

図1 EGFRとゲフィチニブの作用

制し効果を発揮する (図1). 分子標的薬剤では、腫瘍での標的の発現をみれば、治療効果が得られると考えられていた。しかし、ゲフィチニブでは標的となるEGFRの発現量と臨床効果が一致しない結果が得られている⁹⁾。さらに、近年ゲフィチニブの感受性に関して多くの議論がなされている。非小細胞肺癌に発現するEGFRのチロシンキナーゼドメインに変異のある患者での、ゲフィチニブの有効性が¹⁰⁾報告され、EGFR遺伝子変異が効果の予測に有効である可能性が示された。さらに、2005年にはゲフィチニブの反応性にEGFRの遺伝子のコピー数が重要であること¹¹⁾、EGFRの下流に存在するAKTのリン酸化の状態の重要性が指摘されている¹²⁾。また、分子標的治療薬は、がんの原因となった分子を標的にするため、既存の抗がん剤よりも副作用が少ないと考えられていた。しかし、ゲフィチニブでの間質性肺炎など重篤な有害事象の報告から、やはり、リスクとベネフィットを慎重に評価し投与されるべき薬剤である。また、EGFRに変異があっても化学療法とゲフィチニブとの併用療法では生存率に差はなく有効性は証明されなかった¹³⁾。このように、臨床試験が進行していくにつれ、あらたな知見が集積され、次々

と問題が提起されているのが現状である。したがって、基礎研究と臨床研究が密接に連携し、分子標的治療の開発を行うことが非常に重要である。

小児固形腫瘍の分子標的と分子標的薬

小児に好発する固形腫瘍である脳腫瘍のなかでも glioma ではEGFRが¹⁴⁾、神経芽腫にはTrk受容体¹⁵⁾が、Wilms腫瘍ではHER (human epidermal growth factor receptor)-2¹⁶⁾が、そして medulloblastoma にはHER2とHER4が発現し¹⁷⁾、予後や悪性化に関与していることが報告されてきた。

したがって、小児固形腫瘍においても、腫瘍細胞の増殖に関与する各種の増殖因子とその受容体で標的分子となりうる。代表的なものとしてTrk, EGFR, HER2, VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) あるいはc-Kitなどを挙げることができ、臨床応用できる可能性がある。一方正常細胞には発現していないキメラ遺伝子も標的になる。慢性骨髄性白血病 (CML) のBCR-Abl遺伝子と急性前骨髄性白血病 (APL) のPML/RAR α キメラ遺伝子は典型的な分子標的であり、CMLに対してはBCR-

Abl チロシンキナーゼ阻害剤としてメシル酸イマチニブ (imatinib mesylate, グリベック®), また APL に対して, 全トランス型レチノイン酸 (ATRA) はすでに臨床応用されている. 固形腫瘍では横紋筋肉腫に見られる PAX3/FKHR や Ewing 肉腫の EWS/FLI1 などのキメラ遺伝子も標的分子としての可能性がある.

従来の抗がん剤では, 腫瘍の縮小効果が, 早期臨床試験の効果判定として重要であった. しかし, 分子標的薬剤の場合, 腫瘍の増殖抑制効果や患者の QOL 向上も含めて有効性を評価するようになってきた. 臨床的有効性を評価するには, 薬剤が標的分子に作用していることの証明 (proof of target: POT), 標的分子に作用することで *in vitro* と *in vivo* とともに, 増殖抑制などの効果を示すことの証明 (proof of principle: POP), さらに分子標的薬が客観的に臨床症状や QOL の改善などベネフィットにつながることの客観的な証明 (proof of efficacy: POE) が最終的に必要となる.

悪性横紋筋肉腫様腫瘍への ゲフィチニブの有用性の検討

我々は, 悪性横紋筋肉腫様腫瘍 (malignant rhabdoid tumor; MRT) に対するチロシンキナーゼを阻害するゲフィチニブ (gefitinib, イレッサ®) の効果を検討したので紹介する¹²⁾.

MRT は, 乳幼児に好発する非常に予後の悪い腫瘍である. 組織学的には好酸性封入体の存在が特徴であり, 分子生物学的には *hSNF5INI1* 遺伝子の異常が認められる. 化学療法など治療法が進歩した現在においてもその予後は悪く, 4 年生存率は非進行例では 41.8% であるが, 進行例では 15.9% である. 特に 6 か月未満発症例の 4 年生存率は 8.8% 以下と悲劇的であり¹³⁾, 新規治療法の開発が急務である. そこで, MRT に対する分子標的療法の可能性を検討した.

最初に MRT に対する標的分子を検索した. MRT 腫瘍組織での EGFR の発現を確認した報告はなかったが, MRT 細胞株に EGFR が発現しているという報告はあった. そこで, 我々は, 経験した 2 症例の MRT 組織と, それらよ

り樹立した MRT 細胞株での EGFR の発現を検討した.

使用した MRT 腫瘍組織は組織学的に MRT と診断された, 肝原発の MRT-AN と腎原発の MRT-NS を用いた. また細胞株はこれら 2 例の腫瘍より樹立された MP-MRT-AN (以下 AN 株) と KP-MRT-NS (以下 NS 株) を使用した. これら細胞株では, *INI1* 遺伝子の欠損がみられ, ともに分子生物学的にも MRT 細胞株であることが確認された. 腫瘍組織における EGFR の発現は免疫組織化学法で, 細胞株における EGFR の発現は間接蛍光抗体法と Western blot 法で検討した. 腫瘍組織では AN で瀰漫性に NS では結節性に EGFR の発現を認め, 細胞株では AN 株の 90% と NS 株の 40% に EGFR 陽性細胞を認めた (図 2). また, Western blot 法でも EGFR 蛋白の発現を確認した. これらの結果から, MRT において EGFR が分子標的療法の標的分子となりうることを期待できた. そこで, ゲフィチニブの抗腫瘍効果を *in vitro* と *in vivo* で評価し, MRT の治療へのゲフィチニブの有用性を検討した.

次に, MRT の EGFR がリン酸化し, ゲフィチニブが EGFR のリン酸化を抑制することが可能かを検討した. リン酸化 EGFR の検出は抗 EGFR 抗体を用いた免疫沈降法を用いて, EGFR 蛋白を抽出し, 抗チロシンリン酸化抗体を用いた Western blot 法で評価した. 無血清下で, MRT 細胞株ではリン酸化 EGFR は検出できなかったが, EGF を添加すると強くリン酸化された. しかし, 1 μ M のゲフィチニブ添加により EGFR のリン酸化は抑制され, ゲフィチニブは MRT 細胞株に存在する EGFR のリン酸化を抑制することが確認された (POT) (図 3).

続いて, ゲフィチニブが MRT 細胞株の増殖を抑制するかどうか検討した. まず, *in vitro* での細胞増殖は, 培養細胞にゲフィチニブを添加し, 24 時間ごとに細胞数を計測した. MRT 細胞株にゲフィチニブを 0.1~100 μ M で添加すると, 48 時間後から濃度依存性に増殖が抑制され, IC₅₀ 値は AN 株が 10 μ M で NS 株が 12 μ M であった. また, MRT 細胞に 20 μ M のゲフィチニブを添加した場合, 細胞は小球形に変形し浮

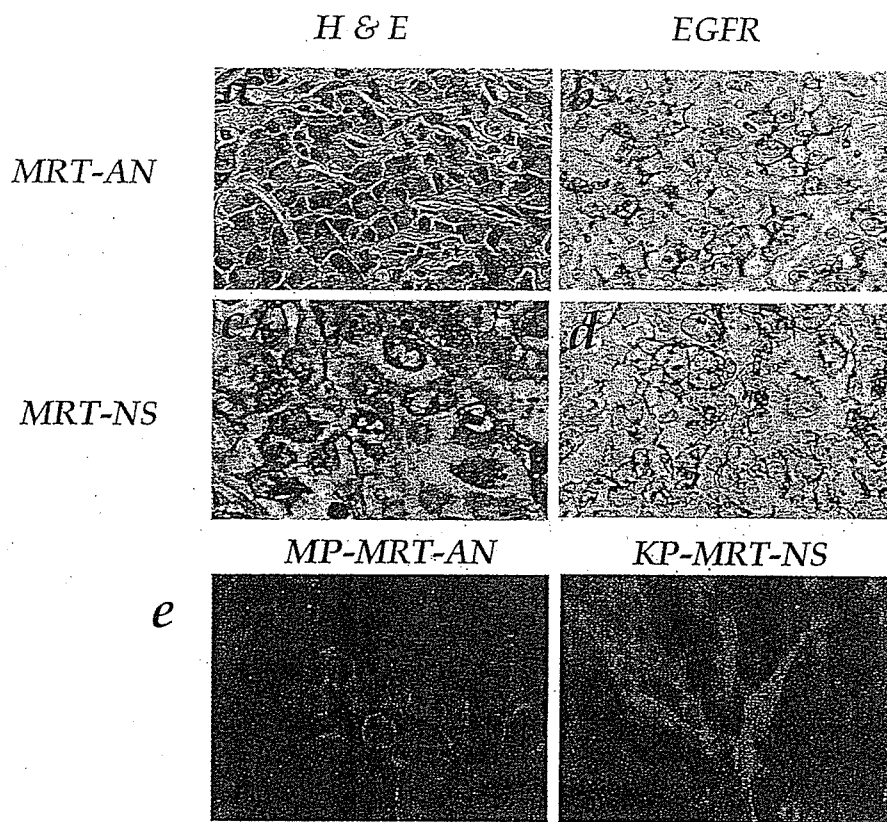


図2 MRT腫瘍組織と細胞株におけるEGFRの発現
 a~d: 腫瘍組織MRT-ANとMRT-NSのH&E染色とEGFRの免疫染色。両腫瘍組織ともに細胞膜にEGFRの発現が認められた(×400)。e: 細胞株におけるEGFRの発現。間接蛍光抗体法によって、細胞膜にEGFRの発現が認められた。

