

## 2. 後ろ向き研究として行うべき項目：

1. 6ヶ月マスキリーニングの効果：死亡率の低下はすでに黒田班の林先生がまとめられている。
2. 対象は 現在 3600 例あまり（マス発見例 2000 例）：  
信頼性のあるデータのみとして解析すべきではとの意見あり  
全体  
マス発見例  
マス発見例を除いたもの  
有症状例  
マス開始以前（1985 年以前出生例） 約 800 例  
マス対象年代の症例

## 3. 検討項目

年齢  
病期  
日本小児外科分類  
INSS：病期 4S の定義  
転移部位  
病理分類：別項  
尿中マーカー  
血中マーカー  
腫瘍特性  
MYCN  
DNA Ploidy  
NTRK1  
腫瘍径

## 4. 検討方法

- 1) 単因子解析
- 2) 多変量解析
- 3) 重みづけ
- 4) リスクの予測

## 5. 国際リスク分類への提言、要望

## 6. マスキリーニング休止後のシミュレーション

## 7. 病理データの解析

乳児神経芽細胞腫グループスタディとの連携  
小児病院での集計データとの照合

## 3. 腫瘍解析研究として行うべき項目：

## A. 腫瘍特性の集積と解析：解析済みデータの評価

1. 中央病理診断：病理分類 INPC（国際分類）の再評価
2. 腫瘍のバンク化：既存の予後関連因子データの解析と再評価
  - 既に 1296 例のデータ、1025 凍結腫瘍が登録済み（全国主要 12 施設）
  - 様々な予後関連因子の評価：MYCN 増幅，1p loss, DNA ploidy, 17q gain 等
3. 有用な予後関連因子の抽出と判定基準の確立
  - 網羅的解析：マイクロアレイ、SNPs アレイの応用
  - リスク分類のガイドライン作成  
腫瘍特性を判定する最小限の因子の選定  
同一判定基準での評価法の確立

## B. 新たな予後不良例のマーカー探索：プロテオームの導入

- 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  
内面逆相カラムによる低分子物質の分離法による血中カテコラミン測定法  
OASIS MCX による尿中カテコールアミン代謝物類の一斉捕集
- 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. マスキリーニング発見例の特性集計

2. 6ヶ月マスキリーニング発見例の中の再発例、死亡例の検討
  - i. 再発例、死亡例の特徴
  - ii. 再発例は予後良好なのか
  - iii. 晩期障害は

## 3. 自然退縮、分化する腫瘍の特徴

## 4. 新規腫瘍マーカーの発見と応用

予後不良な（治療が必要な）神経芽細胞腫に特化したマーカーの候補

## 到達目標

- (1) 6ヶ月マスキリーニング（マス）の正しい効果判定
  - ① 後ろ向き調査での結果
    - 神経芽細胞腫のサブグループ毎の罹患と死亡の正確な把握

- マス休止前後の比較検討
- ② マス休止後の神経芽細胞腫発生状況の推定
- (2) マスの再開の是非、再開するとすれば適切なマス施行年齢を示唆するエビデンスを示す
  - ① 後向き調査から得られたエビデンスを基にした前向き研究の策定
  - ② 前向き研究の結果
- (3) 腫瘍特性解析
  - ① リスク分類（腫瘍悪性度分類）のガイドライン作成
    - 分化退縮する腫瘍の層別化
    - 予後不良でより早期から強力な治療が必要な腫瘍の層別化
  - ② 新規腫瘍マーカーの探索
    - 予後不良例の早期発見法（治療法）の開発

神経芽細胞腫全体の治療成績向上をめざし、本邦のみならず、世界に結果を公表する。

研究成果の学術的・社会的意義について

- 1) 神経芽細胞腫の自然歴解明：神経芽細胞腫検査事業で予後の良い腫瘍から悪い腫瘍までほとんどが把握された（本邦のみにある貴重な財産）
  - 3つの異なるグループがある
    - 特性を解析し、診断と治療に応用する
    - それぞれの発生を規定する因子を明らかにする
- 2) 有効なマススクリーニングの構築
  - 予後不良な腫瘍の早期診断法の確立
  - コストベネフィットの高いスクリーニング法の研究
- 3) 腫瘍特性解析：多くの腫瘍の特性がすでに解析済みである
  - 腫瘍特性からのリスク分類のガイドライン作成
    - 治療法の選択、テーラード医療への応用
  - 腫瘍のバンク化
    - 基礎的研究
    - 新たな腫瘍マーカー探索
    - 有効な診断法、治療法の開発

悪性度の低い腫瘍から高い腫瘍までバンク化されると、多くの研究の推進と実施体制を確立する基盤整備となり、本邦のみで可能な有意義な成果が数多く得られる。

## 2. 前向き研究についての現状

檜山 英三

(広島大学)

神経芽細胞腫の新たな検査事業開始をめざした前向き研究の現状説明

### ① 開始の時期について

厚生労働省母子保健課との折衝では、休止した経緯から、再開するにはそれなりの説明が必要と考えられる。そこで、急な臨床研究は現場の戸惑いを生む可能性があり、十分な啓蒙と小児保健、地域保健に関わる人や母親の理解が必要

### ② 死亡個票の使用申請について

厚生労働省の統計局に申請中であるが、アスベストの対応等でかなり事務手続きが遅れている様子であり、まだ、認可を得ていない。

### ③ 保健所長、衛生部長への説明 等

厚生労働省母子保健課などから、保健所長会、衛生部長会などで、研究成果を公表しそれを評価していただく機会を得る事としている。

以上について、説明された。

討論：正式なプロポーザルを提出することが第一であることが確認された。

- ① 科学的に実証できること
- ② コストベネフィット
- ③ ヘルシンキ宣言にのっとるスタディ
- ④ 国内、国外の評価
- ⑤ 後ろ向きデータを反映したもの
- ⑥ 過剰診断を最小限にして、死亡率を下げる方法

前向き研究班である澤田・中山先生に最終のプロポーザルをまとめていただく方針が確認された。

## 3. 川崎市における MB-MaS 休止後の対応

中田 幸之介

(聖マリアンナ医科大学)

- 休止後に続けて経験した進行 NB の存在と NB-MaS 検査受託施設のその後の対応について報告された。平成 16 年 4 月の NB-MaS 休止後、生後 10 ヶ月児を対象にスクリーニングを継続し、1 年以内に続けて 4 例の神経芽腫を経験した。このうちには NB-MaS が有効であった可能性を示唆する症例が 2 例あった。そこで川崎市からの受託事業である NB-MaS を再施行する方の策を考案した。

■ 平成 16 年 10 ヶ月乳児数：13,342 名 発見例なし

討論：10 ヶ月で行う正当性が問題

あまり年齢にこだわると 1 才以前は神経芽腫の検査をしてはいけなくなる

偶然に発見される神経芽腫をどうするのか？

臨床で見つかるものとどう差をつけるのか？

#### 4. 日仏伊の神経芽腫死亡率の比較

西 基

(北海道医療大学)

日本とイタリア、フランスの神経芽細胞腫の死亡率を 1-5 歳 5-10 歳に分けて白血病との比較で検討し、マスキリーニングによって日本の死亡率が明らかに低下し、一方、フランス、イタリアでは延命効果は認めるものの全体の死亡率は減少していない事を報告した。

討論：

前向き研究をどう行うか？

札幌を二つに分けて行って統計的意味はほとんどない。

受検・非受検による意識の差は大きなバイアスである。

臨床医の手腕、手術療法の差はほとんどない。

やはり、IC の問題である。研究事業として行うべき

札幌が、システムの一環としてよりよい形にするために、マスキリーニングの時期を 1 才 6 ヶ月に変更することが報告された。

#### 5. 「マスキリーニング発見例における再発症例の検討」

杉本 徹、家原知子

(京都府立医科大学小児科学)

乳児神経芽細胞腫統一プロトコールで治療した 674 症例のうち、31 例が再発した。これらの内訳は、マスキリーニング発見例が 25 例 / 554 (4.5%)、臨床発見例は 6 例 / 120 (5.0%) で再発率に差は認めなかった。しかし、これらの症例の 5 年生存率は、82.9% と 33.3% で有意にマスキリーニング発見例が予後良好であった。マスキリーニング発見例の死亡例は、MYCN 増幅例に限られていた。乳児神経芽腫症例の再発は長期に及ぶことがあり、遠隔転移を含めた長期的な観察が必要である。乳児の再発例は MYCN 増幅例を除いて、再寛解が可能であり、良好な予後が期待できることから、適正な再発治療法につ

いての検討が必要であることが報告された。マスキリーニング再発例でも MYCN 非増幅例は予後は良好で、早期発見の効果と考えられた。

討論：

① 再発の定義は、明らかな増大とマーカーが動いているもの。腫瘍が発見されても小さくなるものは除いた。

② 再発の手術時のバイオロジーの変化があったかどうかについては、予後不良例に変化した症例あり。再発例で、初発例になかった MYCN 増幅がみられた症例が報告された。腫瘍内 heterogeneity の関与も示唆された。

