健衛生センター	課長補佐	〒951-8680 新潟県新潟市川岸町2-11-11 Tel.025-267-3100 Fax.025-231-1051 kensa@nhsc.or.jp
"	三間屋純一	静岡県立子ども病院血液腫瘍科	副院長兼 医療安全室長	〒420-8660 静岡県静岡市漆山860 Tel.054-247-6251 Fax.054-247-6243 jmimaya@poppy.ocn.ne.jp
"	石山 洋	静岡県予防医学協会代謝異常等検査室	室長	〒421-1292 静岡県静岡市建穂1-3-43 Tel.054-277-3412 Fax.054-278-7717 ishiyama@shsa.net
"	沼田公介	大阪血清微生物研究所奈良支社検査室	室長	〒634-0530 奈良県橿原市四条町556-6 Tel.0744-24-0530 Fax.0744-24-3507 numata.kosuke@osaka-kessel.co.jp
"	中田幸之介	聖マリアンナ医科大学小児外科	教授	〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1 Tel.044-977-8111 Fax.044-976-5964 k2nakada@marianna-u.ac.jp
"	鈴木恵美子	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	主任技術者	〒355-0002 埼玉県東松山市東平656-1 Tel.0493-22-5639 Fax.0493-21-3732 nsqc-center@angel.odn.ne.jp
"	花井潤師	札幌市衛生研究所保健科学課	技術員	〒003-8505 北海道札幌市白石区菊水9条1丁目 Tel.011-841-7672 Fax.011-841-7073 junji.hanai@city.sapporo.jp
"	原田正平	国立成育医療センター研究所成育医療政策 科学研究室	室長	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1 Tel.03-5494-8297 Fax.03-3417-2694 harasho@nch.go.jp

総括研究報告

－平成17年度研究－

厚生労働省科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業） H16- 子ども -012
主任研究報告書

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

主任研究者 檜山 英三 広島大学自然科学研究支援開発センター 教授
広島大学病院小児外科

研究要旨

神経芽腫マスキリーニング（以下マス）事業は、治療不要な腫瘍の過剰診断と死亡率の低下に関する一定の見解が得られていないことから休止が決定した。この事業の休止の条件として①本症の罹患と死亡の正確な把握、②マスの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価、③本症による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立、の三点について速やかに対応することが示された。そこで、本研究は、これらの課題に対応し、神経芽細胞腫のマスの効果判定および有効なマス事業の開発とこの腫瘍の臨床診断と治療成績向上を目的として平成16年度から開始した。①については、日本小児外科学会、日本小児がん学会の登録例約5000例（マス発見例2500例）を中心に後ろ向き研究を開始した。今年度は、1998年までに発症し、5年後の予後・合併症の調査が終了した3646症例（マス発見例2086例）を集計、病理診断、腫瘍特性の検討を行った。実際の発症年齢分布は、予後良好例が1才未満に分布しているのに対し、予後不良例は1才代、3才代に分布し、多標的仮説に基づいた罹患過程の数理モデル（モンテカルロ数値実験）による検討、現実に近似した4グループ（うち1つのグループは胎内で発生）、に類似し、病理学的検討でも、3グループに分類できることを見いだした。現在、各症例の悪性度、腫瘍特性データとの解析で、本邦からこの腫瘍のリスク分類案を提示し、リスク分類に基づいた新しい治療のガイドラインを策定することを提唱している。②に対して、マスを継続、継続検討中の自治体を中心に、前向き研究の実施時期は昨年生後18ヶ月としたが、後向き研究の検討においてもその時期の適性を示唆する所見を得ており、札幌市も平成18年から18ヶ月施行に変更した。また、この研究を行うべくプロトコルを作成し、現在、保健業の関連者、ご両親等への再開へのご理解を得るべく啓発活動を開始している。③に対して、腫瘍特性解析としての網羅的ゲノム解析から、神経芽細胞腫のゲノム異常は大きく4群に分類されることが判明し、これらの結果から予後不良な腫瘍の新たな腫瘍特性の探索をめざしている。予後不良例の新規マーカー検索、特にカテコラミン代謝系を中心としたLC/MS解析法を用いた一斉解析法が確立され、新たなマーカー探索が可能となり、臨床検体での探索に入った。また、血清中の遊離DNAによるMYCN増幅の検出をはじめ、腫瘍を切除することなく血清で悪性度診断が可能となれば、今後のスクリーニング事業においても有用な知見が得られると考えられ、保存血清、尿を用いて悪性度の高い腫瘍の特異的マーカーを探索中である。

英文抄録

In 2003, Japanese Neuroblastoma Mass-Screening (MS) Program was stopped due to the over diagnosis of the favorable tumors which spontaneously regress or mature, without obvious evidence for mortality decline. As this MS program stopped, the following three conditions were set to be promptly solved: ① accurate estimation of the incidence and mortality rate of neuroblastoma. ② consideration of a new MS program at more effective MS timing with new method. ③ Promotion and establishment of studies to improve clinical diagnosis and treatment aiming to decrease the mortality rate of neuroblastoma. To solve these three conditions promptly, this study has been opened. For the first issue, retrospective study has been begun on approximately 5000 cases including 2500 MS-detecting cases registered in Japanese Societies for Pediatric Surgery and Pediatric Oncology.

In this year, we summarized 3646 cases, including 2086 MS-detected cases, who had been diagnosed until 1998 and followed for 5 years and analyzed pathological and biological findings. Ages at diagnosis in favorable tumors distributed under 1 year of age while unfavourable tumors were found with two distributions in 1 and 3 years old. These data seem to correspond to a mathematical model for process of neuroblastoma development using "target" theory reported last year. Histopathological classification also showed three groups consisting of a favorable one in infants and two unfavourable groups in elder children. At present, we propose the risk grouping of neuroblastoma using these data and a therapeutic guideline according to this risk grouping.

To solve the second issue, we reached a consensus that 18 months old is the appropriate timing for MS last year. The evidences by retrospective study also supported this age. In Sapporo pilot MS projects, the age at MS will be changed from 14 months to 18 months old. Now, we are preparing the protocol of the prospective study evaluating the sample size, observation period, accuracy management, follow-up method with the selection of the control prefectures where MS program will not be performed. To obtain understanding for the purpose of this study, we started to spread propaganda to public health team and parents.

As biological characteristics in tumors, genomic alteration analysis using SNPs array revealed four different groups, indicating the new biological feature of unfavorable tumors. To identify new tumor markers specific for unfavourable tumors, new analytical method using LC/MS for exhausting detection of catecholamine metabolites have been established. Using this procedure, we started to find new markers using serum and urine samples collected from the patients. Evaluation of malignant grade of the tumor using serum sample before tumor resection is very useful for new screening system as well as the decision of therapeutic regimen.