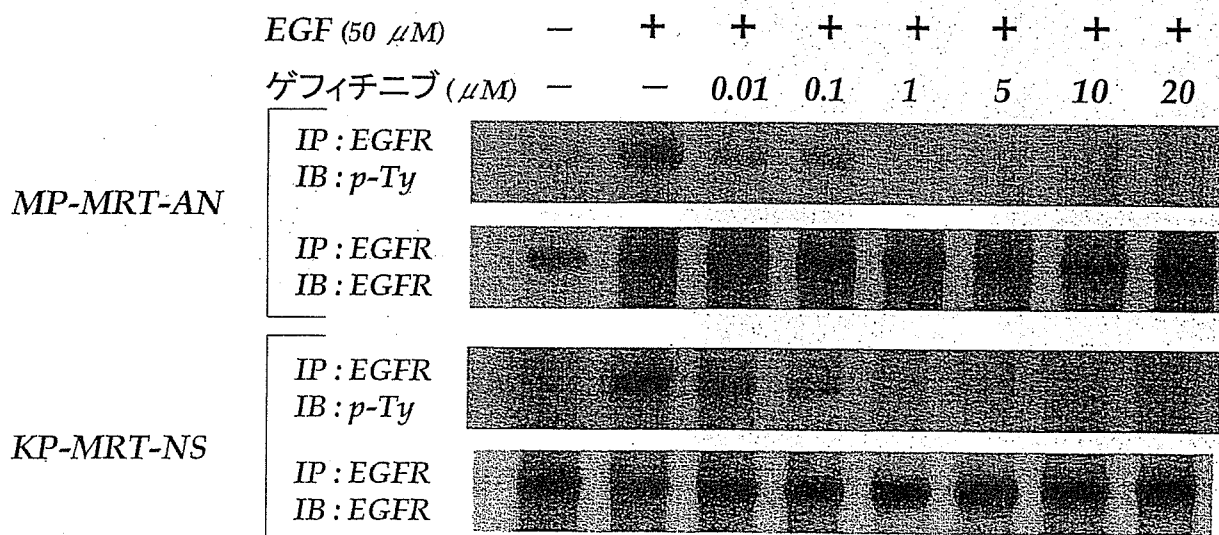


図3 ゲフィチニブによるEGFRのリン酸化の抑制
 無血清ではEGFRのリン酸化は認められなかったが、EGFを添加するとEGFRはリン酸化された。しかし、ゲフィチニブを添加すると濃度依存的にEGFRのリン酸化が抑制された。

遊した。TUNEL法を用いてフローサイトメーターでアポトーシスを検討したところ、ゲフィチニブ20 μ M投与群では10 μ M投与群に比較し、有意に強くアポトーシスを誘導した(図4)。

さらに、*in vivo*での抗腫瘍効果を、MRT細胞株を背部皮下に移植したヌードマウスにゲフィチニブを経口投与し評価した。移植後7日目より、ゲフィチニブ経口投与群(150 mg/kg/日)とコントロール群とに分け、それぞれ週5日で計4週間投与し、腫瘍径で評価した。ゲフィチニブ投与により、AN株移植群とNS株移植群ともに、腫瘍の増殖は抑制された(図5)。

以上のように、EGFRを発現するMRT細胞に対して、ゲフィチニブはEGFRのリン酸化を抑制し、*in vitro*と*in vivo*ともに抗腫瘍効果を示した(POP)。すなわち、ゲフィチニブがMRTの患者の予後改善のために有用な分子標的治療薬の候補となりうる可能性が示されたものと考

える。今後は、EGFRの発現と予後との関係や、発現するEGFRにおける遺伝子異常の検索(遺伝子変異や遺伝子のコピー数増加)などの検索が必要となろう。

ゲフィチニブの小児に対する使用状況と課題

アメリカのThe Children's Oncology Group(COG)では2002年6月から2004年3月までの間に、再発し難治性となった固形腫瘍の小児の患者を対象に、ゲフィチニブの第I相試験を行なった¹⁴⁾。対象者は25人で年齢は中央値が14.8歳(1.8歳から21.2歳)、神経芽腫、Wilms腫瘍、滑膜肉腫、Ewing肉腫などの腫瘍が含まれていた。投与量は150 mg/m²/日から300, 400, 500 mg/m²/日で、有害事象は米国国立癌研究所(NCI)の共通毒性基準(CTC)に基づいてgrade 4の肝機能障害が400 mg/m²/日で1例、500 mg/m²/日で

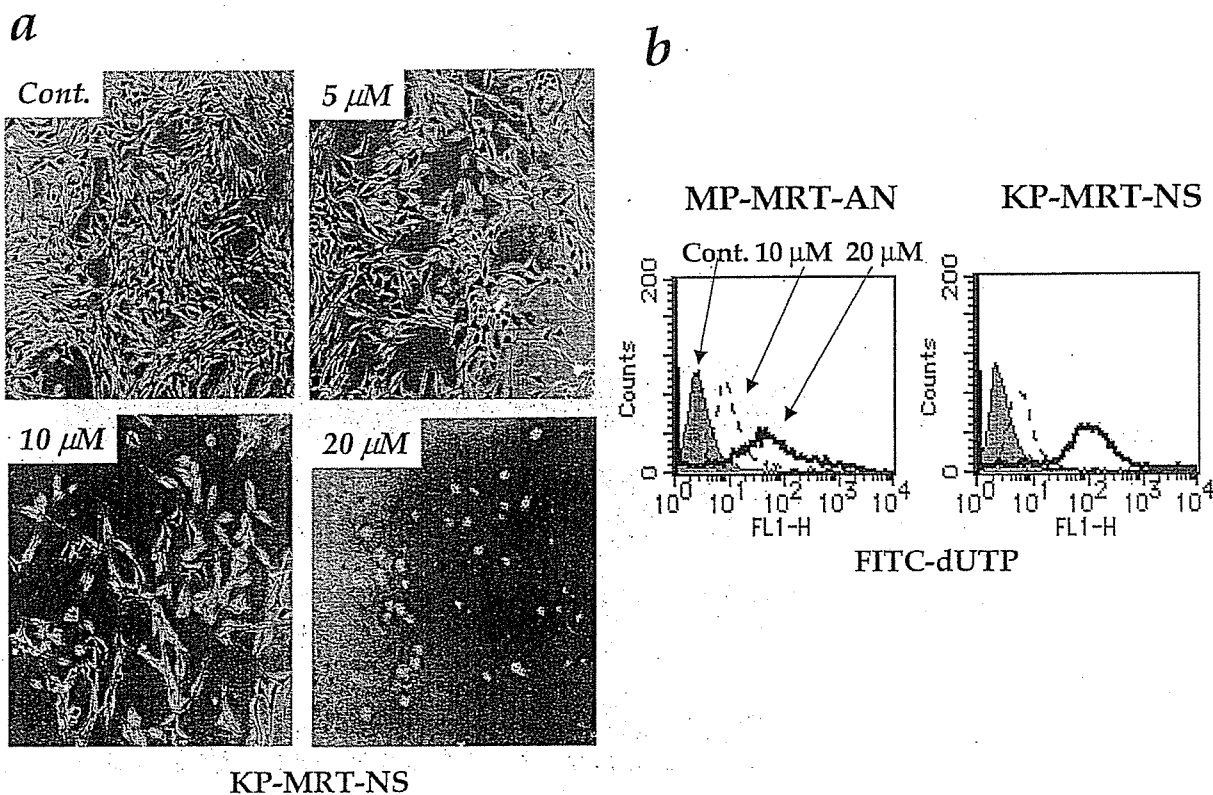


図4 *In vitro*でのゲフィチニブのアポトーシス誘導効果

a: 血清培養液下で培養した細胞株にゲフィチニブを添加した後、96時間後の細胞株。ゲフィチニブは濃度依存的に増殖を抑制し、20 μ Mでは細胞が小球形に変形し浮遊する。図はKP-MRT-NS細胞株。

b: TUNEL法を用いフローサイトメーターでアポトーシスを検討した。ゲフィチニブ20 μ M投与群は10 μ M投与群よりアポトーシスを強く誘導した。

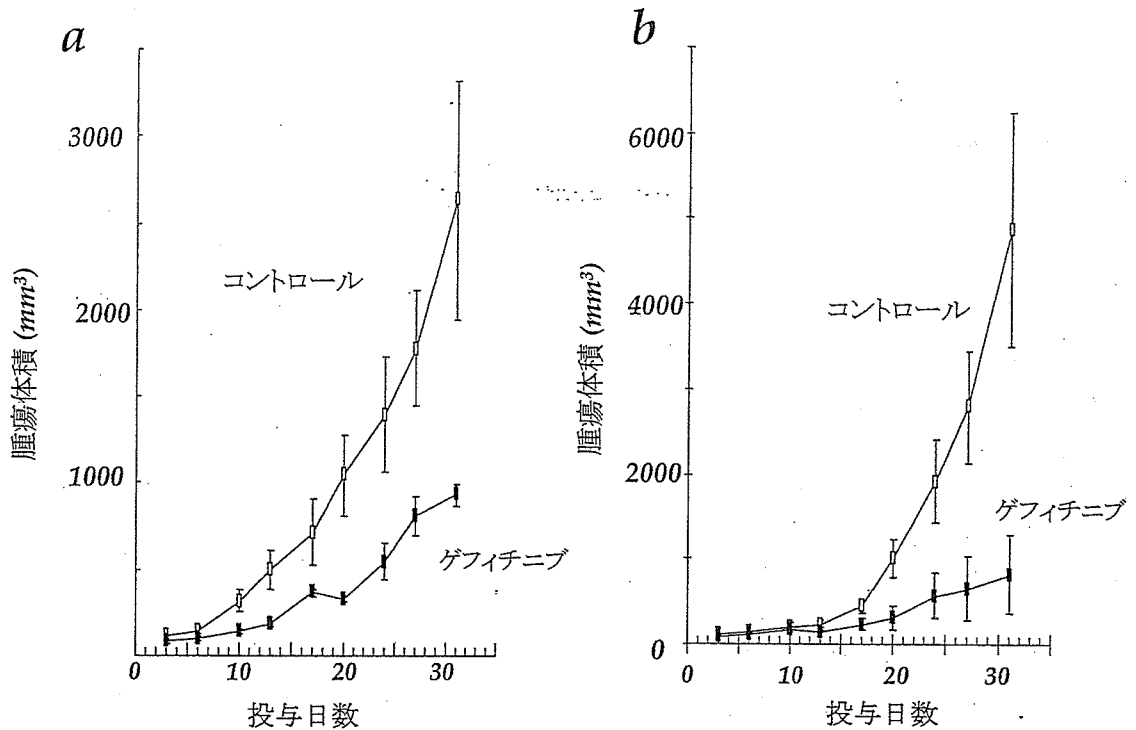


図5 *In vivo* における増殖抑制効果.

