

いる小児 ALL 再発例を中心として、B 前駆細胞性初発例を含めて免疫学的 MRD の検討を行い、データ解析・報告体制の整備を進める。

B. 研究方法

JPLSG/JACLS マーカー解析センターで初発もしくは再発時の診断を行った症例のうち、平成 20 年度の時点で前向き臨床試験が実施されていない小児の初発・再発 ALL 例において、検体の提供の同意を得られた 7 例の再発 ALL、7 例の初発 B-precursor ALL、合計 14 例について新たに検討を行った。

1. 診断検体送付時と同様に、検体送付施設は送付時に「MRD 検索依頼状」を検査施設に送付した上で、ヘパリン加骨髄（もしくは末梢血）を宅配便で送付する。

2. 送付された骨髄は比重遠心法を用いて単核球分離し、細胞数を調整した上で、各チューブに 10 の 6 乗個ずつ分注され、すでに報告された MRD 診断パネルに従って蛍光染色する。

3. 調整されたサンプルは BD Bioscience 社の FACS Calibur もしくは FACS Canto II フ FCM にてデータ収集を行い、MRD を解析する。

4. 解析された MRD の結果はデータベースに保存され、検体受領後 1 週間以内にファックスで報告する。ドットプロットを含む詳細データは後日郵送で報告する。

C. 研究結果

本年度は 7 例の再発 ALL、7 例の初発 B-precursor ALL、合計 14 例において、再発/初発の診断後、治療開始後 2 週および 4-5 週の少なくともいずれか一方の MRD フォローを行った。いずれの症例においても FCM による MRD のフォローは可能であった。治療開始後 2 週では全例で MRD が検出可能で、再発例では 0.32-53.68%、初発例では 0.06-18.83%であった。治療開始後 4-5 週では、再発例では 1 例のみが検出限界である 0.01%以下となったが、他は 0.02-71.36%と陽性が持続し、初発例では 3 例が陰性化し、他は 0.01-0.71%であった。通常、各ポイントでは最大 3 項目で MRD を検討するが、再発例では 1 例/2 例 (2 週/4 週) で、初発例で

は 4 例/2 例で項目数を減ずる必要があった。

平成 20 年 11 月 13 日には本研究の協力者である St. Jude 小児病院の Dr. Campana と Dr. Coustan-Smith が三重大学を訪れ、現在までの FCM-MRD パイロット研究の検討を行った。細胞数が少ない場合や赤血球混入が多い場合の対処法の検討の他、現在まで行ってきた JACLS ALL-02 プロトコールにおける day 15, day 33 臨床検体における結果とその問題点などを検討した。また三重大学に導入された FACS Canto II を用いた最大 6 カラー (現在の FACS Calibur は 4 カラー) を用いた新規抗原を用いた解析、細胞質内抗原染色用試薬の供給体制などについても検討を行った。

D. 考察

通常、FCM による MRD は検出感度が 0.01%と報告されている。すなわち 100 万個の細胞を解析した場合にはおよそ 100 個のイベント数となる。実際には 100 万個の細胞で検体を作成しても、遠心や各種処理のため実際の解析細胞数はおおよそ 30-70 万個であった。これらの数字は良好な MRD ゲートを設定出来た症例においては十分な数値であり、実際、検出限界感度である 0.01%以下の割合であっても、白血病クローンの残存を疑わせる症例も存在し、検査手技そのものには大きな問題はないと考えられた。

治療中検体では時に細胞数が極端に少なく、のべ 8 例で解析項目数の減数が必要であった。またそのうち 3 例では解析項目数が 1 項目かつ解析イベント数 10 万以下となったが、これらの症例では比較的高い MRD 値 (0.01, 0.50, 18.83%) を示し、いずれも明確な MRD として指摘した。

通常は検体を平日午前中の受付としていたが、患者都合により週末の検体受付となった例が合計 3 例あった。このうち 2 例では採取から 48 時間以内に解析し得たが、再発時検体に配送上の問題から検体処理が採取から 72 時間となった 1 例が存在したが、MRD 自体は問題なく検出し得た。