<分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名>

澤田 淳	(京都第二赤十字病院院長)
中山 雅弘	(大阪府立母子保健総合医療センター検査科部長)
杉本 徹	(京都府立医科大学大学院医学研究科小児発達医学教授)
林 富	(東北大学大学院医学系研究科小児医学講座小児外科学分野教授)
福澤 正洋	(大阪大学大学院医学系研究科外科学講座小児成育外科学教授)
金子安比古	(埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所所長)
中川原 章	(千葉県がんセンター研究局局長)
升島 努	(広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座分子治療・デバイス学研究室教授)
赤澤 宏平	(新潟大学医歯学総合病院医療情報部教授)
大瀧 慈	(広島大学原爆放射線医科学研究所計量生物研究分野教授)
浜崎 豊	(静岡県立子ども病院臨床病理科医長)

A. 研究目的

生後6ヶ月の全ての乳児を対象とした尿による神経芽細胞腫のマスキリーニング（以下マス）を行う事業（神経芽細胞腫検査事業）は、1970年代に開始され、1985年以降、全国的に施行され、その受診率は80%を越えて継続されてきた。しかし、治療不要な腫瘍の過剰診断による不利益に加え、死亡率の低下に関する一定の見解が得られていないとの根拠から平成15年に休止が決定した（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15年7月30日）。この休止の条件として①本症の罹患と死亡の正確な把握、②マスの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価、③本症による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立、の三点について速やかに対応することが示された。そこで、本研究は、これらの課題に対応し、神経芽細胞腫マスの効果判定および有効なマス事業の開発とこの腫瘍の臨床診断と治療成績向上を目的として開始した。①については、日本小児外科学会と日本小児がん学会で、長年継続してきた二つの登録を併せて後向き解析をする。②については、1才以降を対象とした新たなマス事業についての前向き研究を行う。③については、全国的なマス事業の基で得られた悪性度の異なるグループの腫瘍特性の解析結果から、それぞれの腫瘍グループの発生と経過を解明する。また、全国に凍結保存されている腫瘍サンプルおよび今後の検体をバンク化し、多くの予後関連因子に重み付けをして治療

の層別化に向けたリスク分類のガイドラインを作成する。さらに、血清や尿中の新たな腫瘍マーカーの探索を行ない、神経芽細胞腫の診断技術・治療成績向上に寄与することを目的としている。

B. 研究方法

①後向きコホート解析：1979年から日本小児外科学会および日本小児がん学会に登録されてきた症例約5000例（マス発見2500例）を対象に、病理所見や腫瘍特性を再評価後、発生頻度、治療法と予後の推移を再検討することとした。本年は、5年後の追跡調査が終了した1981年から1998年までの発症例3646例（このうちマスキューニング発見例2086例）を解析することとした。昨年度の多標的仮説に基づいた罹患過程の数理モデル化・罹患年齢に関するモンテカルロ数値実験による検討結果と実際の発生数と予後との関連を検討した。1才未満の症例は、スクリーニング症例が大多数であり、一方、予後不良例は1才10ヶ月、3-4歳に二つのピークが認められた。この結果は、モンテカルロ数理実験の結果とほぼ同様の結果であった。現在、これらの予後良好例を明らかに層別化する方法、また、それぞれの予後不良例に寄与しているがん抑制遺伝子の解明、さらにこれらを層別化する方法について今後検討する。

ついで、病理分類と発症年齢の関連を検討した。その結果、予後良好例は1才未満に多く、1才半くらいまで認められるが、一方で予後不良例は1才頃から認められ、1才代と3才代に二つのピークを認められた。こうしたデータは、先の予後別の発生頻度また、モンテカルロ数理モデルとほぼ一致した結果であった。現在、国際的に本症のリスク分類を統一しようとする試みがなされている。本邦においてもこのリスク分類にデータを提供し、それと共に本邦の最も適したリスク分類を提案した（表1）。このリスク分類にて、新たな治療のガイドラインを策定することで治療成績の向上につながることを期待される。

人口動態調査死亡票から得られる神経芽細胞腫による死亡例から各年度、各地域の登録率を算出し、全体数を推計後、統計学的にマスによる死亡数の減少効果の算定を予定して、厚生労働省統計情報部に申請したが、マスキューニングの有効性の判定に関して申請された前例（黒田班・林邦彦分担研究）の例を取り上げられ、効果判定に対する使用は認可されないとの返答を頂いた。しかし、当研究班は、登録率の算定に用いることを当初から申請している旨を再度上申し、現在、再審査中である。よって、本年度の全体像の推計はできず、来年度に持ち越しとした。

②前向き研究：対象年齢を変更しマス事業を継続或いは継

続予定の京都、大阪、新潟、札幌、静岡、川崎などのマス施行群と、神経芽細胞腫の発生率が同等で、全数登録可能なマスを施行しない自治体を対照群とした前向き研究について、サンプル数と観察期間、マス施行時期、方法と精度管理、受診例および非受診例の追跡調査方法などの具体的プロトコルを作成した（添付資料1）。今後、綿密に自治体と連携、協議し、前向き研究を開始する。昨年度は、その前段階として、予後不良例の増加時期とVMA・HVAの増加してくる時期、予後良好例のVMA・HVAの減少時期などから、適切なマス施行時期として生後18ヶ月が適切であるとの合意を得たが、本年度は実質上のプロトコル作成を主な作業内容とした。

③腫瘍特性解析：マス事業の継続下に得られた腫瘍検体（マス発見例、臨床発見例）の分子生物学的な腫瘍特性データを全国から集積し、追跡調査から得られる悪性度との関連性から、各因子に重みづけをして、悪性度を規定する因子を検討することを目指して検討した。また、腫瘍組織の特性をマイクロアレイ、DNAチップ(SNPsアレイ)等の新しい解析法で、解析し再検討した。この際、後向き研究で追跡調査が終了した検体については連結不可能匿名化し、腫瘍バンク化して、腫瘍特性を再検討、あるいは新たな研究の支援とし、本症による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立のための基盤整備を行う。さらに、臨床データと腫瘍特性を解析し、本邦の神経芽細胞腫での腫瘍特性のリスク分類の本邦案を作成した。さらに、新たな腫瘍マーカー検索として、血清遊離DNAを用いたMYCN遺伝子増幅の検出法の開発を行った。

表1: 神経芽細胞腫のリスク分類[案] 平成17年12月
* : 日本のデータから提唱する新たな分類項目

年齢	病期 (INSS)	MYCN 増幅	骨・骨髄転移	病理 (INPC)	リスク
any	1	+	-	any	Low
	2A, 2B, 3, 4	+	-	any	High
	4S	+	-	any	Intermediate
≥ 18	3, 4	-	any	any	High
	1, 2A, 2B	-	-	any	Low
< 18	4	-	any	any	Intermediate *
	any	-	-	F	Low

INSS: international neuroblastoma staging system, INPC: international neuroblastoma pathological classification, 病理分類: UF: unfavorable, F: favorable

また、血中・尿中のカテコラミン類のプロテオーム解析法を用いて、悪性度の高い腫瘍の特異的マーカー探索を行い、尿中VMA・HVAに替わる有効な腫瘍マーカーの検出をめざした。そこで、まず、血中の小分子とくにアルブミンなどに結合したカテコラミン類の一斉分析法を開発し、これらの方法を確立した。