a: MP-MRT-AN 細胞株. ゲフィチニブ投与群では, 有意に腫瘍の増殖が抑制された (値は平均値 \pm SE, $p=0.039$).

b: KP-MRT-NS 細胞株. 同様に腫瘍の増殖が抑制された (値は平均値 \pm SE, $p=0.048$).

grade 3 と 4 の皮膚障害を 2 例認めた. しかし, 肺障害の観察例はなかった. この研究から, 最大耐用量は $400 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ とされた. 投与量 $400 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ での最高血中濃度は平均 2.3 時間後で $2.2 \mu\text{g/ml}$ ($1.2 \mu\text{g/ml}$ から $3.6 \mu\text{g/ml}$ まで) であった. 効果に関しては $150 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ 投与群の Ewing 肉腫の 1 例で有効性が認められた. すなわち, 小児でも耐用性が確認された.

この臨床試験ではゲフィチニブの血中濃度は平均で $2.2 \mu\text{g/ml}$ であったが, これは $4.92 \mu\text{M}$ に相当する. 我々の実験では IC_{50} 値は約 $10 \mu\text{M}$ であったため, MRT に対する臨床効果に疑問も生じる. しかし, ゲフィチニブの場合, 血中濃度と腫瘍内の濃度を比較した場合, 腫瘍内濃度は約 42 倍高いと報告されている¹⁵⁾. また, 平均年齢が 14.8 歳と比較的高い年齢層が対象であった. また, ゲフィチニブの主要な代謝酵素である CYP3A4 の発現は乳幼児で低いとされている¹⁶⁾. こうした観点からは, 乳幼児で血中濃度, 腫瘍内濃度の十分な確保が期待できるもの

と考えられる.

しかし, 対象疾患が乳幼児の場合, ゲフィチニブの投与が有効であった場合, 投与期間が成人以上に長期間となる可能性がある. この場合, 耐性化が問題となってくるかもしれない. 実際, CML では, 二次的な遺伝子変異による, メシル酸イマチニブの耐性化が観察されているが, ゲフィチニブにおいても同様の耐性化が問題となってきた. 最近, ゲフィチニブ耐性化獲得と EGFR 遺伝子の T790M の二次的な変異の関与が報告されている¹⁷⁾. 同様の変異を胚細胞系列に伴う家系の報告もあることから今後, 重要な問題となると考えられる.

また, 横紋筋肉腫, 神経芽腫や骨肉腫の細胞株を移植したマウスにゲフィチニブと CPT-11 を併用した場合, 単独よりも抗腫瘍効果が高くなるという報告がある¹⁸⁾. しかも, EGFR の発現していない移植腫瘍でもその効果は見られることから, ゲフィチニブには, CPT-11 を細胞外へ排泄する ABCG2 を阻害し, CPT-11 の代謝活

性物質である SN-38 の効果を増強する作用があることが推察される。このように、ゲフィチニブは EGFR 以外の重要な標的分子に作用している可能性が示唆される。プロテオミクスを用いてゲフィチニブの標的分子を 20 個以上も特定したという報告もある¹⁹⁾。その中には、Src family kinase や MET も含まれており、他の小児固形腫瘍にも応用が広がっていく可能性も考えられる。

最近、がん遺伝子の 1 つである *N-Ras* 遺伝子の発現が、腫瘍組織によっては、腫瘍の進展に抑制的に働くという研究成果が発表された²⁰⁾。この事実は、がん遺伝子でも腫瘍の種類によっては、有効な分子標的にならない可能性を示唆している。したがって、新しい知見に基づいた治療効果の予測などを十分に行い、倫理性と科学性の保証された基礎研究と臨床試験が重要となる。

おわりに

小児悪性固形腫瘍における分子標的療法の現

文

献

- 1) Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist* 2002; 7: 2-9.
- 2) Bazeley LA, Gullick WJ. The epidermal growth factor receptor family.
- 3) Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Richin D, Eek R, Horai T, Noda K, Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung tumor. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2237-2246.
- 4) Lynch T, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavtula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activation mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell-lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-2139.
- 5) Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Danenberg K, Dommenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA, Varella-Garcia M.: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 643-655.
- 6) Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, Bartolini S, Rossi E, Ludovini V, Gregorc V, Ligorio C, Cancellieri A, Domiani S, Spreafico A, Paties CT, Lombardo L, Calandri C, Bellezza G, Hirsch FR, Tonato M, Crino L. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1133-1141.
- 7) Bell DW, Lynch TJ, Haserlat SM, Harris PL, Okimoto RA, Brannigan BW, Sgroi DC, Muir B, Riemenschneider MJ, Iacona RB, Krebs AD, Johnson DH, Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Fukuoka M, Kris MG, Baselga J, Ochs JS, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations and gene amplification in non-small-cell lung cancer: Molecular analysis

- of the IDEAL/INTACT gefitinib trials. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8081-8092.
- 8) Bredel M, Pollack IF, Hamilton RL, James D. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in high-grade non-brainstem gliomas of childhood. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1786-1792.
- 9) Sugimoto T, Kuroda H, Horii Y, Moritake H, Tanaka T, Hattori S. Signal transduction pathways through TRK-A and TRK-B receptors in human neuroblastoma. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 152-160.
- 10) Ghanem MA, Van Der kwast TH, Den Hollander JC, Sudaryo MK, Mathoera RB, Van den Heuvel MM, Noordzij m, Nijman RJM, van Steenbrugge GJ. Expression and prognostic value of epidermal growth factor receptor, transforming growth factor- α , and c-erbB-2 in nephroblastoma. *Cancer* 2001; 92: 3120-3129.
- 11) Gilbertson RJ, Perry RH, Kelly PJ, Pearson AD, Lunec J. Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res* 1997; 57: 3272-3280.
- 12) Kuwahara Y, Hosoi H, Osone S, Kita M, Iehara T, Kuroda H, Sugimoto T. Antitumor activity of gefitinib in malignant rhabdoid tumor cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5940-5948.
- 13) Tomlinson GE, Breslow NE, Dome J, Guthrie KA, Norkool P, Li S, Thomas PRM, Perlman E, Beckwith JB, D'Angio GJ, Green DM. Rhabdoid tumor of the kidney in the National Wilms' tumor study: Age at diagnosis as a prognostic factor. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7641-7645.
- 14) Daw NC, Furman WL, Stewart CF, Iacono LC, Kralio M, Berstein ML, Dancey JE, Speights RA, Blaney SM, Croop JM, Reaman GH. Phase I and Pharmacokinetic study of gefitinib in children with refractory solid tumors: A children's oncology group study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6172-6180.
- 15) Mckillop D, Partridge EA, Kemp JV, Spence MP, Kendrew J, Barnett S, Wood PG, Giles PB, Patterson AB, Bichat F, Guilbaud N, Stephens TC. Tumor penetration of gefitinib (Iressa), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cancer Res* 2005; 4: 641-649.
- 16) Johnson TN, Tanner MS, Taylor CJ, Tucker GT. Enterocytic CYP3A4 in a paediatric population: developmental change and the effect of coeliac disease and cystic fibrosis. *Br J Clin Pharmacol*; 51: 451-460.
- 17) Kobayashi S, Boggon T, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005; 352: 786-832.
- 18) Stewart CF, Leggas M, Schuetz JD, Panetta JC, Cheshire PJ, Peterson J, Daw N, Jenkins III JJ, Gilbertson RJ, Germain GS, Hawood FC, Houghton PJ. Gefitinib enhances the antitumor activity and oral bioavailability of irinotecan in mice. *Cancer Res* 2004; 64: 7491-7499.
- 19) Brehmer D, Greff Z, Godl K, Bléncke S, Kurtenbach A, Weber M, Muller S, Klebl B, Cotton M, Keri G, Wissing J, Daub H. Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res* 2005; 65: 379-382.
- 20) Takahashi C, Contreras B, Iwanaga T, Takegami Y, Bakker A, Bronson RT, Noda M, Loda M, Hunt JL, Ewen ME. Rras loss induces metastatic conversion of Rb1-deficient neuroendocrine thyroid tumor. *Nature Genetics* 2006; 38: 118-123.