E. 結論

1. FCM を用いた MRD は今回検討を行った 14

例すべてでMRDの評価が可能であった。

2. 治療開始後2週間では全例が陽性であったが、初発例では解析項目数・細胞数が少ない傾向にあった。初発例の治療開始後day33では約半数が陰性化していた。

3. 再発症例でも初発症例と同様にMRDが検出可能であったが、治療開始後4週のMRDは1例を除いて全例陽性であった。

4. 今後は再発ALL治療研究などで観察を行うことにより、より多数の症例を用いて予後との関連を調べる必要がある。今回の検討で、検査の質では問題がないと考えられた。

5. 研究体制については今後も検討を行う。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

(1) 出口隆生

小児白血病におけるフローサイトメトリーを用いた微小残存病変の解析

日本小児血液学会誌 22(4):293-299, 2008

(2) Dida F, Li Y, Iwao A, Deguchi T, Azuma E, Komada Y

Resistance to TRAIL-induced apoptosis caused by constitutional phosphorylation of Akt and PTEN in acute lymphoblastic leukemia cells.

Exp Hematol. 36(10):1343-53, 2008.

2. 学会発表

(1) 出口隆生、清河信敬、太田秀明、鶴澤正仁、堀部敬三、駒田美弘

小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化のための外部精度管理

平成20年11月16日 第50回日本小児血液学会

日本小児血液学会誌 プログラム・総会号 p236, 2008

(2) 出口隆生

小児ALL 多施設共同研究における治療早期反応性と微小残存病変の臨床応用への課題

平成20年11月16日 第50回日本小児血液学会

日本小児血液学会誌 プログラム・総会号 p164, 2008

(3) 橋井佳子、堀 浩樹、鈴木信寛、川崎裕英、遠藤幹也、吉田 真、佐藤 篤、末延聡一、伊藤康彦、森本 哲、松本公一、原 純一、長谷川大一郎、茶山公祐、宮地良介、西村真一郎、谷澤明彦、宇佐美郁哉、出口隆生、高橋良博、堀部敬三、八木啓子(小児白血病研究会 ALL小委員会)

JACLS ALL02治療研究におけるL-asparaginase 膵炎発症の危険因子の検討

平成20年10月12日 第70回日本血液学会総会
臨床血液 49(9):923, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

小児造血器腫瘍の病理中央診断システム確立のための研究

研究分担者 中川 温子 国立成育医療センター病理診断科 医長

研究要旨 小児悪性リンパ腫の臨床研究推進の基盤となる病理中央診断を実施した。病理中央診断システムは、臨床試験参加症例の適格性を確認するための Rapid Review (中間報告)と最終的な病理診断を決定する Group Review により構築され、H&E 染色標本だけでなく、中央診断施設で施行された免疫組織化学染色、in situ hybridization 法による EBV-RNA の検索結果を加味して、総合的な診断を行った。平成 20 年 4 月から平成 21 年 2 月までの 12 ヶ月間に 123 例の中央診断を実施し、JPLSG 悪性リンパ腫臨床試験が開始されて以来 3 年余の間に中央診断された症例は 392 例となった。Group Review によるコンセンサス診断(最終報告)が終了した症例は 271 例で、主な組織型別頻度は、diffuse large B-cell lymphoma 47 例、Burkitt lymphoma 55 例、precursor T lymphoblastic lymphoma 44 例、precursor B lymphoblastic lymphoma 16 例、anaplastic large cell lymphoma 72 例、cutaneous anaplastic large cell lymphoma 7 例であった。不適格(診断がよい)例は 12 例(4.4%)であった。中央病理診断中間報告と最終報告で、プロトコル変更となる診断変更例は無かった。さらに診断精度の向上と生物学的特性の解析を目的とし、c-myc 遺伝子、BCL-2 遺伝子、EWS 遺伝子、FKHR 遺伝子の転座を FISH 法により検索した。これらの遺伝子解析は、リンパ腫の病型診断や他の小児悪性腫瘍との鑑別に有用であり、小児悪性リンパ腫の生物学的特性を明らかにする上でも重要と考えられた。