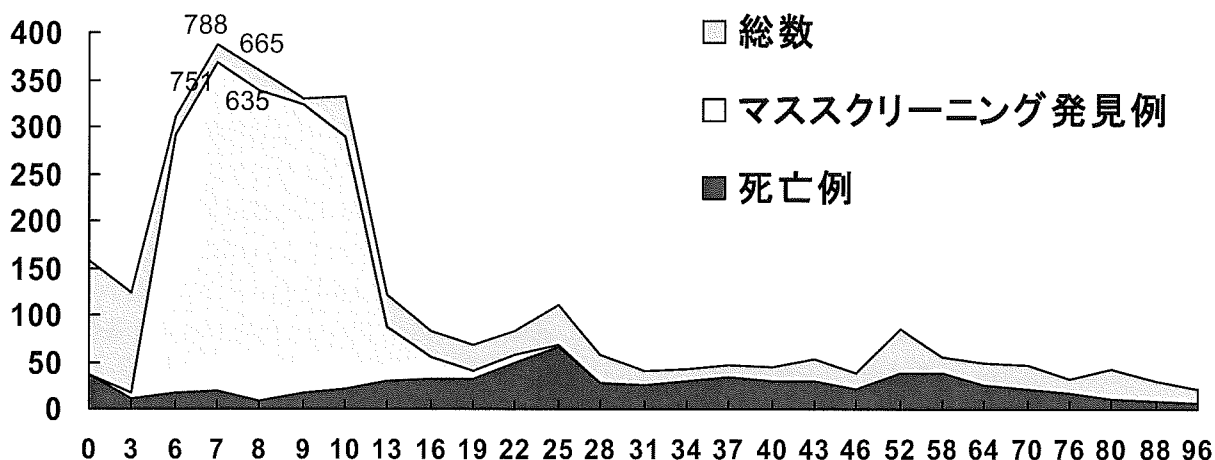


図1：神経芽細胞腫の罹患年齢とその分布

C. 研究結果

①後向きコホート解析：二つの学会の登録症例を照合して得られた症例のうち、1981 から 1998 年までの治療開始例で 5 年後の予後が追跡しえた約 3646 例のデータを集積して、実際の解析を開始した。昨年度の検討では、多標的仮説に基づいた罹患過程の数理モデル化および罹患年齢に関するモンテカルロ数値実験による検討により、現実近似した 4 群に分けられ、1 つは胎生期に発症する群で、実際には残りの 3 群が生後に発症するモデルが得られていた。本年度の実際の解析では（図 1）、マスキリーニング発見例が大多数の 1 才未満の症例の群が予後良好であったのに対し、1 才以降に 2 つのピークを認め、ほぼ数理モデルと一致した結果であった。昨年度から継続した病理学的検討では、神経芽細胞腫の発症分布は 3 グループに分類され、これらのモンテカルロ数理解析と一致した結果となった。疫学解析と病理所見の両面から、明らかに腫瘍の悪性度が異なるグループが分類され、これらの自然歴がある程度明らかになり、また、予後良好な腫瘍は生後 18 ヶ月頃までに発症することが示され、前向き研究に対して大きなエビデンスとなった。

乳児神経芽腫プロトコール登録 674 例における治療後の再発症例は 31 例（4.6%）でマスキリーニング発見例での再発が 25 例（554 例中 4.5%）であった。マス例、臨床例の 5 年生存率は 82.9%、33.3% であり、マス例での再発症例は有意に予後良好であった（ $p=0.01$ ）。マス発見後の再発例での死亡は 4 例のみであり、全てが MYCN 増幅例であり、乳児例ではマス例で MYCN 非増幅例は全例生存していることから、MYCN 増幅例を除いてこのように再発するような症例は早期の治療介入により、良好な予後が期待できるこ

とが示された。

一方、施設レベルでのマス施行世代において 1 歳代に臨床発見された神経芽腫症例 12 例についての検討では、ほとんどが予後不良例であった。次に 18 カ月未満 7 例と 18 カ月以上 5 症例を比較すると、本邦病期分類 III 期 3 例がすべて 18 カ月未満発見例であったのに対し、18 カ月以上発見例はすべて IVA 期症例であった。生物学的予後因子は 18 カ月以上症例において検索し得た 3 例全例が嶋田分類 unfavorable、MYCN 増幅、DNA ploidy とすべての項目において予後不良因子を有していた。今回の検討では、欧米の 1 歳代神経芽腫と比較しても予後不良例が多く、本邦ではマスがこれら症例の臨床像に影響を与えていることが示唆された。

集計された 3646 症例について、33 項目を検討した。まだ、中間報告の段階であるが、ダンベル型以外の因子は、単因子解析で全て有意差を認めた。多因子解析では、病期、MYCN 増幅、に加えて、骨髄転移が有意な因子として認められ、本邦特有の病期分類である IV-B 期が有意な予後因子となる可能性も考えられ、今後の詳細な検討とした。

②前向き研究：昨年度は、施行時期を変えてマスを継続、継続検討中の自治体関係者等を交えて、実施時期と方法について論議した。本年度は、その結果を踏まえて、従来の生後 12 ヶ月、14 ヶ月、18 ヶ月マスのパイロットスタディでは、明らかに予後良好な腫瘍が発見されており、今回の後向き研究の結果も踏まえて、生後 18 ヶ月で施行することに確認した。更に、実際のプロトコル作成を行うため、統計学的に判定可能なサンプル数と観察期間、方法・精度管理、追跡調査方法などについて討議した（添付資料 1）。その結果、3 年間でほぼ 50-60 万出生する地域を施行対象地域とし、

後向き研究から発生率が同等で、全数登録可能なマスを施行しない自治体を対照群として選定し、北米のケベックの解析と同等の規模を目標に行うこととした。中央病理診断と凍結組織を用いた腫瘍特性解析を行う体制、さらにデータセンター（発症例登録とその経過観察）と治療について現在、第3次対がん総合戦略研究事業「進行神経芽腫に対する標準治療確立および新規治療開発のための研究 (H16-がん-039)」の基で企画されている JNBSG（日本神経芽細胞腫スタディグループ）にその業務を依頼した。インフォームドコンセントについては、大阪では実際の運用が開始されている形式を踏襲し、各地域、地区で運用しやすい形で運用することとした。インフォームドコンセントの内容は、神経芽細胞腫の早期発見のために検査を受けること、検査で陽性であった時は指定病院にて精査を受けることの同意とし、治療に関しては全例治療介入となるがその同意は各担当医師のもとで再度施行されることとした。

大阪府で行われている1歳半に時期を変更して神経芽腫マスキングに公費負担で検査を実施してきた。平成16年5月から平成17年12月まで、神経芽腫スクリーニング新規受付数は、平成16年度15,344人で、平成17年度17,524人であった。精密検査受診者は8人、神経芽腫5人、陰性3人であった。6,574名中、1例の発見率で、明らかな過剰診断例はなかった。5名は治療中であるが、腫瘍なし生存中で、18ヶ月施行マスキングを肯定する結果であった。

③腫瘍特性解析：小児医療7施設及び乳児神経芽腫登録症例997例に1施設（国立成育医療センター）の症例を加えた1121例について、INPC国際分類（International Neuroblastoma Pathology Classification）による組織型と年齢分布、予後との関連性を検討した結果、1歳半ばを境として、種々の組織型の比率は一定化する傾向があり、組織学的に予後不良群に分類される神経芽腫の比率が年齢的には18ヵ月前後から高くなる。予後不良因子のひとつである *MYCN* 増幅例も未熟な組織型を示す神経芽腫での比率が高く、未熟な組織型および *MYCN* 増幅が1歳代から年長児における神経芽腫の予後不良の主たる要因と考えられる結果であった。