神経芽細胞腫マススクリーニングで得られたエビデンスと今後

Neuroblastoma mass-screening: evidence and future prospects

檜山英三^{1) 2) 3)}、家原知子³⁾、米田光宏³⁾、鬼武美幸²⁾、山岡裕明^{2) 3)}、澤田淳³⁾、中山雅弘³⁾、杉本徹³⁾、林 富³⁾、福澤正洋³⁾、升島努³⁾、赤澤宏平³⁾、大瀧慈³⁾

¹⁾ 広島大学自然科学研究支援開発センター、²⁾ 広島大学病院小児外科、³⁾ 厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業、H16-子ども一般-12)

要 旨

神経芽細胞腫のマススクリーニングを生後6ヶ月児を対象として行う神経芽細胞腫検査事業は、その過剰診断と有意な死亡率の低下がはっきりしないことから、平成15年度に休止が決定した。しかし、大規模なコホート研究では死亡率が有意に低下したとの報告がある。そこで、我々は、厚生労働科学研究として、「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」の班を構成し、この事業の結果、得られたこの腫瘍の自然歴や、この腫瘍の治療成績向上のための有用なエビデンスを明らかにしてきた。従来の神経芽細胞腫のマススクリーニングは、その施行時期、感度、検査の精度管理など問題点も多く存在したが、これらから得られた結果を正確に分析し、新たなスクリーニング法の検討も含めて、本腫瘍の治療成績向上のための診断、治療法の開発に関して検討してきた結果を報告する。

キーワード

神経芽細胞腫、マススクリーニング、エビデンス、腫瘍特性、数理モデル

はじめに

小児がんは、小児の病死の原因として第一位であるが、近年、治療成績の向上の伴い、約70%が生存できる時代になってきた。しかし、小児

の悪性固形腫瘍の中で最も多い神経芽細胞腫は、治療成績は他の小児がんに比べ決して良好とはいえない。また、この腫瘍は腫瘍特性に大きな差を有するサブグループからなっており、この腫瘍の一部には自然に退縮する腫瘍が存在する一方で、集学的治療にもかかわらず極めて進行が早く不幸な経過に至る症例も少なくないためである¹⁾。特に、古くから乳児期の症例は予後良好であり、1才以降に発見される症例に進行例が多く予後不良であることが指摘されてきた。また、この腫瘍の多くがカテコラミン(ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン)を産生し、尿中のカテコラミン代謝産物であるVMA(バニールマンデル酸)、HVA(ホモバニリン酸)が診断に有用な腫瘍マーカーである。そ

<連絡先>

檜山 英三
〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3
霞総合研究棟
広島大学
自然科学研究支援開発センター
Tel:082-257-5951 Fax:082-257-5416,
e-mail:eiso@hiroshima-u.ac.jp

ここで、乳児期にこの腫瘍を早期発見すれば治療成績が向上するとの期待から、尿中 VMA, HVA をマーカーとした神経芽細胞腫検査事業が、わが国では 1973 年に京都市で開始され⁽²⁾、その後、いくつかの自治体が引き続いて実施し、1984 年頃から生後 6 ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫マススクリーニング(以下神経芽マス)として全国的に開始された。その事業が展開されるにつれ、予想に反して神経芽細胞腫の罹患数は倍増する結果となり、予後良好な腫瘍の絶対数が増加した⁽³⁾。この事実は、従来診断されずにそのまま退縮あるいは分化していた腫瘍を神経芽マスで発見する結果となり、明らかに過剰診療であることが指摘されるに至った。また、北米やドイツの短期間の介入研究から、効果に対して否定的結果であったこと、本邦において実際に予後不良な神経芽細胞腫が神経芽マスによって減少したか否かの明らかなエビデンスが少なかったことから、平成 15 年度に休止が決定した。

神経芽マスの有効性、施行の是非に関しては未だに賛否両論があり、結論に至っていない。これは、本邦で神経芽マスの有効性に対して、前向きな介入研究がなされないまま、全例を対処等とした検査事業として継続してしまったことにある。北米のケベックやドイツで、神経芽マスの有効性に関する短期間の 2 つの介入研究(カナダで実施された研究では生後 3 週間と 6 ヶ月時に検査を実施、ドイツで実施された研究では生後 12 ヶ月時に検査を実施)では、死亡率減少効果について有効性がなかったとの結果が 2002 年に発表されている^(4,5)が、評価に値する十分なスタディとは言いがたい面も残されている。世界に類を見ない大規模な検査事業を 20 年近くにわたり施行してきた本邦は、神経芽マスに対して正しい効果判定を行うことと、これによって得られたエビデンスを明らかにして、この腫瘍の治療成績向上のための新たな取り組みを行うべきである。

生後 6 ヶ月児の神経芽細胞腫検査事業の後向き研究からの死亡率減少効果

現在までに、本邦では、様々な施設や機関からマススクリーニングの効果に関する報告がなされてきた^(4,12)。どれも、観察研究で、受検者と非受検者の比較をしたものと施行前後の比較をしたものがあり、有意に死亡率が低下したとの報告とないとの報告と様々である。前者の研究の中で、規模大きな報告は、コホート研究として厚生労働研究として行われた久繁班と黒田班の研究による前向きコホート研究があり、両者とも受診群の神経芽細胞腫による死亡が未受診群よりも低いという結果が示されている。海外において実施された複数の介入研究が神経芽細胞腫マススクリーニングの死亡率減少効果について否定的な結果を示していることの違いは、海外の介入研究の実施に問題点もあるが、大きな要因は母集団の大きさにある。黒田班の報告書によると、受検群 626 万人(総観察期間 2183 万人)未受検群 90 万人(総観察期間 325 万人)の検討で、累積死亡が受検群 15.4/100 万人に対し、未受検群 43.1/100 万人と有意に低下した(平成 15 年度厚生科学研究、黒田班報告、林邦彦先生)。これは、より多くの児を対象とすることによって、有意に死亡率を低下させる結果を導きえたわけである。厚生労働省の検討会では、本邦では、全国的に展開された事業の受診者が約 9 割にも及び、適切な対照を設定した介入研究が困難で海外から示された研究結果よりも精度の高い研究結果を示すことができないとの見解から休止としたとあるが、神経芽マスがある程度有効性があるエビデンスであることに相違ないのである。むしろ、海外の小規模は研究よりも、コホート研究であるが多数の受検者を得た本邦の方が信頼性は高いといえる。しかし、今は、医療経済すなわちコストベネフィットの面の有効性、すなわち 100 万人あたり 27.7 人減少させるのにどれだけの費用と費やし、また、進行例がどれだけ減ったためにどれだけ医療経済にメリットが生じたか、また、生死だけではなく、生存患者の QOL がどの程度改善したかというエビデンスの検討も行うべきである。

生後6ヶ月児の神経芽細胞腫検査事業の過剰診断

一方、この神経芽マス施行による不利益も大きな問題であるが、とくに過剰診断によって治療不要な症例に治療を行ったこと、がんの診断を下した症例に治療を行わず無治療経過観察した(している)こと⁽¹⁹⁾があげられる。これらの症例は、神経芽マスを受けなくてもある時期に診断されていた症例も含まれているであろうが、診断されないまま一生をまっとうできた症例も少なからずあったものと考えられ、たとえ、無治療経過観察で消退したとしても、通院に要する家族の身体的・精神的負担も少なくない。しかし、これは6ヶ月で神経芽マスを行ったために、従来では我々の知らないうちに腫瘍が形成され、その後退縮、分化していた腫瘍の存在が明らかになり、この腫瘍のほぼ全体像をつかむことができたことはかけがえのないエビデンスである。現在、腫瘍の分布を検討して、治療が必要なグループと濃厚な治療が不要なグループの判別を行っている。単に、神経芽マスで発見されたから予後が良くて、臨床診断例だから悪いという短絡的な結論にはならないのである。

逆に、今後、神経芽マスがなくなったとしても、診断技術の進歩と共に偶発的発見される症例も少なからず存在し、また、症状があっても神経芽マスを行えば陽性であった症例もあるはずであり、こうした症例を選別し、治療の軽減化をはかることが第一と考えられる。

検査事業下での腫瘍発生例から得たエビデンス

そこで、我々の研究班では、日本小児外科学会、日本小児がん学会の協力を得て、これらの学会が長年に渡って登録してきた神経芽細胞腫症例約5000例(うち神経芽マス発見例は2500例)を詳細に検討し、これらから得られるエビデンスを集積することとした(図1)。以前から、実際にマススクリーニング発見例の予後調査を行ったところ、1998年までに出生した症例で、5年後の追跡が可能であった症例約3500例について検討した。その結果、約2000例が神経芽マスで発見されていたが、これらの5年生存率は98%で、死亡例の半数が腫瘍死で、乳児期の癌治療による治療関連死が残りの半数であった。死亡例のほとんどがMYCN遺伝子増幅例であり、その他の腫瘍は病期4であっても生存