研究協力者(病理判定委員)

大島孝一 久留米大学医学部
田丸淳一 埼玉医科大学総合医療センター
中峯寛和 奈良県立医科大学
中村栄男 名古屋大学医学部
藤本純一郎 国立成育医療センター
北條 洋 福島県立医科大学医学部
松野吉宏 北海道大学医学部附属病院
吉野 正 岡山大学大学院医歯学総合研究科

A. 研究目的

小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立を行うにあたって、病理学的診断の標準化を目指す。また、治療反応性などの予後を左右する病理所

見や生物学的特性の解明を目指す。

B. 研究方法

1) 病理診断基準

小児悪性リンパ腫の各病型についての診断基準は WHO 分類(2001)に準拠した。Anaplastic large cell lymphoma (ALCL)についてはヨーロッパとの共同研究(ALCL99)における国際中央病理医会議での検討結果をふまえた基準を採用した。ALK 陰性 ALCL 症例は、ALK1, ALKc, p-80 の ALK 抗体カクテルを用いて再検し、in situ hybridization 法による EBV 検索を追加した。免疫染色は 2ヶ所(国立成育医療センターと久留米大学)の中央診断施設で表1に示す抗体パネルを用いて行った。

表1 鑑別診断のための免疫染色項目

| 病型 | 必須マーカー | 追加マーカー |
|-------------------------|--|--|
| Mature B BL DLBCL | CD20 CD79a CD3 TdT MIB1 | CD10 BCL2 BCL6 Mum1 (IRF4) EBER1 (ISH) |
| LBL T-LBL B-LBL | CD20 CD79a CD3 CD43 TdT MPO | CD56 |
| ALCL | CD30 ALK1 CD2,3,5 CD43 EMA TIA-1 and/or Granzyme B | CD15 CD79a,CD20 CD45RO CD56 LMP-1 BCL-2 EBER1(ISH) |

また、捺印標本、ホルマリン固定パラフィン切片を用いた FISH 法により c-myc 遺伝子、BCL-2 遺伝子、EWS 遺伝子、FKHR 遺伝子の転座を検索した。

2) 中央診断手順

病理中央診断の手順は以下のごとくとした。すなわち、複数存在する小児血液腫瘍研究グループの各々に病理中央診断医(久留米大学・大島、国立成育医療センター・中川および国立成育医療センター研究所・藤本の合計 3 名)を配置し、当該病理医の診断 Rapid Review(中間報告)でプロトコル適合性を決定する方針とした。また、年に複数回の病理判定委員会を開催し、9名の血液病理医による Group Review にてコンセンサス診断を下し、最終診断(最終報告)とする方針とした。ALCL については ALK が陰性となる場合に限り、上記 3名のコンセンサス診断を決定しそれに基づいてプロトコル適合性を決定する方針とした。

C. 研究結果

1) リンパ腫中央病理診断

2009年2月28日までに、JPLSG 登録(いずれかの臨床試験プロトコルへの登録)457例中、392例を中央診断した。胸水、腹水、骨髄などの液状検体や検体微小で提出不能な例を除いた中央診断率は95%であった。9名の病理判定委員の Group Review によるコンセンサス診断(最終報告)が終了した症例は 271例で、主な組織型別頻度は、diffuse large B-cell lymphoma 47例、Burkitt lymphoma 55例、precursor T lymphoblastic lymphoma 44例、precursor B lymphoblastic lymphoma 16例、anaplastic large cell lymphoma 72例、cutaneous anaplastic large cell lymphoma 7例であった。臨床試験プロトコル登録例で中央診断(最終診断)された 271例中、プロトコル不適合(診断ちがひ)例は 12例(4.4%)であった。中央病理診断中間報告と最終報告で、プロトコル変更となる診断変更例はなかった。