③ 再発時にマーカーが上昇したかどうかについては、おおよそで大なり小なり上昇した。

④ MYCN 増幅によって増幅例と増幅なしとにわけべきかどうかについては、ゲイン (3-9 コピー) の扱いが問題となり、明らかな増幅とは一線を画すこととした。3-9 コピーは中間群と考えた方が良いとの意見もあった。

⑤ MYCN 非増幅例は再発しても予後良好である可能性が示された。

⑥ マスキリーニング発見例でも、再発を繰り返している症例も報告された

#### 6. CCC NBL Mini-chip 200 から見たマスキリーニング症例の検討

中川原 章

(千葉県がんセンター)

神経芽腫からオリゴキャップ法で抽出した約 7000 の cDNA を用いた cDNA マイクロアレイにて、この腫瘍の遺伝子発現を解析し、予後と関連した上位 200 個の遺伝子によるミニチップの臨床応用について報告された。

予後予測がかなり可能であることが示された。

上位 200 個の遺伝子の相関について討議され、数理的にこれらは全て独立した因子である可能性は少なく、解析上の問題点が指摘された。

遺伝子発現以外にゲノム異常を加えてリスク分類に応用する方向性が示された。

また、P53 の様に治療によって変化するものの評価が問題であると考えられた。

更に、これらの遺伝子発現が、腫瘍細胞なのか間質細胞なのか、細胞質か核内かなどの検討が今後必要であると

考えられた。

7. 後ろ向き研究の解析法について：解析項目の検討

大瀧 慈

(広島大学原爆放射線医科学研究所)

後ろ向きにて調査した約 3600 例(マス発見例 2000 例)の予後調査の方法、解析ツールが紹介された。これらの結果から、臨床の多くのニーズに応えることを示された。病理データは不十分なのでまだ加味されておらず、早急に加えることとした。

8. 神経芽腫群腫瘍の臨床病理学のおよび生物学的検討

—組織型、年齢、予後との関連について—

浜崎 豊

(静岡県立こども病院)

小児医療 7 施設、および乳児神経芽腫登録症例で組織学的検索がおこなわれた

神経芽腫群腫瘍、997 例(小児 7 施設 656 例、乳児神経芽腫登録 341 例)について、

INPC (International Neuroblastoma Pathology Classification) 国際分類による

組織型と年齢分布、予後との関連性を検討した結果が示された。

1) 神経芽腫群腫瘍 997 例の INPC 組織型

undifferentiated neuroblastoma	2.8%
poorly differentiated NB	80.0%
differentiating NB	8.1%
ganglioneuroblastoma intermixed	2.9%、
GNB, nodular	1.9% (favorable 0.6%、unfav. 1.3%)
ganglioneuroma	4.2%

2) マス例：69.7% 非マス(臨床)例：30.3%

3) マス 695 例：(87.5%は 6 カ月から 12 カ月までの症例)(腫瘍死は 1 例のみ)

unfavorable 群 2.7%  
favorable 群 97.3% (poor.diff.NB, low MKI が 74.5%)

4) 非マス 302 例：

unfavorable 群 48.0% (死亡率 58.8%)  
favorable 群 52.0% (死亡率 5.2%)  
(非マス例のうち、undiff.NB：8.3%、poor.diff.NB が 68.2%)

5) MYCN 増幅：

非マス例、非増幅 123 例：組織型による差はみられない。

30.1%が死亡(2歳以降に死亡率が高い)

非マス、増幅 56 例：未分化、低分化組織型で増幅例の比率が高い。

58.9%が死亡(とくに 18 カ月以降に死亡率が高い)

マス例、非増幅 369 例：年齢、組織型による差異は少ない。

(マス例での増幅例は 6～12 カ月の 3 例のみ)

favorable 群 460 例(全体の 87%)では、非増幅が 415 例、増幅が 45 例(9.8%)

unfavorable 群 67 例(全体の 44%)では、非増幅が 52 例、増幅が 15 例(22.4%)

6) DNA ploidy タイプ分類：

非マス例、タイプ 1：38 例(26.3%が死亡。とくに 18 カ月以降に死亡率が高い)

非マス例、タイプ 2：60 例(31.7%が死亡。2歳以降に死亡率が高い)

非マス例、タイプ 3：39 例(59.0%が死亡。年齢にかかわらず死亡率が高い)

マス例：タイプ 1 が 255 例、タイプ 2 は 89 例、タイプ 3 は 2 例で、タイプ分類と予後との関連性に乏しいが、タイプ 1 で 3 例の死亡(1.2%)がある。

favorable 群 398 例(全体の 75%)：Type 1;276 例, Type 2 ; 102 例, Type 3 ; 20 例

unfavorable 群 76 例(全体の 50%)：Type 1;17 例, Type 2 ; 38 例, Type 3 ; 21 例

以上から、

今回の多数例の後ろ向き調査研究により、マス発見例と非マス(臨床)発見の神経芽腫群腫瘍の間には組織学的、生物学的、および予後に大きな差異のあることが解明された。

神経芽腫の組織型と年齢分布、MYCN 増幅、DNA ploidy などの生物学的特性との間に関連性のあることも示唆された。

favorable 群の MYCN 増幅群が 10%近くと多いことが COG と異なることが指摘された。MYCN 増幅の定義のちがいの可能性も示唆された。

DNA ploidy と MYCN との関連、これらの病理所見の特徴について討議された。

9. 質量分析法による新マーカー探索の狙い

升島 努

（広島大学医歯薬学総合研究科）

血清、尿の新規マーカー探索として、その解析法が紹介された。血清においては、細胞膜に存在する蛋白が多く出てきていること。定性には優れているが、定量はエライザ法に劣ることも紹介された。

血清は 100  $\mu$  l で行っていることが紹介され、来年度に向けて患者サンプルでの検討を行うこととした。

10. 来年度計画、連絡事項

檜山英三（広島大学）

来年度が 3 年目であり、結果を出して公表すること。  
本年度の成果報告を行うこと。  
得られた結果の公表。ホームページの開設と充実。  
腫瘍・組織バンクの立ち上げなどの課題を確認して、本会を終了とした。

11. 閉会

# 分 担 研 究 報 告

# 血清遊離DNAを用いた神経芽腫MYCN増幅判定

分担研究者 杉本 徹<sup>1</sup>

後藤 高弘<sup>1</sup> 細井 創<sup>1</sup> 家原 知子<sup>1</sup> 大平 美紀<sup>2</sup> 中川原 章<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 京都府立医科大学小児科

<sup>2</sup> 千葉県がんセンター研究所生化学部

## 研究要旨

目的: 担癌患者の末梢血中には癌由来の遊離 DNA が優勢に存在する点に着目し、血清遊離 DNA を用いた MYCN 増幅判定法を開発し、実用性を検討する。対象と方法: 京都府立医大小児科および千葉県がんセンターにて悪性度診断を行った神経芽腫のうち治療前の保存血清 87 例を対象とした。血清 200  $\mu$  l より血清遊離 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 で各々定量し、MYCN/NAGK 値から MYCN 増幅の有無を検討した。結果: MYCN/NAGK 値は増幅例では非増幅例に比べ有意に高く ( $p < 0.001$ )、MYCN/NAGK 値の cutoff を 10 とした場合、sensitivity, specificity とともに 100% であった。考察: 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。

## Summary

### Purpose

MYCN amplification (MNA) indicates a poor prognosis in neuroblastoma (NB) and is routinely assayed for therapy stratification. We aimed to develop a diagnostic tool to predict MYCN status using serum DNA, which, in cancer patients, predominantly originates from tumor released DNA.

### Patients and Methods

Using DNA-based real-time quantitative polymerase chain reaction, we simultaneously quantified MYCN (2p24) and a reference gene, NAGK (2p12), and evaluated MYCN copy number as an MYCN/NAGK (*M/N*) ratio in 87 NB patients whose MYCN status had been determined by Southern blotting. Of these patients, 17 had MYCN-amplified NB, and 70 had non-amplified NB.

### Results

The serum *M/N* ratio in the MNA group (median, 199.32; range, 17.1 to 901.6; 99% CI, 107.0 to 528.7) was significantly ( $P < 0.001$ ) higher than the ratio in the non-MNA group (median, 0.87; range, 0.25 to 4.6; 99% CI, 0.82 to 1.26; Mann-Whitney *U* test). The sensitivity and specificity of the serum *M/N* ratio as a diagnostic test were both 100% when the serum *M/N* ratio cutoff was set at 10.0. Among six MNA patients whose clinical courses were followed, the serum ratios decreased to the normal range in the patients in remission ( $n = 3$ ), whereas the ratios increased to high levels in the patients who relapsed ( $n = 2$ ) or failed to achieve remission ( $n = 1$ ).

### Conclusion

Measurement of the serum *M/N* ratio seems to be a promising method for accurately assessing MYCN status in NB, although a larger set of patients needs to be examined to confirm this result.