予後不良因子としての分子生物学的検討を目的に、全国主要12施設での約1100例の腫瘍特性の分子生物学的データの集計を行った。測定法、判定基準の差異から、*MYCN* 遺伝子増幅、染色体欠失と増加、核型など集計困難な因子も少なくなく、まずはこれらの腫瘍のバンキングを行うべく、その保存状況を調査し、バンキングに向けた規約づくりを行った（添付資料2）。さらに、凍結組織を用いた腫瘍

特性解析において少量の腫瘍DNAを用いた検査で、感度、精度からも同一判定基準でこれらが一度に解析できる方法として、DNAチップ（SNPsアレイ）法を、昨年導入したが、これらのデータを集積した結果、この腫瘍は大きく4つのゲノム異常のパターンに分類できることが判明した。この中で、染色体全体の増減を主としてゲノム異常の症例は、極めて予後良好であるのに対し、*MYCN* 増幅を認める症例は予後不良であり、のこりの2群（大きな異常を認めない群と、染色体の部分的な増減を認める群）は、中間的な群で予後良好例と不良例がほぼ半数であった。この手法を用いて後向きに保存されている腫瘍の特性を再評価し、追跡調査からの悪性度を用いて各因子に重み付けを行い、総合的に腫瘍特性を評価するリスク分類が進行中である。

血清遊離DNAを用いた *MYCN* 遺伝子増幅判定法の開発を目指して、神経芽腫の治療前の保存血清87例の血清遊離DNAを抽出。血清遊離DNA中の *MYCN*(2p24.1) および対照遺伝子 *NAGK*(*N-acetylglucosamine kinase*, 2p12) をTaqMan法によるReal-time PCR法で各々定量した。*MYCN/NAGK* 値は増幅例では非増幅例に比べ有意に高く ($p < 0.001$)、血清遊離DNAの *MYCN/NAGK* 値の測定は *MYCN* 増幅の有無を判定できる精度の高い手法として期待される結果であった。

また、血清NM23H1蛋白質を、217例の神経芽腫患者（マス発見例131例、臨床的発見例86例）でELISA法を用いて測定したところ、対照小児と比較して神経芽腫患者で高かった ($P < 0.0001$)。 *MYCN* 増幅患者の血清NM23H1蛋白質濃度は *MYCN* 非増幅患者に比較して高く ($P = 0.0006$)、血清NM23H1蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者に比較して短く ($P = 0.034$)、 *MYCN* 非増幅患者 ($P = 0.04$)、1歳未満 ($P = 0.03$)、病期3 ($P < 0.0001$) に限定しても確認された。血清NM23H1濃度は、神経芽腫患者の予後予測に役立つ可能性が示唆された。

さらに、悪性度の高い腫瘍に特異的な新規マーカー検索、特に血中のカテコラミン代謝系を中心とした蛋白解析法として、質量数に応じて分離するLC/MSによるカテコラミン代謝物の一斉分析系の確立を目的として、血液中のカテコラミン一斉分析の前処理濃縮法として内面逆相カラムを用いて大きな分子に付着した小分子を濃縮し、分離する方法の確立を行った。模擬血清試料を用いて検討した結果、カテコラミン代謝産物の一斉分離が可能となり、この手法を用いて新たな分離法を構築することができた。

さらにMALDI-TOF質量分析法による高分子タンパク質検出法の確立をめざし、標準物質で検出感度の検証を行った。

D. 考察

過去 20 年近く継続された生後 6 ヶ月で施行された神経芽細胞腫検査事業は、過剰診断による不利益から、休止となり、社会的にも大きな問題となったが、一方で、これらから得られたエビデンスを神経芽細胞腫の診断と治療成績向上に確実に結びつけることが最も重要であることは言うまでもない。

本年度は、1981 年以降に診断された症例の発生頻度と予後の統計解析と病理所見の検討を行った。その結果、昨年度の数理モデルから神経芽細胞腫は 3 つのグループの結果を支持する結果が得られ、この腫瘍の発生原因とその特性解析に関して意義深い。

これらの三つのグループそれぞれの腫瘍特性を正確に評価し、それぞれのグループのリスク分類が可能となれば治療法選択への指針となり、臨床にきわめて有意義である。そこで、現有のデータでリスク分類の本邦案を提示した（表 1）。さらに、治療が必要な腫瘍に特異的な腫瘍マーカーが見出されれば、新たなスクリーニング法の開発だけでなく、臨床の場での診断や治療効果の判定に応用可能なマーカーとなる。特に、乳児の再発例の中でマス発見例が臨床発見例に比べ予後良好であったことも、予後不良例の早期発見の有効性を示唆している。予後不良例の新規マーカーの探索のため、本年度に開発した LS/MS を用いたカテコラミン代謝産物の量的な網羅的解析に向けた新たな前処理法は、今後のマーカー探索のみでなく、カテコラミン代謝物測定法の改良、精度管理にも結びつく有用な解析法として期待される。

社会的にも 20 年近く行われたこの事業を通じて得たこのかけがえのない貴重な症例の積み重ねとそれらから得られた腫瘍検体は、世界に類のない唯一無二の財産であり、これらのデータを集積して解析することで、この腫瘍を構成する特性の異なる各グループの発生と自然歴が解明可能である。そのために、腫瘍検体のバンク化と腫瘍特性解析法の標準化が必須であり、それらから学術的・社会的に得られる成果は計り知れない。そこで、本年度は腫瘍バンクにおける腫瘍の登録と使用規定を作成した（添付資料 2）。臨床経過が明らかで匿名化の後バンキングされた腫瘍検体を平等に多くの研究者が使用できる機会が提供できれば、この腫瘍の研究は飛躍的に進歩すると考えられ、将来は国外にその門戸を広げるべきであると考えており、こうした基盤整備を是非に実行したい。実際、20 年近く全国的に継続されたこの事業によって、自然に分化・退縮するグループから予後不良なグループまでの症例が数多く登録され、1000 を超える腫瘍検体が保存されたことは貴重な財産で

ある。これらを詳細に解析することで、この腫瘍の自然歴や新たな特性が詳細に解明されうると考えられ、予後予測可能なリスク分類が作成され、それに従った治療ガイドラインは、治療法の選別と予後向上につながる。また、多くの研究者に利用可能な腫瘍バンクであれば、本邦から世界に向け多くの知見が発信され得る。こうしたデータを基に、腫瘍特性から治療が必要な悪性度の高い腫瘍のみを正しく分別し、それらの早期発見をめざした新たなマスキリーニング事業を展開し、また、新たな治療法を開発することは、神経芽細胞腫全体としての治療成績の向上につながる。従来のマス事業の反省とともに、この事業で得られたエビデンスを正しく評価することで、初めて国民に納得が得られる成果が示せる。

現在、世界的にも神経芽細胞腫のリスク分類を行うべくワーキングが活発に行われており、本事業はこれらへの大きな科学的根拠を与えうる研究事業であることに間違いはない。そこで、本研究班の解析データを基に、本邦の神経芽細胞腫のリスク分類案を提唱した（表 1）。国際分類と異なっており、病理因子、骨転移、骨髄転移を導入した。さらに、病理所見だけでなく、腫瘍特性の解析が進行すればよりクリアなリスク分類ができるものと考えて現在、研究を続行中である。