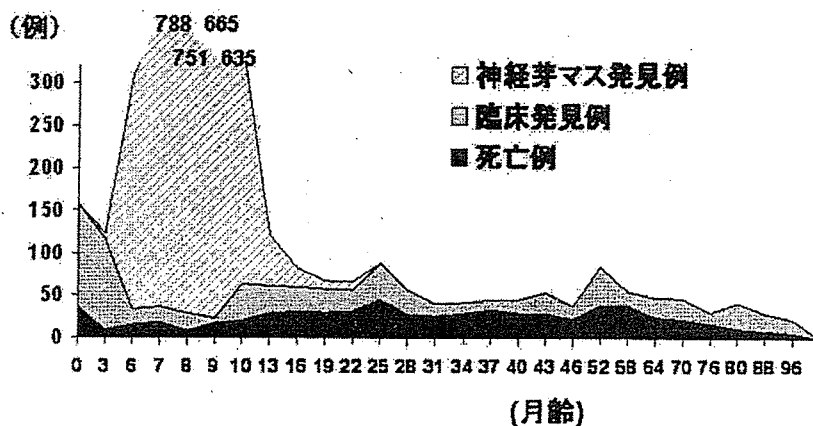


図1：神経芽細胞腫の診断時年齢の分布

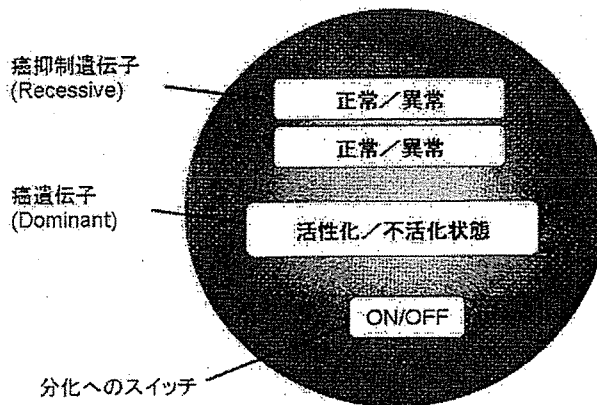
していた⁽¹⁴⁾。この事実は、極めて興味深い事実であり、従来、乳児期であっても進行例に対しては濃厚治療を行い、その結果、年長児に比べて予後が良いとの結論を得ていたが、これは、乳児期には、進行例であっても自然退縮、或いは分化する腫瘍が少なからず存在し、濃厚な治療が不要な症例が多くを占めていたことを示している。また、再発例の治療結果も決して不良でないことから、初期治療は手術のみとその後の経過観察が最も好ましい治療法となっている。こうした症例は、神経芽マスを行われぬ時には、明らかに年長児に準じた治療法が選択されてきたわけで、実際に incidental に発見される例に対しては治療の軽減をはかるべきである。

神経芽細胞腫の発生の数理モデル解析

そこで、統計学的に、神経芽細胞腫の発症年齢とその予後分布から、その成因をモンテカルロ数理実験にて解析した^(15,16)。神経芽細胞腫は、一つの癌遺伝子と一対の癌抑制遺伝子とその発症に関わっており、もう一つ神経芽細胞を分化させるスイッチの存在を仮定した(図2)。癌遺伝子が活性化されるとこのスイッチは OFF となるとの前提で解析した。この数理実験による

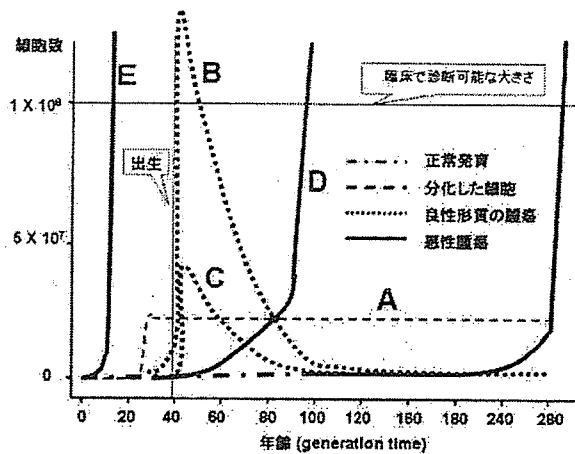
と、この腫瘍は、生後、スイッチが ON にならないために正常個体から良性腫瘍の表現型の腫瘍が発生してきて、その一部は実際に臨床で発見しうるレベルまで発育するが、その後に消退する。こうした腫瘍から、悪性の形質の腫瘍が発生することは希であるが、年長児になって一旦退縮した腫瘍が再度悪性腫瘍として発生しうるなどの結果であった。一方、胎生早期に、癌遺伝子、癌抑制遺伝子の両アレル、一アレルの異常が生じた時に、それぞれ受精後 20-30 週、60-100 週、240 週くらいで発症してくるモデルとなった。このモデルでは、癌遺伝子が胎生早期に活性化すると胎内で腫瘍が発生してくるためにほとんどが胎内死亡に至る。よって、予後不良な腫瘍は1才前後と3-4才くらいに発症してくることとなった(図3、図4)。このモデルは、多くの設定条件を人為的に設定していることから、実際の神経芽細胞腫の発生分布と必ずしも一致しないが、かなり近似したモデルであることが明らかになった。これが、事実であれば、この癌遺伝子と癌抑制遺伝子は何かということになる。癌遺伝子に関しては、MYCN 遺伝子であることがまず予想される。このモデルでは、癌遺伝子が早期に活性化してくると胎内死亡となるので、癌遺伝子活性化は生後1才頃か

図2：数理モデルでの神経芽細胞腫形成へのターゲット遺伝子



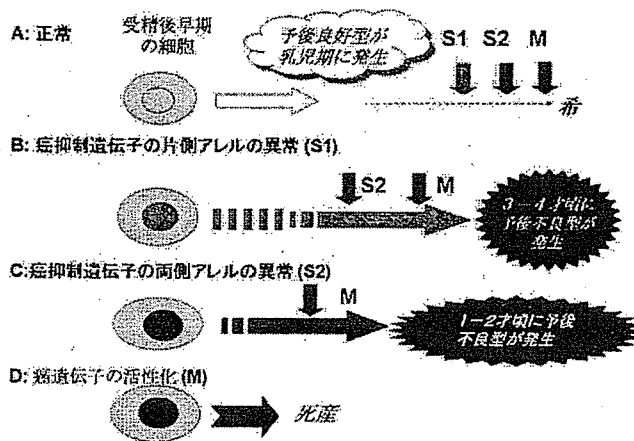
このモデルでは、神経芽細胞腫発生に一つの癌遺伝子と一対の癌抑制遺伝子の関与を想定した。さらに、これらの異常のない状況では、分化へのスイッチが存在し、癌遺伝子が活性化するまでは分化可能であるとした。

図3：発生経過での神経芽細胞数の経過



- A：ターゲット遺伝子に異常のない群。一時期増加するが分化して細胞数外って胃となる。
- B：生直後に良性形質の腫瘍の細胞数。次第に自然退縮する。
- C：一旦生直後に増加した後、分化退縮するが、その後再び悪性の形質で発生してくる。
- D：生直後には細胞数の増加はないが、その後1才くらいで悪性形質の腫瘍が発生。
- E：胎内で発症し、死産に陥るもの

図4：神経芽細胞腫の診断時年齢の分布



受精後早期の細胞に異常がないときは、乳児期に予後良好型の腫瘍を形成するが、悪性腫瘍を起こすことは希。

受精後早期に癌抑制遺伝子の片側アレルの異常を生じると、その後に対側のアレル異常、癌遺伝子の活性化を生じて、3-4才頃に悪性の腫瘍を形成してくる。

受精後早期に癌抑制遺伝子の両側アレルの異常を生じると、その後癌遺伝子の活性化を生じて、1-2才頃に悪性の腫瘍を形成してくる。

受精後早期に癌抑制遺伝子の両側アレルの異常を生じると、胎内で腫瘍が発生し、多くは死産に至ると考えられる。

増幅例が乳幼児早期には極めて希で、1才前後から認められることはこのモデルに矛盾しない。一方で、がん抑制遺伝子は、現在のところ、確実な候補が見当たらない。染色体1p、3p、11q、14qなどに共通欠失領域が報告されている⁽⁴⁷⁾が、これらの部位にはっきりと同定された癌抑制遺伝子は今のところ見だせていないのが現状である。もし、この癌抑制遺伝子が見いだせれば、予後不良の神経芽細胞腫はこの遺伝子の一つ或いは両側に遺伝子異常を伴っているわけであるから、乳児期に発見されても将来も含めた予後予測が可能となり、それに応じたテーラーメイド療法が可能となってくる。現在、このモデルの正当性を検証し、さらに定数や増殖速度、退縮、分化のシグナルなどを解明し、より現実に則したモデルを作成することをめざしている。もし、それが実証されれば、幾つかの提言が可能となる。一つは、現在、国際的に行われているリスク分類では、癌抑制遺伝子 *MYCN* の増幅に加えて、癌抑制遺伝子の候補となるものを一つ加えるべき提言をしたい。さらに、年齢因子を18ヶ月とすることは、癌抑制遺伝子の両アレルの不活化による群がそのあたりで進行してくることを考えると理解できるが、もう一つの240週頃から発生して来る群に關してももう一つの年齢の境界線を設けるべきである。そういう意味では、嶋田分類の6才は理にかなった分類ともいえる^(48, 49)。第二は、新たなマススクリーニングを構築する際には、これらのどのサブグループを対象とするのかを念頭に置いて、その施行時期を検討することである。第三は、これらの遺伝子をターゲットとした治療開発を行うこと。また、癌抑制遺伝子が不活化されていても、分化や退縮を誘導することが治療法の一選択となることである。最後に、現在、神経芽マス症例に対して、無治療経過観察がなされているが、このモデルによると一旦分化或いは退縮した症例の中に、生後240週以降に再度悪性の表現型で増殖してくるものが推定され、現在の無治療例は綿密な経過観察を要することへの注意を喚起したい(図3)。

以上は、神経芽マスを実行した本邦のみで得

られたエビデンスであり、これらから得られる知見は計り知れないものがあると考えている。

神経芽細胞腫マス・スクリーニングの特殊性と問題点

新生児マス・スクリーニングにおいて発見される代謝異常の患者は、無症状あるいは症状が軽い時期に早期発見して治療を開始することで通常の発達が期待され、発見例の受ける利益は大きなものがあり、通常1回のスクリーニングで相応の効果が期待される。一方、腫瘍である神経芽マスは、予後不良な症例を無症状あるいは症状が軽い早期に発見して治療を開始することで予後が改善することを期待しているが、この腫瘍の発生形態が様々で幾つかのサブグループに分類されることから、図のごとく、神経芽マスを行う時期によって効果は異なり、また、一回の検査で十分な効果が得られるという科学的根拠もなく、今回の検討からも効果を上げるためには複数回行うことも必要となる⁽⁵⁾。