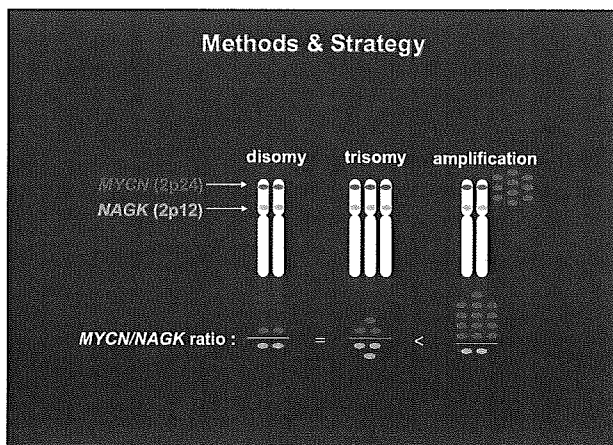
## A. 研究目的

MYCN 増幅は神経芽腫の早期例の 2 ~ 8%、進行例の約 30% に認め、増幅例は悪性度が高く、その評価はリスク分類に基づく治療プロトコール選択に不可欠となっている。一方、担癌患者の血液中には、正常人の数十倍量の遊離 DNA が存在し、そのほとんどは腫瘍由来であることを示唆する報告がある。この血中遊離 DNA を用いて、腫瘍の

MYCN 増幅の判定が可能であるかを検討した。

## B. 研究方法

京都府立医大小児科および千葉県がんセンターにて悪性度診断を行った神経芽腫のうち治療前の保存血清が利用できた 87 例; MYCN 増幅 (サザンプロット法) 17 例 (Stage 1: 1 例, 2B: 1 例, 3: 2 例, 4: 13 例)、非増幅 70 例 (Stage 1: 22 例, 2A+2B: 18 例, 4S: 5 例, 3: 7 例, 4: 18 例)



血清 200  $\mu$  l より QIAmp blood kit(QIAGEN) を用い血清遊離 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 で各々定量し、*MYCN*/*NAGK* 値から *MYCN* 増幅の有無を検討した。

### C. 研究

*MYCN*/*NAGK* 値は増幅例 (median 199.3, range 17.1-901.6, 99%CI 107.0-528.7) では非増幅例 (median 0.87, range 0.25-4.6, 99%CI 0.82-1.26) に比べ有意に高く ( $p < 0.001$ , Mann-Whitney *U* test)、*MYCN*/*NAGK* 値の cutoff を 10 とした場合、sensitivity, specificity, PPV, NPV ともに 100% をえた。

### D. 考察

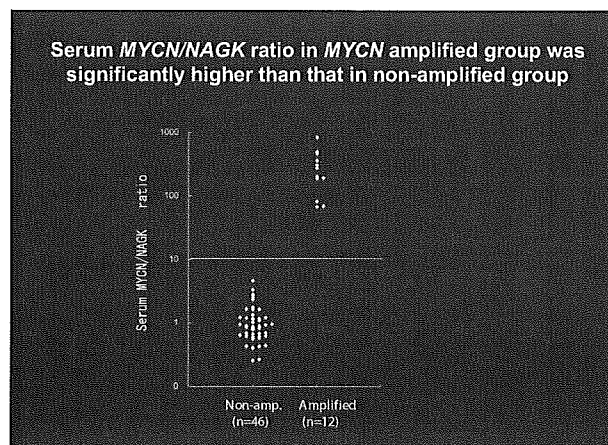
血清遊離 DNA の *MYCN*/*NAGK* 値の測定は *MYCN* 増幅の有無を判定できる精度の高い手法として期待される。メリットとして、1) 術前に非侵襲的に判定可能、2) 従来のサザンブロット法や FISH 法より手技が容易かつ短時間 (約 3 時間) で測定可能、3) 全身状態が悪く Biopsy に耐えられない症例に対しても *MYCN* 増幅判定が可能、などがある。

### E. 結論

1) さらに多数の症例で実用性を検討する、2) *MYCN* 増幅例における *MYCN*/*NAGK* 値の治療効果・再発マーカーとしての意義、3) *MYCN*-gain 症例検出の可能性、4) 血清遊離 DNA 抽出法の最適化 (白血球 DNA 混入の回避など) を検討する必要があり、多施設の協力を得たい。

### F. 参考文献

1. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224:1121-1124, 1984.



2. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, et al: Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313:1111-1116, 1985.

3. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, et al: Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 19:93-101, 1997.

4. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al: Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J Clin Oncol* 11:1466-1477, 1993.

5. Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, et al: Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer* 51:2116-2120, 1983.

6. Sozzi G, Conte D, Leon M, et al: Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol* 21:3902-3908, 2003.

7. Sozzi G, Musso K, Ratcliffe C, et al: Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: A prospect for early diagnosis. *Clin Cancer Res* 5:2689-2692, 1999.

8. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, et al: Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin Cancer Res* 5:2297-2303, 1999.

9. Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, et al: Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: Clinicopathological correlations. *Cancer Res* 59:3251-3256, 1999.

10. Combaret V, Audouy C, Iacono I, et al: Circulating *MYCN* DNA as a tumor-specific marker in



- neuroblastoma patients. *Cancer Res* 62:3646-3648, 2002.
11. Gotoh T, Sugihara H, Matsumura T, et al: Human neuroblastoma demonstrating clonal evolution in vivo. *Genes Chromosomes Cancer* 22:42-49, 1998.
  12. Spitz R, Hero B, Skowron M, et al: *MYCN* status in neuroblastoma: Characteristics of tumours showing amplification, gain, and non-amplification. *Eur J Cancer* 40:2753-2759, 2004.
  13. Gelmini S, Orlando C, Sestini R, et al: Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure c-erbB-2 oncogene amplification. *Clin Chem* 43:752-758, 1997.
  14. Claudia CR, Maria LB, Gian PT, et al: Real-time quantitative PCR for the measurement of *MYCN* amplification in human neuroblastoma with the TaqMan detection system. *Clin Chem* 45:1918-1924, 1999.
  15. Sozzi G, Conte D, Mariani L, et al: Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res* 61:4675-4678, 2001.
  16. Swinkels DW, Wiegerinck E, Steegers EAP, et al: Effect of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. *Clin Chem* 49:525-526, 2003.

# 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

分担研究者 杉本 徹<sup>1</sup>

家原 知子<sup>1</sup> 細井 創<sup>1</sup> 澤田 淳<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 京都府立医科大学大学院医学研究科小児発達医学

<sup>2</sup> 京都第二赤十字病院

## 研究要旨

目的：乳児神経芽腫プロトコール登録例における、マス・スクリーニング発見例（マス例）での再発症例について検討した。  
 対象と方法：乳児神経芽腫プロトコール 94,98 に登録された、674 例を対象とした。結果：治療後の再発症例は 31 例（4.6%）であった。マス例での再発が 25 例（554 例中 4.5%）であった。局所再発が 14 例で遠隔転移再発は 16 例、部位不明が 1 例であった。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（ $p=0.01$ ）。マス例での死亡は 4 例のみであり、全てが *MYCN* 陽性例であった。考察：遠隔転移を含めた長期的な注意深い観察が必要である。さらに、マス例で *MYCN* 非増幅例は全例生存していることから、再発後の治療介入により、良好な予後が期待できる。

## Summary

**Aims:** We examined clinical characteristics of relapsed cases registered in the Japanese Infantile Neuroblastoma Cooperative Study. And we investigate whether or not these relapsed cases can be cured completely by re-treatment, and also whether they can be prognosticated from these biological features.

**Patients and Methods:** 674 patients were treated in the Japanese prospective Study, from 1994 to 2004.

**Results:** 31 cases (4.6%) relapsed after the treatment, and 25 out of them (4.5% : 25/554) were detected through mass screening (mass cases), 6 (5.0%: 6/120) were diagnosed clinically (non-mass cases). Cases of local recurrence were 14, cases of metastases were 16, and case of unknown site was one.

Over all survival rate was better in mass cases (5-year-OS 82.9%) than in non-mass cases (5-year-OS 33.3%,  $p=0.01$ ). Among these mass cases, only 4 cases died, and they were all *MYCN* amplified cases.

**Conclusion:** We should follow up infantile neuroblastoma patients carefully and over a long period of time, including metastases. We were able to expect excellent prognosis for *MYCN* non-amplified mass patients by re-treatment, because all the cases were alive.