これと平行して、腫瘍標本を切除しなくとも悪性度判定を可能とすべく、神経芽細胞腫患児の血清中 DNA を用いた MYCN 増幅の検討、さらに血清 NM23H1 濃度測定などの検討を行い、将来リスク分類に組み込んでより確かな診断・治療へと応用することを目指している。

さらに、悪性度の高い腫瘍に特異的な新規マーカー検索を目的に、特に体液中のカテコラミン代謝系を中心とした蛋白解析法として、内面逆相カラムを用いた前処置による LC/MS によるカテコラミン代謝物の一斉分析系を確立した。この方法は、今後、保存血清を用いて悪性度の高い腫瘍の特異的なマーカー探索に応用する。また、MALDI-TOF 質量分析法による高分子タンパク質検出法の確立により高分子タンパク質複合体の検出の可能性も示しており、将来はプロテインチップや組織マッピングへの利用が可能である。さらに、高分子タンパク質の一斉解析が可能となれば、病態解析や人工ワクチンのためのプロファイリング技術などへの応用が考えられる。

こうした腫瘍特性の鍵を握る遺伝子変化の解明と悪性度の高い腫瘍に特異的なマーカーの検出は、腫瘍の個性であるしそれぞれの悪性度から治療法を選択する個別化医療につながり、神経芽細胞腫の新たな治療戦略が構築される。

E. 結論

①後向きコホート解析：1998年までに発症し、予後・合併症の調査が終了した3646例（マス発見2086例）は、厚生労働省報告の症例数のほぼ80%を占めると推定され、ほぼ満足いく登録数と考えられるが、死亡票使用が未許可の時点で無理であり、来年度以降の課題となった。現在、症例の詳細についての調査、病理診断、腫瘍特性についてより多くのデータを集積中であり、また、人口動態調査死亡票の神経芽細胞腫死亡例から年度、地域毎の登録率を算出する予定である。さらに現在、各症例の悪性度・予後と腫瘍特性データとの関連に加えて、医療費、合併症、QOLを含めたコストベネフィットの面からの解析を施行中である。

さらに重要な課題は、これらの多くの解析結果から、神経芽細胞腫のリスク分類を作成することである。本邦の神経芽細胞腫の治療のガイドラインを作成するためにも、コンセンサスを得たリスク分類を行うことが不可欠であり、その原案を提出した。

②前向き研究：施行時期を変えたマス事業の継続、継続予定の自治体を対象に、過剰診断防止、有意な死亡率減少とコストベネフィットからの効果判定を行うべく、昨年から施行時期の検討に引き続き、実施方法などプロトコルを検討してきた（添付資料1）。昨年に、新たなマスの施行時期としては生後18ヶ月が妥当と結論し、札幌市にはこの結果を受け入れていただき、平成18年度から生後14ヶ月から18ヶ月に変更が決定した。施行時期については、ほぼ足並みが揃ったと考えられ、今後、有意な結果を出すために施行対象人口を増やすために、施行する地域の拡大と、マスを行わない対象地域の選定が課題となっている。さらに、マス施行やマス発見例のインフォームドコンセントの取得法、治療法の統一化などの問題もほぼ解決され、症例を登録するデータセンターは、JNBSG（日本神経芽細胞腫スタディグループ）に協力を依頼し、今後、再開に対する国民や関係各位のご理解を得るべく、結果の公表、公開講座などを積極的に行うことが必要と考えている。

③腫瘍特性解析：マスによる予後良好例の発見状況、予後不良例早期発見への効果判定のため、全国各施設での腫瘍特性解析データの集計に伴い、1000例を超えるデータを得ることができた。が、それぞれの施設が独自の方法と判定基準を用いていることから、全国にすでに治療された1000例以上のデータが蓄積されているが、多くの因子を同時に同じ判定基準で再検討する方法としてSNPsアレイ解析法を確立した。その結果から、ゲノム異常としては幾つかのサブグループに分類され、これらが腫瘍特性とどのように関わっているかを詳細に検討することが課題である。後向

き登録症例のうち1200例以上の凍結保存腫瘍が把握され、本邦ならではの腫瘍バンク設立が可能となり、この規定を作成し、実用化をめざしている。

さらに、血清を用いた悪性度診断法へのアプローチとして、血清DNAによる腫瘍のMYCN遺伝子増幅の検討、血清NM23H1濃度などのマーカーの評価をおこなった。また、尿中、血中のカテコラミン代謝物を含めた低分子マーカーの一斉解析法としてLC/MSによる網羅的検出法の確立、さらに、高分子蛋白の網羅的解析も含めて悪性度の高い腫瘍の特異的マーカーの探索を精力的に行っており、臨床サンプルにて解析段階に入っており、今後の成果が期待される場所である。

F. 健康危険情報

神経芽細胞腫のリスク分類が提唱され、これに基づく発症分布がほぼ示された。この事実に基づいた治療のガイドライン作成が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Hiyama E](#), Hiyama K. Molecular and biological heterogeneity in neuroblastoma. *Current Genomics*, 6:319-332, 2005.
- 2) [Kaneko Y](#), Kobayashi H, Watanabe N, Tomioka N, [Nakagawara A](#). Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatric Blood & Cancer*, 6:285-291, 2006.
- 3) [Okabe-Kado J](#), Kauskabe T, Honma Y, Hanada R, [Nakagawara A](#), [Kaneko Y](#). Clinical significance of serum NM23H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Science*, 96:653-660, 2005.
- 4) [Gotoh T](#), Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tuchiya K, Ohira M, [Nakagawara A](#), Kuroda H, [Sugimoto T](#). Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Oncology*, 23: 5205-5210, 2005.
- 5) [Misawa A](#), Inoue J, Sugino Y, Hosoi H, [Sugimoto T](#), Hosoda F, Ohki M, Imoto I, Inazawa J. Methylation-associated silencing of the nuclear receptor 112 gene (NR112) in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification. *Cancer Research*, 65:10233-10242, 2005.