もう一つの大きな問題は、過剰診断と過剰治療である。すなわち、分化退縮のスイッチの異常で発生した良性腫瘍の表現型を示す腫瘍を診断し、治療することである。これらの腫瘍は自然に退縮或いは分化する性質のもので、従来その多くが発見されなかったものと考えられ^(20, 21)、従来、1歳未満発見のこの腫瘍が予後良好であったとの臨床経験は、その多くが自然退縮あるいは分化する腫瘍であったことによるともいえる。従来、自然に退縮或いは分化する腫瘍が神経芽細胞腫の中に存在することは知られた事実であった⁽²²⁾が、神経芽細胞腫検査事業はこの腫瘍の自然歴解明に大きなエビデンスを与えたことに違いはない。こうしたサブグループの腫瘍の発生形態が明らかになれば、過剰診断を最小限にしたマススクリーニングの開発につながるわけである。過剰診断症例をスクリーニングの見だしても治療しなければいいとの考え方もあるが、代謝性疾患の擬陽性とは、全く異なることで、予後は良いにしろ一旦「がん」と診断され、実際に腫瘍が体内に存在しているわけである。神経芽マスが始まる前は、こうした

患者は臨床上発見されれば無論のこと治療されてきたわけであり、これらは過剰診断、過剰治療といわれてはいない。神経芽マスが行われて、はじめて明らかになったグループともいえる。マススクリーニングが休止になれば、こうした患者は出てこないのかという、そんなはずはなく、欧米でも incidental neuroblastoma として報告されている⁽²³⁾ように、臨床上発見される。神経芽マスを中止するにも、再開するにしても、こうしたサブグループに対する治療法は、このサブグループの腫瘍の特性を正確かつ緻密に解析し、自然歴を把握した後に、十分に討議する必要がある

新たなマススクリーニング再開に向けてのエビデンスとその方向性

有効性に関して曖昧なまま平成 15 年に休止したことから、この神経芽マスを休止するにあたり、三つの課題が提示された。

- (1) 神経芽細胞腫の罹患と死亡の正確な把握
- (2) 神経芽細胞腫マススク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
- (3) 神経芽細胞腫による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

(1)は、神経芽細胞腫検査事業休止の影響の確認や、神経芽細胞腫の治療成績の改善を図るための取組を評価するには、神経芽細胞腫の罹患と死亡を正確に把握することが必要となるためであるが、これは実際には、研究者や学会レベルのものではなく、行政が取り組むべき過大であり、発生を報告するシステムの問題である。2の、神経芽細胞腫マススクリーニングの実施時期については、これを変更することによって、過剰診断例を減少させながら、早期発見が有益な症例の発見を増加させて治療生成期を向上させることを検討することである。

現在、得られているエビデンスを整理すると、

1. 6ヶ月時に施行された神経芽細胞腫検査事業は、死亡率低下があったもののその過剰診断が明らかに多い。
2. 札幌市では生後14ヶ月、大阪府、京都府、

宮城県では生後18ヶ月での神経芽細胞腫マススクリーニングが開始され、陽性で本症と診断された児も報告されてきている。

3. 病理学的検討では、18ヶ月以降が予後不良であり⁽¹⁸⁾、国際的にも18ヶ月以降の発症例が予後不良である^(24,25)。
4. 中山らの検討で、無治療経過観察した6ヶ月神経芽マス発見例の尿中VMA、HVAの変動があげられる。これらの観察例の尿中カテコラミンの変動は、生後1才頃に低下し、1才半ではほとんどが正常域に達する。よって1歳半のスクリーニングでは、こうした自然退縮例は見いだされにくくなるなどの結果であった⁽²¹⁾。

札幌市の生後14ヶ月のパイロットスタディの結果が極めて貴重な示唆を与えてくれた。1991年からの二次スクリーニングとして行われた14ヶ月神経芽マスは、6ヶ月で受診した症例が多いのにもかかわらず約5800例に1例と高率に発症し、そのほとんどが予後良好型であった。この発生率からみて、14ヶ月でもかなり過剰診断症例が含まれていることを示す結果となった。しかし、18ヶ月では、時期として遅すぎて、それまでに進行例が発症してしまう可能性が危惧されてくる。この可能性は、否定できないが、これに対し、京都府・大阪府における神経芽マスでは、まだ、受診例が少ないが、発症率は7000人に一人程度で、明らかな過剰診断症例は見出されていない。

今、求められているのはこうした時期に行う神経芽マスが果たして有効であるかどうかを正確な臨床研究として行い、評価することである。ヘルシンキ宣言を遵守し、倫理的問題から、まず神経芽マスを受ける児の親に正しい説明と理解を求め、臨床研究であることのインフォームドコンセントを得ておくことが前提となる。そして、有意な結果が得られる人口を対象として、神経芽マスの前向き研究を行うことである。こうした結果を評価し、神経芽マスを施行すべきか否かを判定すべきである。現在、上記の地方公共団体を中心に、これと同等の発生率の地域を対照として、前向き研究を行うことが計画さ

れつつある。この研究の妥当性を社会にアピールし、十分な理解の上に、臨床研究を行い、新たなスクリーニング事業のあり方を行政と共に検討し構築することが必要であると考えている。現在の少子化に伴い、有効な前向き研究をおこなうことは決して容易ではないが、多くの関係者、国民の理解を得て、前向きに進みたいと考えている。

今後解明すべきエビデンス

最後になったが、本邦の6ヶ月神経芽マスは、この腫瘍のもつ多くのエビデンスを明らかにしてくれた。これを非難するだけでなく、得られたエビデンスを十分に把握し、次世代のこの腫瘍への戦略を考える事が最も重要であり、それこそが(3)の神経芽細胞腫による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につながる。リスク分類に加え、これらの期間に蓄えられた多くの臨床検体の有効活用による研究の推進（このために、現在、本邦の神経芽細胞腫の腫瘍検体のバンクングを開始している。）が重要である。こうした研究は本邦でのみ可能な研究であり、世界に多くの成果を発信できるものである。また、あらたな腫瘍マーカー、特に予後不良例に特異的なマーカーを見いだして、新たなスクリーニングのブレイクスルーとする研究にも重点をおいて、最近のプロテオミクスの技術を用いた尿や血清を用いた研究を進行している。このように、6ヶ月神経芽マスを試行した本邦では、その事業のあり方を反省すると共に、次世代に向けて発展させるべく研究が進行しており、新たなスクリーニングだけでなく、診断・治療戦略をうち立てることが、本症の治療成績向上に直結する成果となる。だからこそ、神経芽マスのエビデンスを次世代に生かすことが最も重要なのである。

結語

神経芽細胞腫マススクリーニングは平成15年に一旦休止されたが、およそ20年間施行されたこの事業から得られたエビデンスはまだま

だ十分に得たとは言いがたい。この腫瘍の治療成績の向上のためには、まず、現在得られているエビデンスを正確に把握し、過剰診断を最小にしたスクリーニング事業にむけた検討も含めて、解決すべき問題点を解決し、今後の早期診断、治療戦略に反映させいることが求められているのである。

文献

- [1] Evans AE, D'Angio GJ Age at diagnosis and prognosis in children with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2005;23:6443-6444.
- [2] Sawada T, Kidowaki T, Sakamoto I, et al. Neuroblastoma. Mass screening for early detection and its prognosis. *Cancer* 1984;53:2731-2735.
- [3] Bessho F, Hashizume K, Nakajo T, et al. Mass screening in Japan increased the detection of infants with neuroblastoma without a decrease in cases in older children. *J Pediatr* 1991;119:237-241.
- [4] Schilling FH, Spix C, Berthold F, et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002;346:1047-1053.
- [5] Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 2002;346:1041-1046.
- [6] Suita S Stephen L. Gans overseas lecture. Mass screening for neuroblastoma in Japan: lessons learned and future directions. *J Pediatr Surg* 2002;37:949-954.
- [7] Suita S, Tajiri T, Akazawa K, et al. Mass screening for neuroblastoma at 6 months of age: difficult to justify. *J Pediatr Surg* 1998;33:1674-1678.
- [8] Ohtori S, Yamamoto T, Ino H, et al. Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma protein modulates inflammatory pain in the

- spinal dorsal horn. *Neuroscience* 2002;110:579-586.
- [9] Ajiki W, Tsukuma H, Oshima A, et al. Effects of mass screening for neuroblastoma on incidence, mortality, and survival rates in Osaka, Japan. *Cancer Causes Control* 1998;9:631-636.
- [10] Asami T, Otabe N, Wakabayashi M, et al. Screening for neuroblastoma: a 9-year birth cohort-based study in Niigata, Japan. *Acta Paediatr* 1995;84:1173-1176.
- [11] Honjo S, Doran HE, Stiller CA, et al. Neuroblastoma trends in Osaka, Japan, and Great Britain 1970-1994, in relation to screening. *Int J Cancer* 2003;103:538-543.
- [12] Nishi M, Miyake H, Takeda T, et al. Mass screening for neuroblastoma and mortality in birth cohorts. *Int J Cancer* 1997;71:552-555.
- [13] Okazaki T, Kohno S, Mimaya J, et al. Neuroblastoma detected by mass screening: the Tumor Board's role in its treatment. *Pediatr Surg Int* 2004;20:27-32.
- [14] Iehara T, Hosoi H, Akazawa K, et al. MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma detected by mass screening. *British Journal of Cancer* 2006;in press.
- [15] Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer* 1954;8:1-12.
- [16] Moolgavkar SH. The multistage theory of carcinogenesis and the age distribution of cancer in man. *J Natl Cancer Inst* 1978;61:49-52.
- [17] Hiyama E, Hiyama K. Molecular and biological heterogeneity in neuroblastoma. *Current Genomics* 2005;6:319-332.
- [18] Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 1999;86:364-372.
- [19] Shimada H, Umehara S, Monobe Y, et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 2001;92:2451-2461.
- [20] Yamamoto K, Hanada R, Kikuchi A, et al. Spontaneous regression of localized neuroblastoma detected by mass screening. *J Clin Oncol* 1998;16:1265-1269.
- [21] Oue T, Inoue M, Yoneda A, et al. Profile of neuroblastoma detected by mass screening, resected after observation without treatment: results of the Wait and See pilot study. *J Pediatr Surg* 2005;40:359-363.
- [22] Sawada T, Kawakatu H, Horii Y, et al. Incidental neuroblastoma. *Lancet* 1988;1:364.
- [23] Caiulo VA, Latini G, Massafra V, et al. Incidental detection of neuroblastoma and "wait and see" strategy. *Pediatr Blood Cancer* 2005;44:686.
- [24] London WB, Boni L, Simon T, et al. The role of age in neuroblastoma risk stratification: the German, Italian, and children's oncology group perspectives. *Cancer Lett* 2005;228:257-266.
- [25] London WB, Castleberry RP, Matthay KK, et al. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005;23:6459-6465.