### A. 研究目的

乳児神経芽腫統一治療プロトコールに登録された症例における再発症例を解析することにより、マス・スクリーニング発見例における再発例の臨床像を明らかとする。

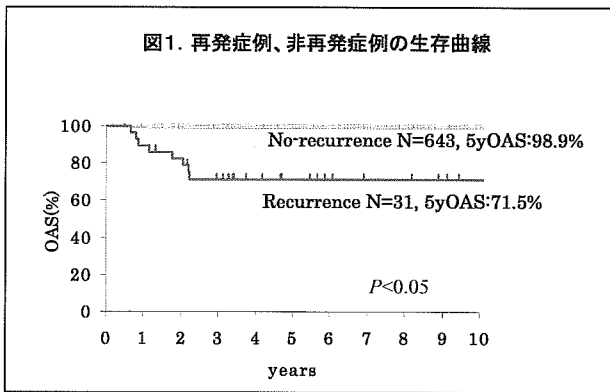
### B. 研究方法

乳児神経芽腫統一治療プロトコール #9405、#9805 に、1994 年 6 月から 2004 年 12 月までに登録された、674 例の乳児神経芽腫症例を対象とした。その内、マス・スクリーニング発見例（マス例）は 554 例で臨床発見例もしくは健診での発見例（非マス例）は 120 例であった。生存率は Kaplan-meier 法を用い、比較検定には Wilcoxon 検定法を用いた。

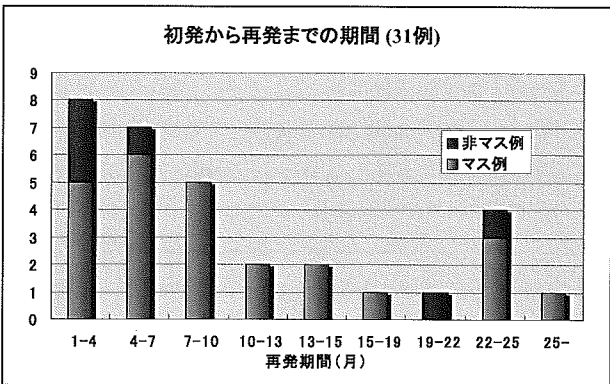
表 1. 再発部位

局所再発	14例
遠隔転移再発	16例
骨	6例
骨髄	6例
遠隔リンパ節	3例
眼窩	2例
皮膚	1例
肝臓	1例
腎臓	1例
肺	1例
脳	1例
部位不明(VMA/HVA上昇)	1例

図1. 再発症例、非再発症例の生存曲線



初発から再発までの期間 (31例)



再発部位と予後

No.	INSS	発見経路	原発部位	年齢	再発部位	転帰
1	1	マス	副腎	(-)	対側 (右) 副腎、両副腎	腫瘍死
2	3	マス	副腎	(-)	骨、骨髄、眼窩	腫瘍死
3	3	マス、その他	後腹膜	(+)	骨髄、大腸骨	腫瘍死
4	4	マス	副腎	(-)	右副腎、大動脈周囲、肝	腫瘍死
5	1	マス	副腎	(-)	右副腎	生存
6	1	マス	副腎	(-)	骨、骨髄、眼窩	生存
7	1	マス	副腎	(-)	骨髄	生存
8	1	マス	副腎	(-)	骨髄、大腸骨	生存
9	1	マス	後腹膜	(-)	一椎間上より発症	生存
10	1	マス	副腎	(-)	大動脈周囲、左大腸骨、右下頸骨	生存
11	1	マス	骨盤部	(-)	椎間隙内 (L5-S1)	生存
12	1	マス	副腎	(+)	頭骨	生存
13	2A	マス	胸部	(+)	局所再発	生存
14	2A	マス	骨盤部	(+)	局所再発	生存
15	2A	マス	胸部	(+)	上肢隔、頸部リンパ節	生存
16	2A	マス	副腎	(+)	不明 (VMA HVA再上昇)	生存
17	2B	マス	副腎	(+)	右副腎	生存
18	2B	マス	副腎	(+)	局所再発	生存
19	2B	マス	骨盤部	(+)	局所再発	生存
20	2B	マス	後腹膜	(+)	骨髄	生存
21	2B	マス	胸部	(+)	残存腫瘍の再燃	生存
22	2B	マス	副腎	(+)	腫瘍転移	生存
23	3	マス	骨盤部	(+)	局所再発	生存
24	3	マス	後腹膜	(+)	左上頸部+骨髄	生存
25	3	マス	副腎	(+)	残存腫瘍 (後腹膜)	生存
26	1	乳児健診	副腎	(+)	皮膚、遠隔リンパ節	生存
27	1	その他	胸部	(+)	後腹膜、左後縦隔	他因死
28	3	その他	副腎	(+)	局所再発	他因死
29	4	その他	後腹膜	(+)	局所リンパ節	腫瘍死
30	4	その他	副腎	(+)	骨転移	腫瘍死
31	4	その他	副腎	(+)	小腸	生存

再発症例の予後因子

No.	INSS	発見経路	組織	MYCN	Ploidy	Ip-	Ha-ras	Trk A
1	1	マス	Favorable	28	Diploidy	(-)		
2	3	マス	Favorable	3	Diploidy	(-)		
3	3	マス、その他	Unfavorable	10	Tripleidy	(-)	+	2+
4	4	マス	Unfavorable	14	Diploidy	(-)		
5	1	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)		
6	1	マス	Favorable	1	Diploidy	(-)		
7	1	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)		
8	1	マス	Favorable	1	Diploidy	(-)	3+	
9	1	マス	Favorable	1	Diploidy	(-)	2+	2+
10	1	マス	Favorable	1	Diploidy	(-)		
11	1	マス	Favorable	1	Diploidy	(-)		
12	1	マス	Favorable	1	Diploidy	(-)		
13	2A	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)		(-)
14	2A	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)	2+	
15	2A	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)	+	
16	2A	マス	Favorable	1	Diploidy	(-)	2+	2+
17	2B	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)	+	
18	2B	マス	分類不能	1	Aneuploidy	(-)	2+	+
19	2B	マス	Favorable	1	Diploidy	(-)	+	
20	2B	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)	+	
21	2B	マス	Favorable	1	Diploidy	(-)	3+	
22	2B	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)	2+	2+
23	3	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)	+	+
24	3	マス	分類不能	20	Diploidy	(-)	+	2+
25	3	マス	Favorable	1	Aneuploidy	(-)	+	3+
26	1	乳児健診	Favorable	10	Aneuploidy	(-)	2+	2+
27	1	その他	Favorable	1	Diploidy	(-)	+	+
28	3	その他	分類不能	1	Diploidy	(-)		
29	4	その他	Unfavorable	5	Diploidy	(+)	判定不能	
30	4	その他	Unfavorable	12	Diploidy	(+)	+	+
31	4	その他	Favorable	1	Aneuploidy	(-)		

C. 研究結果

対象 674 例中、再発症例は 31 例 (4.6%) であった。初発から再発までの期間は、1 ヶ月から最長 41.7 ヶ月で、平均 9.9 ヶ月であった。再発症例の病期は INSS 1, 2A, 2B, 3, 4 がそれぞれ 9, 4, 6, 7, 4 例であった。

再発症例 31 例と非再発症例 643 例の比較では 5 年全生存率 (5y-OAS) がそれぞれ 71.5% と 98.9% であり、再発症例は非再発症例に比較して予後不良であった ( $p < 0.05$ ) (図 1)。さらに、再発症例は MYCN 増幅症例が 6 例 (19.4%) と非再発症例の 10 例 (1.6%) に対して、多く見られた ( $p < 0.05$ )。しかし、病期 4 の症例は再発症例で 4 例 (12.9%)、非再発症例で 50 例 (7.8%) と差が見られなかった ( $p = 0.06$ )。

再発症例の再発部位の検討では、局所再発が 14 例で遠隔転移再発は 16 例、部位不明が 1 例であった (表 1)。遠隔再発部位としては、骨・骨髄・遠隔リンパ節・眼窩・皮膚・肝臓・腎臓・肺・脳など多岐にわたった。再発部位による生存率の検討では、局所再発例、遠隔転移再発例の 5y-OAS はそれぞれ 85.7%、60.2% であり、再発部位による予後に差はみられなかった ( $p = 0.125$ )。

再発症例の発見経路の内訳はマス例 25 例 (4.5%)、非マス例 6 例 (5.0%) であった。5y-OAS はそれぞれマス例が 82.9%、非マス例が 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 ( $p = 0.01$ )。病期 1、2、4s の非進行例の割合は、マス例で 19 例 (76.0%)、非マス例で 2 例 (33.3%) とマス例が多かった。生物学的特性では、再発症例においては、MYCN 増幅以外は嶋田 Unfavorable や Diploidy、1p-のある症例や Ha-ras, Trk-A が低発現の症例は非常に少なく、予後不良を示唆する特徴的な所見は見られなかった。マス例 25 例中死亡は MYCN 増幅の 4 例のみで、MYCN 非増幅例は全例再寛解し生存していた。更に、マス例の再発時の治療については、幹細胞移植を併用した大量治療を行ったのは MYCN 非増幅例では 1 例のみで、他 20 例は大量治療なしで再寛解が可能であった。一方、非マス再発例では、6 例中大量治療を行った 2 例のみが生存可能であった。

D. 考察

乳児例は予後良好といわれているが、乳児例の 4.6% に再発が見られることが判った。特に、乳児例の中でも予後良好とされるマス発見例においても 4.5% に再発を認めることが明らかとなり、注意深い経過観察が必要であると思われる。