- 6) Tanaka T, Iehara T, Sugimoto T, Hamasaki M, Teramukai S, Tsuchida Y, Kneko M, Sawada T. Diversity in neuroblastomas and discrimination of the risk to progress. *Cancer Letters*, 228:267-270, 2005.
- 7) 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 Research*, 65: 828-834, 2005.
- 8) Aoyama M, Ozaki T, Inuzuka H, Tomotsune D, Hirato J, Okamoto Y, Tokita H, Ohira M, Nakagawara A. LMO3 interacts with neuronal transcription factor, HEN2, and acts as an oncogene in neuroblastoma. *Cancer Research*, 65:4587-4597, 2005.
- 9) Inamori K, Gu J, Ohira M, Kawasaki A, Nakamura Y, Nakagawa T, Kondo A, Miyoshi E, Nakagawara A, Taniguchi N. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in favorable neuroblastomas: Involvement of its effect on apoptosis. *FEBS Letters*, 580: 627-632, 2006.
- 10) Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene*, in press.
- 11) Nakagawara A. Molecular and developmental biology of neuroblastoma. Chapter 5. In *Neuroblastoma*, Eds. N-K. Cheung & S. Cohn, Springer-Verlag, Heidelberg. 41-53, 2005.
- 12) Ohira M, Oba S, Nakamura Y, Hirata T, Ishii S, Nakagawara A. A review of DNA microarray analysis of human neuroblastomas. *Cancer Letters*, 228:5-11, 2005.
- 13) 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 neuroblastoma *Cancer Cell*, 7:337-350, 2005.
- 14) Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *The American Journal of Pathology*, 167:213-222, 2005.
- 15) 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 Letters*, 228:29-35, 2005.
- 16) Oue T, Inoue M, Yoneda A, Kubota A, Okuyama H, Kawahara H, Nishikawa M, Nakayama M, Kawa K. Profile of neuroblastoma detected by mass screening, resected after observation without treatment: results of the Wait and See pilot study. *Journal of Pediatric Surgery*, 40:359-363, 2005.
- 17) Soh H, Wasa M, Wang HS, Fukuzawa M. Glutamine regulates amino acid transport and glutathione levels in a human neuroblastoma cell line. *Pediatric Surgery International*, 21:29-33, 2005.
- 18) Hasegawa T, Hiyama H, Wada K, Masujima T. Pre-treatment and one-shot separating analysis of whole catecholamine metabolites in plasma by using LC/MS Analytical and Bioanalytical Chemistry, in press.
- 19) Fujikoshi Y, Kanda T and Ohtaki M: LR tests for some linear hypotheses in an extended growth curve model, *American Journal of Mathematical and Management Sciences* in press.
- 20) Made ARCANA and Ohtaki M: Multi-target Models and their Application to Data Analysis of Cellular Mortality due to Radiation Exposure. *Hiroshima J. Med. Sci.* 54(1), 9-20, 2005
- 21) Satoh K, Ohtani K, Ushijima M, Isomura M, Matsuura M, Miki T, and Ohtaki M: Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms Based on a Mathematical Model for Two-Dimensional Data. *Japanese Journal of Biometrics* 25(2), 61-67, 2005
- 22) Ohtaki M, Otani K, Satoh K, Kawamura T, Hiyama K and Nishiyama M: Model-based analysis of microarray data: Explanation of differentially expressed genes between two cell types based on a two-dimensional mixed normal model. *Japanese Journal of Biometrics* 26(1), 31-48, 2005.
- 23) 檜山英三、山岡裕明： 神経芽細胞腫スクリーニング小児医学, in press.
- 24) 檜山英三、家原知子、金子道夫： 神経芽腫 小児がん, 42:311-321, 2005.
- 25) 檜山英三、山岡裕明： - 周産期スクリーニングへの

- 新しい考え方と進歩 - 神経芽細胞腫のスクリーニングの展望と問題点. 周産期医学, 35:1278-1282, 2005.
- 26) 浜崎 豊、岸本宏志、田中祐吉、山本圭子: 神経芽腫の予後、とくに DNA ploidy によるタイプ分類および組織型との関連性. 小児がん, 42:216-221, 2005.
- 27) 長谷川朝美、檜山英三、和田克哉、升島努: LC/MS によるカテコールアミン類及びその代謝物の一斉分析法の確立. 日本マスキリーニング学会誌, in press.
- 28) Hosoda M, Ozaki T, Miyazaki K, Hayashi S, Furuya K, Watanabe K, Nakagawa T, Hanamoto T, Todo S, Nakagawara A. UFD2a mediates the proteasomal turnover of p73 without promoting p73 ubiquitination. *Oncogene*, in press.
- 29) 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 beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 16665-16675, 2005.
- 30) Koshikawa N, Maejima C, Miyazaki K, Nakagawara A, Takenaga K. Hypoxia selects for high-metastatic Lewis lung carcinoma cells overexpressing Mcl-1 and exhibiting reduced apoptotic potential in solid tumors. *Oncogene*, in press.
- 31) Machida T, Fujita T, Ooo M L, Ohira M, Isogai E, Mihara M, Hirato J, Tomotsune D, Hirata T, Fujimori M, Adachi W, Nakagawara A. Decreased expression of pro-apoptotic BMCC1, a novel gene with the BNIP2 and Cdc42GAP homology (BCH) domain, is associated with poor prognosis in human neuroblastomas. *Oncogene*, in press.
- 32) Ozaki T, Nakagawara A. p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Science*, 96: 729-737, 2005.
- 33) 米田光宏、大植孝治、福澤正洋、草深竹志、奈良啓悟、野瀬聡子、田中夏美、窪田昭男、奥山宏臣、桑江優子、中山雅弘. 新生児期に発見された悪性固形腫瘍症例の検討. 周産期新生児誌. 41: 714-720, 2005.
- 34) Toyabe S, Cao P, Kurashima S, Nakayama Y, Ishii Y, Hosoyama N, Akazawa K. Actual and estimated costs of disposable materials used during surgical procedures. *Health Policy*, 73: 52-57, 2005.
2. 学会発表
- 1) Iehara T, Sugimoto T, Sawada T, et al. MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma, SIOP. Vancouver, Canada. September 22-25, 2005.
- 2) Sugimoto T, T gotoh, Iehara T, et al. Determination of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA by real-time quantitative PCR, SIOP. Vancouver, Canada. September 22-25, 2005.
- 3) Yoneda A, Kusafuka T, Fukuzawa M, et al. Estimated clinical feature of neuroblastoma after the cessation of mass screening in japan - analysis of 100 cases detected through mass screening. 37th Congress of International Society of Pediatric Oncology, Vancouver. September 21-24.
- 4) Eiso Hiyama, Takeshi Kobayashi, Arata Kamimatsuse, Hiroaki Yamaoka, Keiko Hiyama, Masahiko Nishiyama, C. Patrick Reynolds, Taijiro Sueda. Genomic alterations that are associated with altered gene expression in neuroblastoma. 96th Annual Meeting of American Association for Cancer Research., Anaheim, CA, USA. April 16-20, 2005.
- 5) Eiso Hiyama, Megu Ohtaki. USE OF Mathematical model based on "target" theory to evaluate natural history of human neuroblastoma. 37th Congress Interanational Society of Pediatric Oncology. Vancouver, Canada. September. 21-24, 2005.
- 6) Eiso Hiyama, Arata Kamimatsuse, Miyuki Onitake, Hiroaki Yamaoka, Keiko Hiyama, Masahiko Nishiyama, C. Patrick Reynolds, Taijiro Sueda. Genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis for validation of neuroblastoma biology. 37th Congress Interanational Society of Pediatric Oncology. Vancouver, Canada. September. 21-24, 2005.
- 7) 久保田耕司, 杉山礼隆守, 田弘之, 青木悠里, 長谷川朝美, 升島 努, 前田昌子, 檜山英三: LC/MS によるマスキリーニングのための尿中カテコールアミン類の分析法の開発. 第 12 回クロマトグラフィーシンポジウム, 福岡, 2005. 5. 19-20.
- 8) 長谷川朝美, 青木悠里, 久保田耕司, 升島 努, 檜山英三, 前田昌子: LC/MS による神経芽細胞腫診断のための血清カテコールアミン代謝物の一斉分析. 第 18 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 静岡, 2005. 8. 5-7.