1歳半神経芽腫マス・スクリーニングの試み

Profile



中山 雅 弘

Masahiro Nakayama

大阪府立母子保健総合医療センター検査科

- 1972 (昭和47年) 大阪大学医学部卒業
阪大病院小児科研修医 (蒲生逸夫教授) 小児科臨床医
- 1973 (昭和48年) 兵庫県立西宮病院小児科 (寺井一 部長) 小児科臨床医
- 1975 (昭和50年) 大阪大学医学部附属病院小児科 (藪内百治教授) 小児科臨床医
- 1976 (昭和51年) 神奈川県立こども医療センター病理科 (三杉和章科長)
一般小児病理、小児がん、乳児突然死
- 1980 (昭和55年) Hammersmith Hospital (ロンドン) 周産期病理科 (Wigglesworth教授) 新生児肺、胎盤病理
- 1981 (昭和56年) 大阪府立母子保健総合医療センター検査科病理医長、病理室長をへて
- 1992 (平成4年) 検査科部長 (検体検査室+生理検査室+病理検査室+マス・スクリーニング室を総括)
- 2004 (平成16年) 現在に至る (岡田正総長、藤村正哲病院長)

■現 職

大阪府立母子保健総合医療センター検査科

■専門科目

周産期病理学 (胎盤病理を含む)、小児病理学、SIDS

■所属学会・研究会およびその他の活動

日本病理学会評議員、日本周産期学・新生児医学会評議員、日本SIDS学会理事、日本小児病理研究会幹事、日本未熟児新生児学会評議員、日本小児がん学会評議員、日本先天異常学会幹事、日本胎盤学会評議員

中山雅弘¹⁾、竹島清美¹⁾、入江明美¹⁾、稲岡一考¹⁾、島本太香子²⁾、福島俊也²⁾、米田光宏³⁾、井上雅美¹⁾、河敬世¹⁾

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) 大阪大学大学院医学系研究科

要 旨

厚労省の検討会で平成15年8月に6ヶ月マスの休止決定後、大阪府では大阪府先天性代謝異常等検査運営協議会、大阪府神経芽腫専門部会で6ヶ月マスの実績の評価検討を行った。その結果を踏まえ、大阪府立母子医療センターの倫理委員会の承認を受けた上で1歳半に時期を変更して研究的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18年7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23、935人で、平成18年度 (4月~7月) 7、170人であった (合計46、449人)。精密検査受診者は12人 (神経芽腫6人、陰性6人) であった。7742名中1例の発見率であった。16年度は、前年度に6ヶ月マス・スクリーニングの対象者でもあったが、発見された2名は何れも6ヶ月マスの未受検者であった。神経芽腫6人は腫瘍を摘出しすべて病理的・生物学的評価を行なった。

1歳半児マスでこれまでに発見した6例の病理組織分類は、6例中4例がpoorly differentiated neuroblastomaであった。切除時期が1歳半を越えていることより、嶋田分類では、予後不良型となる。他の2例は、differen-

tiating neuroblastomaであったが、それぞれにリスクファクターを有していた。6ヶ月マスにおける切除病理組織や無治療経過観察後切除症例の病理組織所見との比較検討を行った。

N-mycは明かな増幅は認められなかったが、N-myc gainを1例に認めた。FISH法にて1p36欠失を1例に認めた。Ploidyに関しては、2例に、diploid・tetraploidを認めた。これらの症例は、4例は腫瘍の全摘出、1例は部分切除後、骨髄移植を施行した。現在、再発や死亡例は認めていない。

1歳半児神経芽腫スクリーニングカットオフ値設定に関する検討においては、VMA、HVAとも1歳6ヶ月のほうが平均値、標準偏差とも低く陰性検体と疑陽性検体とがはっきりと分かれる傾向が見られた。

- ①過剰診断は6ヶ月に比べて少ない印象がある。
- ②リスクファクターを持つ児を早期にスクリーニングしている。
- ③VMA、HVAとも1歳6ヶ月のほうが陰性検体と疑陽性検体とがはっきりと分かれる。

1. 大阪府における6ヶ月神経芽腫マススク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人の病期分類の内訳は、1期61人、2期45人、3期34人、4期8人、4S期6人、不明 (他府県に転出) 5人であった (表1)。

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1) 1、2。更に、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1。無治療経過観察後に、1歳を越えた時点で、腫瘍が摘出された例は、6例であった。その病理所見の内訳は、poorly differentiatedが3例、ganglioneuroblastomaが2例(nodular1例、intermixed 1例)、ganglioneuroma maturingが1例であった。

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3期・4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否した神経芽腫(3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ヵ月神経芽腫マススク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ヵ月神経芽腫マススク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2。

2. 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

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3、4。

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ヶ月神経芽腫マススク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5。
- 2004.4 厚生労働省科学研究費(子ども家庭総合研究事業)神経芽細胞腫マススク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ヶ月マススクリーニング開始
- 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6
- 2005.1 神経芽腫マススク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体制

対象は保護者に研究の主旨説明に対する同意書により承諾の得られた大阪府全域(大阪市を除く)の1歳半児。方法は、①1歳半健診で検査セット配布(市町村の保健センター)②保護者が採尿して母子センターに郵送(切手代は保護者負担)③母子センター検査科でVMA/CRE、HVA/CRE測定(東ソー社HPLC VMA726Ⅲ)④精密検査は母子センター血液腫瘍科と大阪大学医学部付属病院小児外科(精密検査のカットオフ値はVMA20/mgCRE、HVA 35/mgCRE)⑤精密検査結果は母子センター検査科に速やかにフィードバックされる⑥大阪府神経芽腫検査評価委員会にてこの研究の評価も行った。

4. 1歳6ヶ月神経芽腫スクリーニング検査の結果6

大阪府では、地域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。平成16年5月から平成18年7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23,935人で、平成18年度(4月~7月)7,170人であった(合計46,449人)。精密検査受診者は12人(神経芽腫6人、陰性6人)であった。7,742名中1例の発見率であった。16年度は、前年度に6ヶ月マス・スクリーニングの対象者でもあったが、発見された2名は何れも6ヶ月マスの未受検者であった。神経芽腫6人は腫瘍を摘出しすべて病理的・生物学的評価を行なった^{4,6}。それぞれにリスクファクターが認められた。

症例1は、1歳10ヵ月男児。6ヵ月マススクリーニング受診せず。症状なし。VMA:25.9 ug/mg・Cr、HVA:29.1ug/mg・Cr 左副腎領域に3.3×1.8cmの腫瘍を認める。リンパ節腫大、肝転移巣を認めず。組織所見: Poorly differentiated NB嶋田分類: unfavorable (>1.5Y)、MYCN (FISH): gain [3 copy→93%、4 copy→7%]、DNA ploidy: Diploid、染色体: 46XY、1p欠失なし。

症例2は、1歳9ヵ月男児。6ヵ月マススクリーニング受診せず。症状なし。VMA:147.6ug/mg・Cr、HVA:258.4ug/mg・Cr 左副腎領域に8cmの腫瘍を認める。組織所見: Differentiating NB 嶋田分類: favorable、DNA ploidy: Diploid、染色体: 46XY、1p欠失なし。

症例3は、1歳11カ月男児。6カ月マススクリーニング実施せず。症状なし。VMA:30.9ug/mg・Cr、HVA:32.4ug/mg・Cr 腹部超音波：左副腎領域に4×3.5cmの腫瘤を認める。組織所見：Poorly differentiated NB 嶋田分類：unfavorable (>1.5Y)、MYCN (FISH)：増幅なし、DNA ploidy: Aneuploid、染色体：46XY、1p欠失あり (10%)。

症例4は、1歳7カ月男児。6カ月マススクリーニング実施せず。症状なし。VMA:58.8ug/mg・Cr、HVA:38.7ug/mg・Cr 腹部超音波：当科精査にて左腎下半部腹側から、内側に存在する6×4cmの腫瘤あり。交感神経節由来で、副腎は腫瘍なし。Stage3で、腫瘍生検術施行。組織所見：Poorly differentiated NB 嶋田分類：unfavorable(>1.5Y)、MYCN (FISH)：増幅なし、DNA ploidy: Aneuploid、

症例5は、1歳9カ月女児。6カ月マススクリーニング実施せず。症状なし。VMA:15.4 ug/mg・Cr、HVA:54.9ug/mg・Cr腹部超音波：副腎に、3.3×3.4×2.4cmの腫瘤あり。Stage2で、腫瘍摘出術施行。組織所見：Poorly differentiated NB 嶋田分類：unfavorable (>1.5Y)、MYCN (FISH) 増幅なし、DNA ploidy: Aneuploid、