乳児例の再発部位は局所に留まらず、遠隔転移部位は多岐にわたったが、予後と再発部位の間に相関は見られなかった。また、再発例においては予後不良を示唆する予後因子

は、病期、生物学的因子を含めて特徴的なものは無かった。再発時期は最長41.7ヶ月と長期に及ぶ場合があることより、遠隔転移を含めた長期的な注意深い観察が必要である。

さらに、乳児の再発症例は再寛解が可能であり、特にマス・スクリーニング発見例では MYCN 非増幅例は全例生存しており、これらの症例の再発時治療は一例を除いて、幹細胞移植を併用した大量治療なしで行われている。再発例であっても適切な再治療を行うことにより良好な予後が期待できることから、今後は乳児例に対する適正な再発レジメンについて検討を行いたい。

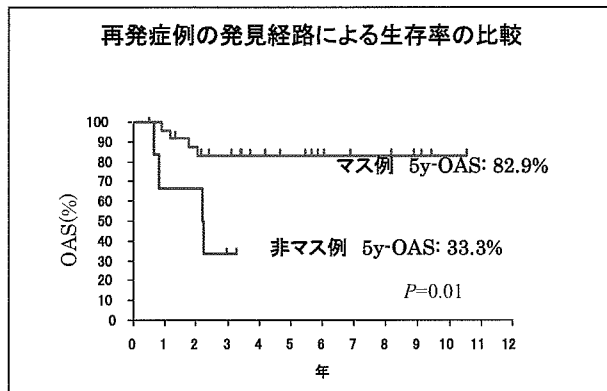
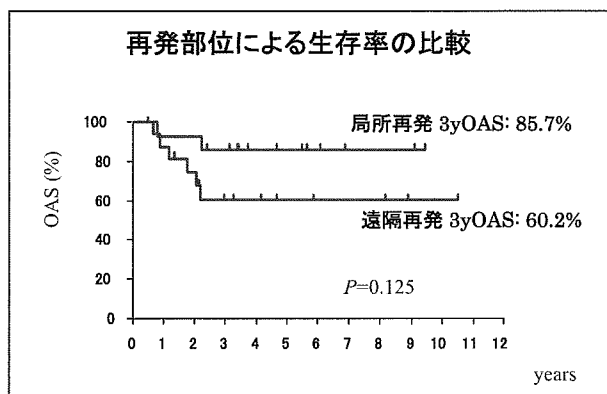
**E. 結論**

乳児神経芽腫例の4.6%に再発を認めた。再発例は遠隔転移や長期再発がみられ、注意深い経過観察が必要である。また、マス例で MYCN 非増幅例は全例生存していることから、再発後の治療介入により良好な予後が期待できる。

**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
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
3. T. Iehara, M. Hamazaki, T. Sawada. Cytogenetic analysis of infantile neuroblastomas by comparative genomic hybridization. Cancer Letter. .178 83-89,2002
4. 浜崎 豊, 家原知子, 澤田 淳, 八反田洋一. マススク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
5. Takeo Tanaka, Takafumi Matsumura, Tomoko Iehara, Tadashi Sawada 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.

No.	INSS	発見経路	MYCN	手術	放射線	幹細胞移植	化学療法	転帰	
1	速	1	マス	26	抽出術 (-)	(-)	PBSCT	NowA1 x3, autoPBSCT, a11oPBSCT	腫瘍死
2	速	3	マス	3	(-)	(-)	PBSCT	NowA1 x4, autoPBSCT	腫瘍死
3	速	3	マス, その他	10	(-)	(-)	PBSCT	GPT-11	腫瘍死
4	速	4	マス	14	(-)	(-)		nowA1 3/4量 x6, 治療拒否	腫瘍死
5	速	1	マス	1	抽出術 (-)	(-)		newA1x3	生存
6	速	1	マス	1	(-)	(-)		A1, A3x3, 維持療法 (G/A2)	生存
7	速	1	マス	1	(-)	(-)		C2x6	生存
8	速	1	マス	1	(-)	(-)		nowA1x6クール	生存
9	局	1	マス	1	抽出術 (-)	(-)		nowA1	生存
10	速	1	マス	1	抽出術 (-)	(-)		D2x3	生存
11	速	1	マス	1	抽出術 (-)	(-)		As5, C2x3, C2+ODP x5	生存
12	速	1	マス	1	(-)	(-)		D2	生存
13	局	2A	マス	1	抽出術 (-)	(-)		(-)	生存
14	局	2A	マス	1	(-)	(-)		D2	生存
15	局	2A	マス	1	(-)	(-)		As12	生存
16	局	2A	マス	1	(-)	(-)		As12	生存
17	局	2B	マス	1	抽出術 (-)	(-)		C2 (OPM, VGR, THP) x7	生存
18	局	2B	マス	1	抽出術 (-)	(-)		As6	生存
19	速	2B	マス	1	抽出術 (-)	(-)		(-)	生存
20	速	2B	マス	1	(-)	(-)		nowA1x6	生存
21	局	2B	マス	1	抽出術 (-)	(-)		C2x4, new A1x3	生存
22	局	3	マス	1	抽出術 (-)	(-)		(-)	生存
23	局	3	マス	1	抽出術 (-)	(-)		C2x6	生存
24	速	3	マス	1	(-)	(-)		PBSCT	生存
25	局	3	マス	1	(-)	(-)		98A3x6, autoPBSCT	生存
26	速	1	乳児腫瘍	10	抽出術 (-)	(-)		A	生存
27	速	1	その他	1	抽出術 (-)	(-)		D2, 98A3x4, autoPBSCT	生存
28	局	3	その他	1	抽出術 (-)	(-)		(-)	他因死
29	速	4	その他	5	(-)	(-)		C2x6	腫瘍死
30	速	4	その他	12	(-)	(-)		D2	腫瘍死
31	速	4	その他	20	抽出術 (+)	(-)		155歳, 緩和医療へ D2x6, 98A3, autoPBSCT	生存



8. 田中丈夫, 家原知子, 細井 創, 杉本 徹, 水田祥代, 澤田 淳: 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
9. 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・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. 日本がん検診・診断学会誌 11 68-73、2004
10. 家原知子: 乳児神経芽腫統一治療プロトコールのこれまでと今後, 小児がん 第41巻第1号 :35-38、2004
11. 杉本 徹, 家原知子, 細井 創, 澤田 淳: 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

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 Res* 65:10233-10242, 2005.
- 2) 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. *J Clin Oncol* 23: 5205-5210, 2005.
- 3) 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 Lett* 228:267-270, 2005.
- 4) Bernardi BD, Balwierz W, Bejent J, Cohn SL, Garre ML, Iehara T, Plantaz D, Simon T, Angelini P, Cama A, London WB, Kramer K, Katzenstein HM, Tortori-Donati P, Rossi A, D'Angio GJ, Evans AE. Epidural compression in neuroblastoma: Diagnostic and therapeutic aspects. *Cancer Lett* 228:283-299, 2005.

### 2. 学会発表

- 1) 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、11月25日-26日(宇都宮、栃木県)、2005
- 2) 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、11月25日-26日(宇都宮、栃木県)、2005
- 3) Iehara T, Sugimoto T, Sawada T, et al. *MYCN* gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma. SIOP, 22th-25th September

(Vancouver, Canada) 2005

- 4) Sugimoto T, T Gotoh, Iehara T, et al. Determination of *MYCN* amplification in neuroblastoma using serum DNA by real-time quantitative PCR, SIOP, 22th-25th September (Vancouver, Canada) 2005.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 宮城県における神経芽腫18ヶ月二次マススクリーニングの報告

分担研究者 林 富<sup>1</sup>

中村 潤<sup>1</sup> 佐藤 智行<sup>1</sup> 吉田 茂彦<sup>1</sup> 石井 智浩<sup>1</sup> 天江 新太郎<sup>1</sup> 和田 基<sup>1</sup>  
 佐々木 英之<sup>1</sup> 風間 理郎<sup>1</sup> 西 功太郎<sup>1</sup> 福沢 太一<sup>1</sup> 中村 恵美<sup>1</sup> 田中 拓<sup>1</sup>  
 土屋 滋<sup>2</sup> 久間木 悟<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 東北大学小児外科

<sup>2</sup> 東北大学小児科

<sup>3</sup> 東北大学加齢医学研究所小児科

## 研究要旨

宮城県において1992年5月から2002年3月までの約10年間の対象 cohort 群で施行した6ヶ月児マススクリーニング（一次マス）と18ヶ月児神経芽腫マススクリーニング（二次マス）の結果を報告する。cohort 群 121,853 人のうち 100,363 人（82%）が一次マスを受検し 20 例の神経芽腫症例が発見された。発見 20 例のうち Brodeur type 1 は 16 例、type 2 が 4 例で、type 3 はなかった。一次マス非受検群 21,490 人からの発症はない。一次マス受検 100,363 人から 3 例の一次マス陰性後発症例がみられた。83,825 人（68%）が二次マスを受検し 7 例が発見された。2005 年 12 月 31 日までに二次マス受検群から 4 例が陰性後発症したので合計 34 例となり 3,584 人に 1 例の割合で神経芽腫が発見、発症したことになる。二次マス発見 7 例の月齢は 18 ヶ月から 29 ヶ月、平均 21.3 ヶ月で 4 例が type 1、3 例が type 2 であり、type 3 症例は発見できなかった。7 例とも無病生存している。一次マス陰性後発症 3 例、一次マス・二次マス陰性後発症 4 例であった。1 例が type 2 で 6 例が type 3 であった。一次マス・二次マス陰性後発症の 4 例は 53 ヶ月、60 ヶ月、48 ヶ月、61 ヶ月で発症し 4 例のうち 2 例は死亡し 2 例は腫瘍（+）生存中である。一次マス発見群は大半が type 1 で、二次マス発見群は type 1 と type 2 がおよそ半々であり、陰性後発症群では大部分が type 3 と 3 様に分類された。神経芽腫マスは尿中 VMA、HVA 濃度を測定する方法とは全く別の方法を考える必要がある。