- 9) 青木悠里, 植村雅子, 小田 寛, Gertraund Hayn, Urs Matter, 升島 努: クライオディテクター MALDI-TOF/MS による高分子高感度分析. 第 18 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 静岡, 2005. 8.5-7.
- 10) 長谷川朝美, 青木悠里, 久保田耕司, 升島 努, 檜山英三, 前田昌子: LC/MS による神経芽細胞腫診断のための血清カテコールアミン代謝物の一斉分析. 日本分析化学会第 54 年会, 名古屋, 2005. 9. 14-16.
- 11) 青木悠里, 植村雅子, 小田 寛, Gertraund Hayn, Urs Matter, 升島 努: クライオディテクター MALDI-TOF/MS による高分子高感度分析. 日本分析化学会第 54 年会, 名古屋, 2005. 9. 14-16.
- 12) 長谷川朝美, 青木悠里, 久保田耕司, 升島 努, 檜山英三, 前田昌子: LC/MS による神経芽細胞腫診断のための血清カテコールアミン代謝物の一斉分析. 日本マスキリーニング学会, 久留米, 2005. 10. 7-8.
- 13) 長谷川朝美, 青木悠里, 久保田耕司, 升島 努, 檜山英三, 前田昌子: 血中カテコールアミン代謝物一斉分析のための前処理法の確立及び LC/MS 分析. 第 16 回クロマトグラフィー科学会議, 岐阜, 2005. 11. 7-8.
- 14) 長谷川朝美, 植村雅子, 吉田孟史, 久保田耕司, 升島 努, 檜山英三: LC/MS による神経芽細胞腫診断のための新規マーカーの検索. 日本薬学会第 126 年会, 仙台, 2006. 3. 28-30.
- 15) 家原知子, 細井 創, 浜崎 豊, 田中丈夫, 畑江芳郎, 金子道夫, 黒岩 実, 麦島秀雄, 中川原 章, 草深竹志, 田尻達郎, 河野嘉文, 澤田 淳, 杉本 徹: 乳児神経芽腫プロトコール登録例における再発症例の検討. 小児がん学会, 宇都宮, 2005. 11.25-26.
- 16) 杉本 徹, 家原知子, 細井 創, 浜崎 豊, 田中丈夫, 畑江芳郎, 金子道夫, 黒岩 実, 麦島秀雄, 中川原 章, 草深竹志, 田尻達郎, 河野嘉文, 澤田 淳: 乳児神経芽腫全国統一治療プロトコールの実施. 小児がん学会, 宇都宮, 2005. 11. 25-26.
- 17) 竹島清美, 入江明美, 稲岡一考, 中山雅弘, 島本太香子, 米田光宏, 井上雅美, 河敬世: 大阪府における 1 歳半神経芽腫スクリーニング. 第 33 回日本マスキリーニング学会, 久留米, 2005.10.7-8.
- 18) 浜崎豊, 小林康次, 井上健, 中山雅弘, 桑江優子, 田中祐吉, 加藤啓輔, 田中水緒, 岸本広志, 村上仁彦, 堀江弘, 横山繁昭, 木村幸子: 神経芽腫の臨床病理学的検討—多施設・多数例の調査・研究. 第 21 回日本小児がん学会, 宇都宮, 2005.11.
- 19) 中山雅弘, 竹島清美, 入江明美, 稲岡一考, 島本太香子, 米田光宏, 桑江優子, 窪田昭男, 井上雅美, 河敬世: 大阪府における 1 歳半神経芽腫スクリーニング—1 年間の経験から. 第 21 回日本小児がん学会, 宇都宮, 2005.11.
- 20) 桑江優子, 中山雅弘: 当センターで経験された胎児期、新生児期の腫瘍性疾患. 第 21 回日本小児がん学会, 宇都宮, 2005.11.
- 21) 浜崎 豊, 小林庸次, 中山雅弘, 田中祐吉, 岸本宏志, 堀江 弘, 横山繁昭, 他: 神経芽腫の臨床病理学的検討—多施設・多数例の調査・研究—. 第 21 回日本小児がん学会, 宇都宮, 2005.11.
- 22) 米田光宏, 草深竹志, 福澤正洋, 他: FISH 法により神経芽腫 MYCN 増幅をどう評価するか?—増幅パターンと臨床像の比較より. 第 42 回日本小児外科学会総会, 千葉, 2005.6.1-3.
- 23) 米田光宏, 草深竹志, 福澤正洋, 他: 臨床発見された 1 歳代神経芽腫症例の検討: 18 カ月未満発見症例は予後良好か? 第 21 回日本小児がん学会, 宇都宮, 2005.11.25-26.
- 24) 家原知子, 細井 創, 浜崎 豊, 田中丈夫, 畑江芳郎, 金子道夫, 黒岩 実, 麦島秀雄, 中川原 章, 草深竹志, 田尻達郎, 河野嘉文, 澤田 淳, 杉本 徹: 乳児神経芽腫プロトコール登録例における再発症例の検討. 小児がん学会, 宇都宮, 2005.11.25-26.
- 25) 杉本 徹, 家原知子, 細井 創, 浜崎 豊, 田中丈夫, 畑江芳郎, 金子道夫, 黒岩 実, 麦島秀雄, 中川原 章, 草深竹志, 田尻達郎, 河野嘉文, 澤田 淳: 乳児神経芽腫全国統一治療プロトコールの実施. 小児がん学会, 宇都宮, 11.25-26.
- 26) 檜山英三, 山岡裕明, 末田泰二郎, 上松瀬新, 檜山桂子, パトリックレイノルズ: 神経芽細胞腫における遺伝子発現変化と関連したゲノム異常検索. 第 64 回日本癌学会学術総会, ワークショップ小児がん, 札幌, 2005. 9. 14-16.
- 27) 檜山英三, 山岡裕明, 末田泰二郎, 小林健, 檜山桂子: 進行神経芽腫の分子診断と新たな治療法—進行神経芽腫のマイクロアレイ解析からみた分子標的の解析—. 第 42 回日本小児外科学会総会, 幕張, 2005.6.1-3.
- 28) 檜山英三: 神経芽細胞腫マスキリーニングから得られたエビデンスと今後. 第 33 回日本マスキリーニング学会, 久留米, 2005.10.7-8.
- 29) 檜山英三: 神経芽細胞腫マスキリーニングに関する厚生労働科学研究班の成果と今後の展望. 第 28

回日本マスキリング学会技術部会，久留米，
2005.10.8.