症例6は、1歳10カ月女児。6カ月マススクリーニング実施せず。症状なし。VMA:46.3ug/mg・Cr、HVA:31.96ug/mg・Cr 腫瘍は、後腹膜から後縦隔リンパ節、ウイロヒョウリンパ節まで見られ、原発は交感神経節由来?であったが、明確ではなかった。両大腿骨に転移あり。生検にてDifferentiating NBであった。切除標本が小さく、バイオロジーの評価は出来なかった。

1歳半児スクリーニングのデータ処理は日本マススクリーニング学会技術者部会 神経芽腫スクリーニングカットオフ値設定に関するガイドラインに従い平成17年4月～12月分のデータの検討を行った (図2)。棄却後N=16914 VMA/CRE、HVA/CREの平均値はそれぞれ9.51、17.33 標準偏差は1.98、4.43となった。参考に1歳半スクリーニング受検児が6ヶ月スクリーニング受検したときのデータを使用し同様の検討を行った。棄却後N=3133 VMA/CRE、HVA/CREの平均値11.61、20.65 標準偏差2.25、4.89となった。

カットオフ値の検証のため集計表のCut-off、M+3SD、99%タイルを比較したところVMA/CRE、HVA/CREとも99%タイル値15.95、34.78 陽性率1.02% 1.01%と

なり、現在使用中のカットオフ値VMA/CRE 16.0 HVA/CRE 35.0も妥当であった。VMA、HVAとも1歳6ヶ月のほうが平均値、標準偏差とも低く陰性検体と疑陽性検体とがはっきりと分かれる傾向が見られた。(単位 μg/mgCRE)

考察

1歳半児マスでこれまでに発見した6例は、それぞれリスクファクターを有していた。病理組織分類は、6例中4例がpoorly differentiated neuroblastomaであった (表2)。切除時期が1歳半を越えていることより、嶋田分類では、予後不良型となる。6ヶ月マスにおいて、無治療経過観察後に、1歳を越えた時点で、腫瘍が摘出された例は、6例であった。その病理所見の内訳は、poorly differentiatedが3例、ganglioneuroblastomaが2例 (nodular 1例、intermixed 1例)、ganglioneuroma maturingが1例であった。今回、1歳半マスで、発見された症例は、何れもneuroblastoma (poorly differentiated 4例、differentiating 2例)であり、分化度にやや差異が見られた。

N-mycは明かな増幅は認められなかったが、N-myc gainを1例に認めた。FISH法にて1p36欠失を1例に認めた。Ploidyに関しては、2例に、diploid・tetraploidを認めた。これらの症例は、4例は腫瘍の全摘出、1例は部分切除後、骨髄移植を施行した。現在、再発や死亡例は認めていない。スクリーニングが有効であったと考えられる。

疫学的見地ではがん検診は死亡率の減少で評価されるが、死亡数の少ない小児がんについては患者のQOLも評価すべきではないかと考える。

受検率に関しては、未だ、50%程度である。ポスター、パンフレット、ホームページの充実など広報に力をいれて受検率の向上をはかりたい。

結論

2年間弱の短い期間の検討であるので、早急な結論は差し控えたいが、

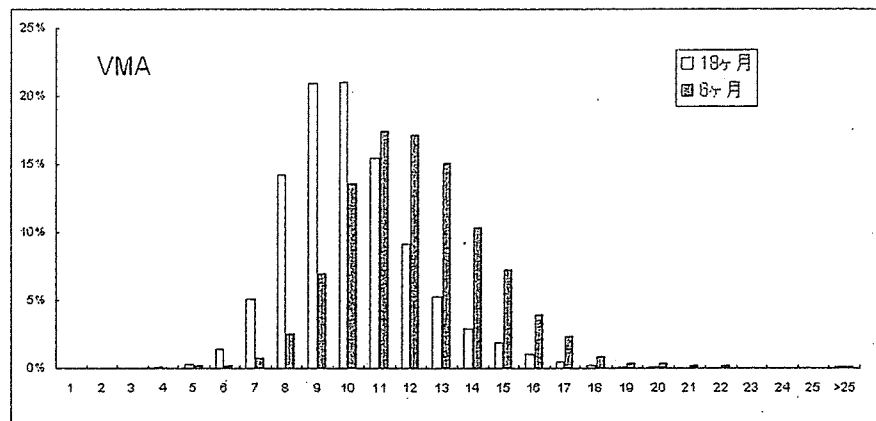
1. 過剰診断は6ヶ月に比べて少ない印象がある。
2. リスクファクターを持つ児を早期にスクリーニングしている。
3. VMA、HVAとも1歳6ヶ月のほうが陰性検体と疑陽性検体とがはっきりと分かれる。

表1 神経芽腫スクリーニング実績 年度推移

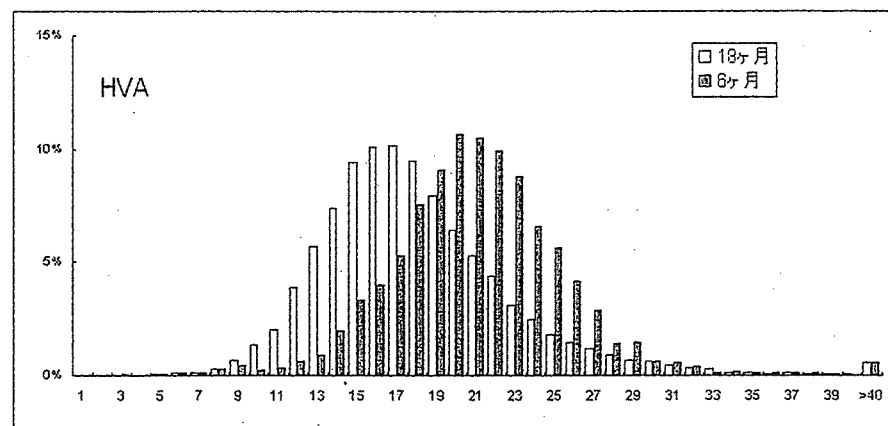
年度	受検者数	精密検査 受診者	神経芽細胞腫							陰性	その他
			I期	II期	III期	IV期	IVs期	不明	合計		
S63	30,178	7	4	1					5	2	
H1	42,018	28	3	5	1	1		1 ¹	11	17	
H2	43,229	32	3	4	3				10	22	
H3	43,656	24	4	4	3		1		8	16	
H4	45,103	43	7	5	2	2		1 ¹	17	26	
H5	45,664	40	4	5	3			2 ²	14	26	
H6	46,151	47	5	3	3		1		12	35	
H7	47,292	41	6	4	3	1	1		15	26	
H8	48,380	52	6	2	5	3			16	35	1 ³
H9	48,854	29	3	2	1				6	22	1 ³
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 ²	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)

図1 1歳半時のVMA・HVAカットオフ値の設定（6ヶ月時の値との比較）



VMA		18ヶ月	6ヶ月
棄却前	N	17,051	3,165
	Mean	9.64	11.70
	SD	2.19	2.46
棄却後	N	16,914	3,133
	Mean	9.51	11.61
	SD	1.98	2.25
	M+2.5SD	14.46	17.24
	M+3SD	15.45	18.36
	M-3SD	3.56	4.85
	99%タイル	15.95	18.99
	99.5%タイル	17.10	20.33
	Cut-off	16.00	16.00



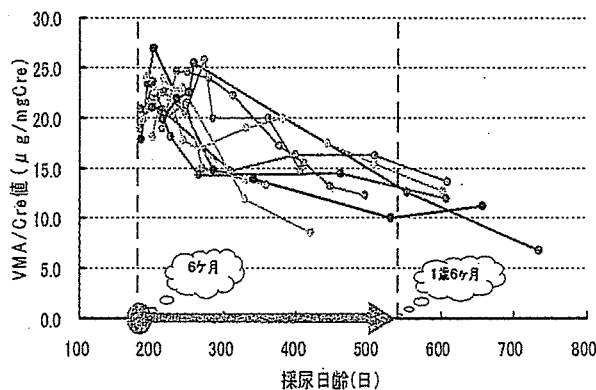
HVA		18ヶ月	6ヶ月
棄却前	N	17,051	3,165
	Mean	17.64	21.15
	SD	5.45	28.64
棄却後	N	16,860	3,164
	Mean	17.33	20.65
	SD	4.43	4.89
	M+2.5SD	28.41	32.88
	M+3SD	30.63	35.33
	M-3SD	4.03	5.98
	99%タイル	34.78	34.24
	99.5%タイル	41.60	42.17
	Cut-off	35.00	35.00

(mean, SDは3SD棄却処理後、%タイルは棄却前の値、陽性率は棄却前の総数に対する割合)

表2 6症例それぞれのリスクファクター

症例1	病理 Poorly differentiated (Unfavorable) バイオロジー N-myc gain Diploid
症例2	バイオロジー tetraploid
症例3	病理 Poorly differentiated (Unfavorable) バイオロジー FISH 1p36欠失10%
症例4	病理 Poorly differentiated (Unfavorable)
症例5	病理 Poorly differentiated (Unfavorable)
症例6	骨転移

図2 採尿日齢によるVMA/Cre値の変化（異常なし）



文献

- Yoneda A, Oue T, Imura K, Inoue M, Yagi K, Kawa K, Nishikawa M, Morimoto 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
- 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、井上雅美、河敬世 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—登録症例に基づく神経芽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16年度報告書 67-71
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*. 1999 ;86:349-63.
- 小児腫瘍分類委員会編：神経芽腫群腫瘍—国際分類INPCによる—小児腫瘍組織カラーアトラス第2巻 第1版 2004
- 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
- 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、井上雅美、河敬世 大阪府における1歳半神経芽腫 登録症例に基づく神経芽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年度報告書 77-81