## Summary

This article reports results of cohort study of neuroblastoma (NB) mass screening for 6 month olds (first screening) and for 18 month olds (second screening) which were performed from May 1992 to March 2002 in Miyagi Prefecture. Twenty NB cases were positive and 3 cases were false negative at the first screening in 100,363 (compliance rate: 82 %) out of 121,853 infants. There were 16 type 1 cases of Brodeur's classification and 4 type 2 cases in 20 positive cases. No NB case was seen in 21,490 infants of unscreened group. Seven cases were picked up by the second screening in 83,825 infants (compliance rate: 68 %). Four false negative cases at the second screening were seen by December 2005. Totally 34 cases appeared from this cohort (1 case in 3,584 infants). Ages of 7 cases detected by the second screening were from 18 months to 29 months (mean 21.3 months). There were 4 type 1 cases and 3 type 2 cases and no type 3 case. They are alive without disease. Ages of 4 false negative cases at the second screening were 53, 60, 48, 61 months, respectively. Three cases were type 3 and remaining 1 case was type 2, and 2 cases of them died and 2 cases were alive with disease. It is difficult to detect type 3 cases at these mass screening system and another screening system is needed.

## 背景

神経芽腫マススクリーニングのゴールは効果的な早期発見システムの確立とそれによる有意な死亡率の低下を得ることである。ここ 20 年以上の基礎的臨床的研究の継続にも関わらず 1 歳以上進行神経芽腫の治療は現在も困難であり

生存率の向上はみられない。

進行予後不良症例の早期発見・治療による治療成績改善を目的として 1985 年に全国的に 6 ヶ月児を対象とした神経芽腫マススクリーニング（以下、一次マス）が開始され宮城県においても同年一次マスを開始した。1985 年～

1991年までは全県で、1992年からは仙台市が政令都市となり独立したため、仙台市を除く県内在住児が一次マスの対象となった。検査法がDip法からHPLC法に移行した1988年からは患児発見率が飛躍的に上昇した。

しかし当初の期待に反していくつかの問題点が明らかとなった。第一は自然退縮例の発見である。神経芽腫には自然退縮がみられることは既にBeckwithが指摘していたが<sup>1)</sup>、一次マスによりその実態が明らかになりマスキリーニングによる過剰診断という神経芽腫特有の大きな問題が生じた。第二は死亡率の低下がみられないか、わずかしみられないことである<sup>2,3)</sup>。この理由として、予後不良例がほとんど発見できないことと、一次マス陰性後発症例が少なからず存在することがある。

これらの問題の解決策として宮城県では6ヶ月に加えて、1歳6ヶ月児を対象とした2回目のスクリーニング(二次マス)を1992年5月に開始した。二次マスは宮城県の財政的な問題もあり2002年3月で終了した。

#### A. 研究目的

宮城県において施行された二次マスの有効性と問題点を分析考察する。

#### B. 研究方法

対象は仙台市を除く宮城県に在住する一次マス、二次マス受検対象児である。1992年5月から2002年3月までのおよそ10年間に二次マス受検対象となる18ヶ月児に相当するcohort群とした。このcohort群から発症した神経芽腫と一次マス、二次マスによって発見された神経芽腫症例全てを集計した。

二次マスについては、1歳6ヶ月児健康診断時に保健婦が二次マスについて説明し採尿セットを保護者に配布した。健診を受けられなかった児については家庭訪問時などに個別に配布した。保護者より郵送された検体(東洋濾紙No.327に受検者尿を滴下し乾燥させたもの)を蒸留水で抽出し試料とした。これをHPLC法でVMA、HVA、クレアチニンを同時測定した。Cut-off値は平均値+2.5SDに設定した<sup>4,5)</sup>。上記cohort群から発生した神経芽腫症例について、Brodeurの分類に従って分類した<sup>6)</sup>。

#### C. 研究結果

##### cohort群からの神経芽腫症例

対象となったcohort群は121,853人である。このうち100,363人(82%)が一次マスを受検し20例の神経芽腫症例が発見された。発見率は5,018人に1例の割合であった。

発見20例のうちtype 1は16例、type 2が4例で、type 3は発見されなかった。一次マス非受検群21,490人からの発症はみられていない。一次マス受検100,363人から後日3例の一次マス陰性後発症例がみられた。3例の発症月齢は28ヶ月、16ヶ月、29ヶ月であった。16ヶ月の症例は二次マスを受ける前に発症したN-myc遺伝子増幅100倍以上の病期IV症例であった。

一方、83,825人(68%)が二次マスを受検し7例が発見された。発見率は11,975人に1例であった。

2005年12月31日までにcohort群は最年少が5歳になり、まだこの群から神経芽腫が発症する可能性はあるが、この時点までに二次マス受検群から4例の陰性後発症例がみられた。合計で34例の神経芽腫が発症した(図1)。従って全体で見ると、この群から3,584人に1例の割合で神経芽腫が発見、発症したことになる。

##### 二次マス発見の7例

二次マスで発見された7例の月齢は18ヶ月から29ヶ月で、平均21.3ヶ月であった。性別では男児1例、女児6例、原発部位は副腎3例、後腹膜2例、縦隔2例であった。病期はIが2例、IIが2例、IIIが3例であり、病期IVはなかった(表1)。7例の一次マス時と二次マス時の尿中VMA、

表1. 二次マス発見7例

Case	Age(mo)	Sex	Site	Stage
1	20	F	adrenal	III
2	21	F	adrenal	II
3	21	F	adrenal	III
4	29	M	retroperitoneum	I
5	21	F	retroperitoneum	III
6	19	F	mediastinum	II
7	18	F	mediastinum	I

表2. 二次マス発見7例の一次マス、二次マス時の尿中VMA、HVA値

Case	VMA( $\mu$ g/mg Cr)		HVA( $\mu$ g/mg Cr)	
	1st MS <sup>#</sup>	2nd MS <sup>*</sup>	1st MS <sup>#</sup>	2nd MS <sup>*</sup>
1	14.3	53.4	21.6	147.2
2	8.4	27.5	13.4	31.4
3	13.8	17.2	23.0	31.3
4	9.3	29.6	17.6	38.2
5	8.0	22.8	12.8	57.0
6	19.4	21.2	36.0	68.9
7	9.2	29.8	21.1	35.3

<sup>#</sup>cut off point: VMA 15.2  $\mu$ g/mg Cr, HVA 24.1  $\mu$ g/mg Cr  
<sup>\*</sup>cut off point: VMA 13.5  $\mu$ g/mg Cr, HVA 24.3  $\mu$ g/mg Cr

表 3. 二次マス発見 7 例の各因子と予後

Case	Shimada <sup>#</sup>	N-myc	DNA ploidy*	Brodeur's type	予後	Follow-up(mo)
1	UH	-	AP	2	alive	152
2	FH	-	AP	1	alive	153
3	FH	-	AP	2	alive	129
4	FH	-	AP	1	alive	104
5	FH	-	DP	2	alive	100
6	FH	-	AP	1	alive	92
7	FH	-	AP	1	alive	85

<sup>#</sup>UH: unfavorable histology, FH: favorable histology  
\*AP: aneuploidy, DP: diploidy

HVA 値を表 2 に示した。Case6 は一次マスで異常高値を示し精査となったが腫瘍なしとして経過が観察された経緯がある。7 例の嶋田分類、N-myc 増幅、DNA ploidy、Brodeur 分類、予後、観察期間を表 3 に示した。4 例が type 1、3 例が type 2 症例であり、type 3 症例は発見できなかった。7 年～12 年の経過観察で 7 例とも無病生存している。

一次マス、二次マス陰性後発症の 7 例

一次マス、二次マス陰性後発症例は 7 例で、一次マス陰性後発症例 3 例、一次マス・二次マス陰性後発症例 4 例である。全て副腎原発で、一次マス・二次マス陰性後発症 4 例中の 1 例が病期 III で、残りの 6 例が病期 IV 症例であった (表 4)。7 例の尿中 VMA、HVA 値を表 5 に示した。一次マス陰性後発症の 3 例のうち Case1 と Case5 は二次マスを受けなかった症例で、28 ヶ月と 29 ヶ月で発症した。16 ヶ月発症の Case 4 は二次マスを受ける前に発症し N-myc 遺伝子増幅 100 倍以上の病期 IV 症例であった。