- 30) 檜山英三，山岡裕明，西村真一郎，小林正夫，末田泰二郎，檜山桂子：神経芽細胞腫の腫瘍特性解析を目的としたゲノムワイド解析. 第21回日本小児がん学会，宇都宮，2005.11.21-22.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許出願
 - 1) 赤澤宏平、鳥谷部真一、八代貴史. 間接費按分プログラム (特許 2005-150008, 出願中)
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

添付資料 1：

マスキリーニングの有効性検証のための前向き介入研究（実施要綱）

平成 17 年 10 月

1. 目的

神経芽細胞腫の早期発見による治療成績の向上を目的として 1980 年頃から開始された生後 6 ヶ月児を対象とする神経芽細胞腫検査事業（神経芽細胞腫マスキリーニング、以下 M S と略す）は、昭和 60 年に全国的に展開され、ほぼ 20 年が経過した。しかし、平成 16 年度から 6 ヶ月の乳児を対象としたこの事業は、一旦休止することが決定された。その理由は、M S によって本症の発生率が明らかに増加し治療が不要である予後良好例に対して過剰な診断と治療が行われたこと、予後が不良な例の早期発見による死亡率の減少に一定の見解が得られていなかったこと、によるとされ、その休止の条件として、

- 1) 本症の罹患と死亡の正確な把握
- 2) M S の実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価
- 3) 本症による死亡の減少をめざした臨床診断と治療の向上のための研究推進と実施体制の確立

の 3 点について速やかに対応することが示された。一方で、奇しくもこの休止が決定した後に、厚生労働科学研究（黒田班）の分担研究として行われた林邦彦教授（群馬大学）を中心とした神経芽細胞腫検査事業の前向きコホート研究では、M S を受診した群に有意の死亡率が低下したことが報告された。これは、欧米での短期間の神経芽細胞腫の M S の効果が無効であったとの結果とは相対するものであるが、これらの欧米の検討は短期間であっただけでなくその検討方法にも幾つかの重大な欠陥があることが指摘されるに至り、16 年度の M S 休止の決定が時期早尚であったことも否めない。この M S 休止にあたり、マスキリーニングの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価を検討課題に掲げられたのもこうした背景からとも考えられる。一方で、過剰診療の問題は神経芽細胞腫の M S を休止に導いた大きな原動力であり、過剰診療を最小限とし、かつ有効な M S 事業の構築をめざすことが求められている。こうした M S 事業の構築は、とりまおさず、6 ヶ月 M S の休止の条件の 2、及び 3 に対する対応に他ならない。

そこで、本プロジェクトは、休止にあたり掲げられ

た問題とくに、上述 2 の問題を解決するために、自治体ごとに実施時期を変更して継続されている M S 事業を対象に、罹患率あるいは死亡率だけでなく、患児や家族の QOL、コストベネフィットなど多方面から M S の有用性を推定・評価するためのプロスペクティブスタディを行うことを目的としている。また、今まで本邦で行われてきた 6 ヶ月 M S の結果得られた多くのエビデンスを詳細に解析し、科学的根拠に基づいて計画された。

厚生労働科学研究の檜山研究班では、平成 16 年度の研究結果として、過剰診療を最小限にし、さらに有効性のあるマスキリーニング時期について 1 年間かけて多方面からの意見を聴き検討し、マスキリーニングの時期を 1 歳 6 か月時に移行すべきであるといういくつかの科学的根拠を得ている。科学的根拠の詳細は付録を参照されたい。この結果に基づき、M S を 1 歳 6 か月に実施した際の M S の有効性を、5 歳までの罹患率と死亡率をプライマリーエンドポイントとして評価することを目的としている。

本研究の特徴は以下のとおりである。

- (1) 1 歳 6 か月に実施する M S の死亡率減少効果を評価するプロスペクティブスタディは、本研究が世界で初めてである。
- (2) これまでの日本のマスキリーニング論文は、全乳児がマスキリーニング受診を義務付けられていた条件下での受診群と未受診群の比較であった。従って、セレクションバイアスの影響を除去できないままのエビデンスに終始していた。本研究では、M S 実施地域とそれ以外の未実施地域を比較するので、マスキリーニングの有効性を評価するための比較可能性が保証される。
- (3) 1 歳 6 か月以降に発見された小児神経芽細胞腫（以下 NB）の治療プロトコールは、全国で統一可能である。
- (4) VMA および HVA 検査の精度管理を充実させるとともに、LC/MS の技術を導入することで精度を上げることができる。

2. 研究デザイン

前向き介入試験

MS 実施群に対して、比較可能な未実施群を設定してフォローアップ調査する。

全例、治療介入とし、無治療経過観察は行わない。

できれば、JNBSG（日本神経芽細胞腫スタディグループ、平成 18 年度発足にむけ現在準備中）の提唱する統一プロトコールで治療する。

3. 対象

MS 実施群（MS 受診例）：

実施自治体：京都府（京都市を除く）、大阪府（大阪市を除く）、札幌市

静岡、新潟、熊本、川崎 等 有料で実施している地域

MS 未実施群（MS 非受診例）：

上述以外で本プロジェクトに協力できる自治体から、本研究班がいくつかの基準に基づき選別した地域（MS 非実施地域）を含めて、非受診例

4. 研究期間

症例集積期間：平成 18 年 4 月から平成 22 年 3 月までの 4 年間（18 ヶ月ですでに開始している京都府、大阪府はそれ以前の群も対象とする。）

フォローアップ期間：平成 27 年 3 月まで

5. 症例数

MS 実施群：4 年間での約 60 万人

MS 未実施群：60 万人以上

上のサンプルサイズは以下の条件の下で算出した。

(1) 5 年間の累積死亡率が受検地域群 出生 10 万人対 2、非受検地域群 出生 10 万人対 5 とする。

(2) カイ 2 乗検定による 2 群の比率の差を、有意水準 5%、検出力 80% の片側検定により検定するものとする。

6. MS の実施時期

1 歳 6 ヶ月とする。1 歳児検診や郵送によって MS の時期を周知させ、1 歳 6 ヶ月を中心に前後 1 ヶ月間に MS 検体を送付するように指導する。

7. MS の検査精度管理

1) HPLC

今回の前向き研究の神経芽細胞腫スクリーニングの方法は、HPLC による方法とする。この場合、全国的に同一のカットオフ値で、同一の検査水準でスクリーニングが行われることが不可欠で、まず、事前のスクリーニング実施者の詳細な方法の検討に基づき、この研究班の検査部会でスクリーニングのための検査プロトコールが作られ、全員がそれに従うこととする。更に、同一のプロトコールでも、実際に、高い水準のスクリーニング検査が行われたことを示すために、この研究班でスクリーニングを行うものは、特定の第三者による外部精度管理を受ける。

2) 外部精度管理

①検査水準の評価

②軽度異常でも正しく見出されているか否かの評価

この 2 点について行われ、不十分な結果がでている検査施設に対しては、即座に、問題点の改良を要請する。これらのことが出来る方法としては、1977 年以来、日本の新生児スクリーニングに採用された方法が、国際的に見ても、唯一のものとする。

3) 新たな精度管理

VMA/HVA などの基準物質を厳密に測定するために、最近、安定同位体標識の VMA, HVA を用いてタンデムマスを利用して正確に測定する方法が報告されてきているので、現在の HPLC の精度管理を精度管理センターで定期的に行うとともに、タンデムマスのような正確な基準物質測定法の導入も検討する。

8. データセンター

(1) データセンターを設置する。

1) 小児外科学会と小児がん学会の NB 登録システムを利用する。

2) JNBSG に以下の作業が可能なセンターを当研究班からプロポーザルとして提出したが、全国的に症例を登録、追跡可能でかつ質の高いデータを集積するデータセンターの設置と稼働を要請する。平成 18 年度からのスタディをめざしていること、既に京都、大阪では 1 歳 6 ヶ月のマスキリーニングが開始されていることから可及的早期の稼働を要請する（成育医療センター）。データセンターの設置された施設には、当研究を倫理委員会に提出し、認可を得る。

3) 小児がん学会、小児外科学会の登録システムと、連携し、整合性のある登録事業を展開し、全数登録か