7 例の嶋田分類、N-myc 遺伝子増幅、DNA ploidy、Brodeur 分類、予後、観察期間を表 6 に示した。Brodeur 分類では、Case 6 以外は type 3 であった。無病生存中は一次マス陰性後 16 ヶ月発症の Case 4 のみで他の一次マス陰性後発症の 2 例は死亡した。一次マス発見 20 例と、二次マス発見 7 例、一次マス、二次マス陰性後発症 7 例を Brodeur 分類で分類した (図 2)。一次マス発見群は大半が type 1 で、

表 4. 一次、二次マス陰性後発症の 7 症例

Case	Age(mo)	Sex	Site	Stage
1*	28	M	adrenal	IV
2 <sup>#</sup>	53	M	adrenal	IV
3 <sup>#</sup>	60	M	adrenal	IV
4*	16	M	adrenal	IV
5*	29	F	adrenal	IV
6 <sup>#</sup>	48	M	adrenal	III
7 <sup>#</sup>	61	M	adrenal	IV

\*: 一次マス陰性後発症例, #: 一次マス、二次マス陰性後発症例

二次マス発見群は type 1 と type 2 がおよそ半々であり、陰性後発症群では大部分が type 3 と 3 様に分類された。

Case 2、3、6、7 の 4 例は一次マス・二次マス陰性後発症例で、53 ヶ月、60 ヶ月、48 ヶ月、61 ヶ月で発症した。

表 5. 一次、二次マス陰性後発症 7 症例の尿中 VMA、HVA 値

Case	VMA(μg/mg Cr)			HVA(μg/mg Cr)		
	1st MS	2nd MS	at diagnosis	1st MS	2nd MS	at diagnosis
1*	12.9	NE	9.3	17.9	NE	67.8
2 <sup>#</sup>	8.7	6.8	264.5	19.4	20.2	413.1
3 <sup>#</sup>	10.8	11.0	586.5	14.4	17.9	220.8
4*	9.1	NE	14.3	19.5	NE	27.6
5*	14.7	NE	247.2	23.6	NE	329.6
6 <sup>#</sup>	9.3	8.0	55.2	18.6	15.4	31.9
7 <sup>#</sup>	12.8	12.6	182.8	22.8	22.4	209.7

\*: 一次マス陰性後発症例, #: 一次マス、二次マス陰性後発症例, NE: not examined

表 6. 一次、二次マス陰性後発症 7 症例の各因子と予後

Case	Shimada	N-myc	DNA ploidy	Brodeur's type	予後 <sup>¶</sup>	Follow-up(mo)
1*	UH	>100	NE	3	dead	18
2 <sup>#</sup>	UH	30	TP ‡	3	dead	23
3 <sup>#</sup>	UH	1	DP	3	dead	79
4*	FH	>100	NE	3	alive	47
5*	UH	1	NE	3	dead	8
6 <sup>#</sup>	FH	1	NE	2	alive+	30
7 <sup>#</sup>	UH	1	DP	3	alive+	4

\*: 一次マス陰性後発症例, #: 一次マス、二次マス陰性後発症例, ‡: TP: tetraploidy, ¶: alive+: alive with disease

図 1. 宮城 6 カ月、18 カ月マスキューニングの結果

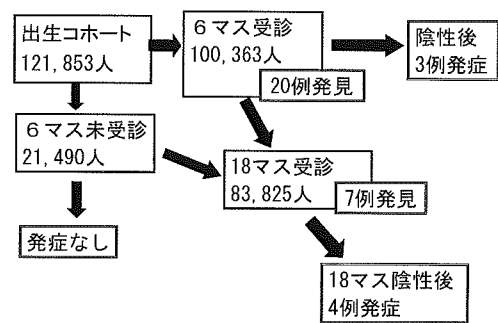
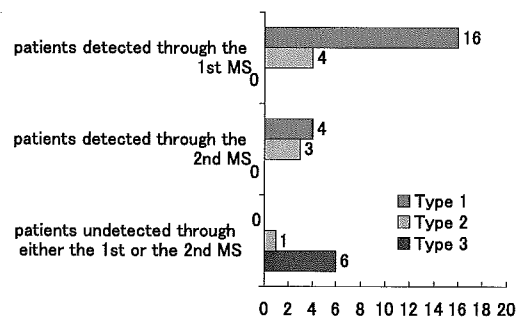


図 2. The number of the patients classified into the 3 clinical and biological subtypes





4例とも一次マス、二次マスの検査結果は正常範囲であったが、発症時にはCase 6は尿中VMA、HVA値は中等度上昇であったが、他の3例では極めて高い値を示した。4例のうち2例は死亡した。Case 6は病期IIIで予後不良因子は認められずtype 2であったが根治術後再発が認められた。Case 7は骨転移遺残がみられ腫瘍(+)生存中である。

#### D. 考察

本邦で開始された一次マスは神経芽腫早期発見早期治療を目的として大きな期待が寄せられたが、自然退縮例の発見と陰性後発症例が大きな問題となった。宮城県で開始した二次マスは、一次マス陰性後発症例を早期に発見治療することが当初の目的であった<sup>7)</sup>。およそ10年間にわたって一次マス、二次マスを施行した結果、一次マスで約5,000人に1例の割合で神経芽腫が発見された cohort 群に対して続いて18ヶ月で二次マスを施行し、約12,000人に1例の割合で神経芽腫が発見された。一次マスと二次マスの陰性後発症例の計7例を集計すると、神経芽腫症例数は合計34例となり3,584人に1例の割合で神経芽腫がみられたことになる。神経芽腫は従来およそ1万の出生に1例の割合で発症すると言われてきたので、宮城県では2回のマスキリーニングにより頻度が約3倍に増加したことになる。

日本小児がん学会神経芽腫委員会から出された一次マス発見例の無治療経過観察の報告によると<sup>8)</sup>、尿中VMA・HVA値は18ヶ月近辺でほぼ正常範囲に低下することから、18ヶ月での二次マスは適切なタイミングと思われた。しかし宮城県の経験では、二次マス発見7例のうち4例がtype 1症例であった。type 1症例の多くが自然退縮例と思われるので<sup>6)</sup>、二次マスにおいても自然退縮例を発見する可能性が高く(半数は自然退縮例?)、その結果として一次マス、二次マス合計で3倍の発生頻度になったと思われる。

我々の二次マスにおいてはtype 3症例を1例も発見することができなかった。マスキリーニングのlength time biasとして、type 1やtype 2のようにゆっくり増殖する腫瘍は発見される確率が高く、急激に病状が進行するtype 3症例をマスキリーニングによって発見することは困難である。

もう一つの重大な問題は二次マスにおいても陰性後発症例がみられることである。約84,000人から7例を発見し、その後に4例の陰性後発症例が発症したことは予想外に高率であった。二次マス陰性後発症例の年齢は48ヶ月から61ヶ月で平均4歳8ヶ月であった。このように二次マス後3年以上経過して発症してくる症例を二次マスで発見するのはほとんど不可能である。また、二次マス陰性後発症例

は多くが進行例で予後不良例であり治療は極めて困難である。元来、5歳以上の神経芽腫はN-myc遺伝子増幅の有無に関わらず予後不良であり<sup>9)</sup>、今回の4例中N-myc増幅例はCase 2の1例のみであったが既に2例が死亡し残りの2例も再発が認められ腫瘍(+)生存中であり無病生存例は1例も得られていない。

#### E. 結論

神経芽腫進行例の早期発見を目的とした尿中VMA、HVA濃度を測定することによるマスキリーニングでは、18ヶ月で施行しても少なからず自然退縮例が発見され、陰性後発症例が発症する。従って、自然退縮とは無関係で予後不良例が優先的に発見されるような、これまでとは異なるスクリーニング方法を考えだす必要がある。

#### F. 参考文献

- 1) Beckwith JB, Perrin EV: In situ neuroblastoma: A contribution to the natural history of neural crest tumors. *Am J Pathol* 43:1089-1104, 1963
- 2) Yamamoto k, Ohta S, Ito E, Hayashi Y, Asami T, Mabuchi O, Higashigawa M, Tanimura M: 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*. 20: 1209-1214, 2002.
- 3) 水田祥代、澤田 淳、金子道夫、他:平成10年(1998年)日本小児がん学会神経芽腫委員会報告—6ヶ月マスキリーニングの現状と問題点—
- 4) 氏家恭子、菊地奈穂子、白石宏行、林 富、中村 潤、土屋 滋:宮城県における1歳6ヶ月神経芽細胞腫マス・スクリーニング. *日本マス・スクリーニング学会誌*, 12: 47-51, 2002.
- 5) 林 富、大井龍司、中村 潤、菊地百合子、小田切範晃、土屋 滋、今野多助、白石広行:神経芽腫に対する18ヶ月児二次マスキリーニングの有効性と問題点. *小児がん* 33: 216-219, 1996.
- 6) Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PSJ: Biology and genetics of human neuroblastomas. *Pediatr Hematol Oncol*. 19:93-101, 1997.
- 7) Hayashi Y, Ohi R, Yaoita S, Nakamura M, Kikuchi Y, Konno T, Tsuchiya S and Shiraiishi H: Problems of neuroblastoma screening for 6 month olds and results of second screening for 18 month olds. *J Pediatr Surg*, 30: 467-470, 1995.

- 8) 日本小児がん学会平成 10-13 年度神経芽腫委員会: マスキリーニングで発見され無治療で経過観察された神経芽腫 82 例. 小児がん 39: 131-136, 2002.
- 9) Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK.: International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. Cancer. 92: 2451-2461, 2001.

**G. 研究発表**

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

# 1歳代に臨床発見された神経芽腫症例の検討

分担研究者 福澤 正洋<sup>1</sup>

米田 光宏<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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)

## 研究要旨

神経芽腫 6 カ月マススクリーニング (MS) の休止後、スクリーニングにより乳児期後半に発見されていた神経芽腫症例のうちの一部は 1 歳代に臨床的に発見されると予想される。したがって 1 歳代の神経芽腫の臨床像を MS 休止前後で比較検討することにより、MS の効果を解析できる可能性がある。そこで、まず現状を把握する目的で、MS が施行されていた世代における 1 歳代神経芽腫症例を検討することとした。また、欧米では現在、年齢による治療層別化の基準を 1 歳から 1 歳半 (18 カ月) に変更することが検討されているが、MS 世代における 18 カ月未満と 18 カ月以上の症例の臨床像も合わせて比較検討した。

## Summary

After the cessation of mass screening of 6-months-old infants for neuroblastoma in Japan, some of the neuroblastomas that had been detected through mass screening might be found clinically in the patients aged 12 to 24 months. Analyzing the effect of 6-months screening might be possible, if the clinical feature in 12- to 24-months-old children was compared before and after the cessation of 6-months screening. Thus, in this preliminary study, we analyzed the clinical feature of 12- to 24-months-old children with neuroblastoma in 6-months screening era. Moreover, recent evidence from European group and COG suggests that the cut-off for age utilized in neuroblastoma risk groups should be increased from the 12-months cut off currently in use to the 18-months cut off. Thus, we also investigated as to whether there was any difference in the clinical feature between the 12- to 18-months age group and the 18- to 24-months age group.

## A. 研究目的

本邦では 2004 年 3 月をもって生後 6 カ月に実施されていた神経芽腫 MS が休止された。これにより従来乳児期後半に MS により発見されていた神経芽腫症例は、①自然退縮や分化により臨床的に発見されずに経過する症例、②腫瘍細胞が増殖し、増大または進行して 1 歳代に臨床的に発見される症例に分かれると思われる。昨年、本研究班の活動としてわれわれが行った MS 発見症例の検討<sup>1</sup>では、②に該当する「スクリーニング休止後に臨床発見される症例」はスクリーニング発見症例の約 20% から 50% になると予想された。これらは MS 休止後には 1 歳代に遅れて臨床発見されると思われる、今後 1 歳代神経芽腫の臨床像が変化すると考えられる。このような状況にある現在、MS 世代の 1 歳代神経芽腫症例を後方的に検討しておくことが重要であると考え、施設内で経験した症例について臨床的検討を行った。

また、従来、神経芽腫の予後に影響する年齢因子として 1 歳 (12 カ月) が治療層別化の基準とされてきた。しかしな

がら、最近欧米ではこの基準を 18 カ月に変更することが検討されている<sup>2,3</sup>。その理由は、多数例の集積データについて各年齢層の治療成績を比較していくと、1 歳から 2 歳の間で徐々に生存率が低下していく現象が観察され、18 カ月を治療層別化の基準とした方が、より適切な治療を行うことができるという結論が得られたためである。しかしながら MS を施行していた本邦においては、1 歳代の神経芽腫の臨床像は欧米と異なることが考えられる。そこで MS を行っていた世代において、12 カ月以上 18 カ月未満と 18 カ月以上 24 カ月未満の症例の臨床像も合わせて比較検討した。

## B. 研究方法

大阪大学及び大阪府立母子保健総合医療センターにおいて経験した神経芽腫症例のうち、以下の条件を満たした 12 症例を対象とした。

1. 生後 6 カ月時に乳児神経芽腫 MS が実施されていた。
2. 1 歳以上 2 歳未満に臨床的に発見された。
3. 2 年以上フォローされている (治療開始後 2 年以内に

表1

症例	月齢	INSS	本邦病期	転移部位	MS	VMA	HVA	NSE	LDH	Ferritin
1	13	3	III	-	未受診	24.3	165.4	7200	3982	2723.0
2	13	4	IVA	BbmV	未受診	97.0	97.0	489	2460	387.0
3	14	3	III	-	不明	317.0	590.0	89	313	24.2
4	15	4	IVB	H	未受診	14.3	47.6	185	ND	71.0
5	16	4	IVA	Bbm	不明	17.0	213.7	326	3918	40.6
6	17	1	III	-	未受診	493.0	327.0	64	650	26.0
7	17	4	IVA	B	未受診	565.5	358.5	257	554	32.9
8	18	4	IVA	Nbm	陰性	15.2	61.7	407	2078	396.1
9	19	4	IVA	BbmHV	未受診	227.0	414.0	454	3747	ND
10	19	4	IVA	B	未受診	11.0	13.0	204	4512	1593.0
11	19	4	IVA	BbmV	陰性	19.9	61.2	350	4701	147.2
12	20	4	IVA	BEbmV	陰性	ND	ND	900	11911	ND

MS:6カ月マスキリーニング、VMA・HVA:ug/mg Cr、NSE:ng/ml、LDH:U/L、Ferritin:ng/ml、ND:測定せず

死亡した症例を含む。

診療録をもとに、臨床像(性別、発症月齢、病期、転移部位、MS受検の有無、治療前の腫瘍マーカー値)、生物学的予後因子(病理組織分類、嶋田分類、MYCN増幅、DNA ploidy)、治療内容および転帰、追跡期間について検討を行った。

### C. 研究結果

まず発見時の臨床像について検討した(表1)。性別は男児7例、女児5例、発症月齢は18カ月未満が7例、18カ月以上が5例で、平均月齢は16.7、中央値は17.0カ月であった。MS受診歴は、陰性3例、未受診7例、不明2例で、MS陰性3例はすべて18カ月以上発症例であった。

本邦病期分類はIII期3例、IVA期8例、IVB期1例で、INSS病期分類で再評価するとIII期の1例がstage1と分類され、その他はstage3が2例、stage4が9例となった。18カ月以上の5例はすべて骨または遠隔リンパ節転移を有する本邦分類IVA症例であった。9例のstage4症例の遠隔転移部位は骨7例、骨髄6例、肝2例、遠隔リンパ節1例、他の臓器転移4例であった。

腫瘍マーカーの値はNSEが2例を除いて全例100 ng/mlを越えており、400 ng/ml以上の症例が5例を占めていた。LDHも8例において1000 U/L以上の著明な高値を示した。18カ月未満と18カ月以上症例において、腫瘍マーカーの値には明かな差を認めなかった。

次に予後因子と治療・転帰について検討した(表2)。

本邦組織分類では、評価可能な検体が得られた10例中、

分化型神経節芽腫1例、神経芽腫花冠細胞型5例、神経芽腫円形細胞型4例であった。嶋田分類は検索し得た9例中、unfavorableが7例で、18カ月以上の3例はすべてunfavorableと判定された。

生物学的予後因子としては、MYCN増幅は検索し得た9例中、5例に増幅が認められ、18カ月以上で検索し得た3例はすべて増幅していた。DNA ploidyは検索し得た8例中diploidまたはtetraploidが7例で、18カ月以上で検索可能であった3例はすべてdiploidまたはtetraploidであった。

治療は原則として、III期症例には手術および化学療法、IV期症例には幹細胞移植併用の大量化学療法を行った。可能な限り治療前に生検を行うことを原則としたが、全身状態が不良であった症例5,11,12では早期の治療開始を優先し、治療前の生検を行わなかった。摘出可能であった症例6ではprimary operationを選択したが、他の11例では、delayed primary operationまたはsecond look operationを選択した。なお、症例1は化学療法中に合併症により死亡したため摘出術を行っていない。症例3は大血管を巻き込んで発育した後腹膜原発神経芽腫で、化学療法に対する反応が不良であったため、自家幹細胞移植を併用した大量化学療法の後摘出術を行い、血管周囲に残存したと思われる腫瘍細胞を標的として術中照射を施行した。IV期症例に対しては全例に幹細胞移植を併用した大量化学療法を施行した。このうち大阪大学で治療した症例3、10、11においてはdouble conditioningによる1回の大量化学療法を行い、リンパ節郭清を伴う広範な摘出術を施行した<sup>4</sup>。大阪府立母子保健総合医療センターで治療した症例5、6、8、9、12