2) ホジキンリンパ腫中央病理診断

JPLSG ホジキンリンパ腫ワーキンググループで集積されたホジキンリンパ腫症例および JPLSG 登録例でホジキンリンパ腫と中央診断された症例、計 36例について病理診断委員が review した。組織学的亜型分類および EBER-ISH によるホジキン細胞における EBV 感染の有無を検討した。亜型分類は、Nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma 5例、classical Hodgkin lymphoma 31例(lymphocyte rich 3, mixed cellularity 10, nodular sclerosis 18)であった。JPLSG ホジキンリンパ腫ワーキンググループで集積されたホジキンリンパ腫症例 29例において施設診断と中央診断を比較したが、29例すべて Hodgkin lymphoma としては一致した。亜型変更が 3例みられた。classical Hodgkin lymphoma 31例のうち EBER-ISH 陽性例は 18例(58.1%)であった。

3) FISH法による遺伝子解析

a) Mature B-cell neoplasm における c-myc 転座
diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) 28例、

Burkitt lymphoma (BL) 68 例、BL と DLBCL の鑑別が困難な例 10 例、B-ALL 8 例について、Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis) を用いて c-myc 遺伝子転座を検索した。DLBCL 24 例、BL 55 例、BL/DLBCL 6 例、B-ALL 5 例が判定可能であった。C-myc 転座は、DLBCL 3 例 (12.5%)、BL 44 例 (80%)、BL/DLBCL 3 例 (50%)、B-ALL 5 例 (100%) に認められた。

b) Follicular lymphoma における BCL-2 転座
Follicular lymphoma grade 3b と診断された 2 例では、成人例では通常認められる BCL-2 遺伝子の転座が認められなかった。

c) EWS, FKHR 転座

リンパ腫が疑われた症例の中に Ewing sarcoma, alveolar rhabdomyosarcoma と中央診断された症例が各 1 例あった。これらの症例では、それぞれ、EWS, FKHR 遺伝子の転座が FISH 法にて確認された。

D. 考察

小児リンパ腫臨床試験登録症例の 95% が病理中央診断されており、病理中央診断システムは、臨床試験適格性についての判断基準 (診断の確認) として十分に機能している。不適格 (診断ちがひ) 例は 12 例 (4.4%) で、中央病理診断中間報告と最終報告で、プロトコール変更となる診断変更例は無かった。ただし、BL と DLBCL との鑑別は、典型的な組織像を呈さない場合には、免疫組織化学染色結果、c-myc 遺伝子の転座を加味しても困難な症例が 9% 程度認められた。網羅的な遺伝子解析で molecular Burkitt lymphoma というカテゴリーに分類される症例の中には、組織学的に典型的な DLBCL が含まれていることが最近報告され、両者の鑑別は昏迷を極めており、ついに 2008 年に改訂された WHO 分類では、intermediate between Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma という中間的 분류が新規に掲載された。本研究においても、組織学的に典型的な DLBCL と診断された 24 例中 3 例に c-myc 転座が認められた。小児の DLBCL は成人と異なり、そのほとんどが germinal center B-cell type で、非

常に高い増殖能を有している。この点から、BL と同じ治療戦略がとられているが、小児における DLBCL の頻度は低く、BL との予後の違いについては不明である。また、Follicular lymphoma grade 3b と診断された 2 例では、成人例では通常認められる BCL-2 遺伝子の転座が認められなかった。成人と小児では、同じ病型であっても、生物学的特性が異なる可能性がある。小児の Follicular lymphoma では、BCL-2 蛋白の発現や BCL-2 遺伝子転座が認められないことが報告されており、より、germinal center B-cell type の DLBCL に近い腫瘍であると推察される。JPLSG 登録症例において DLBCL は欧米に比べてやや頻度が高く、稀な小児の Follicular lymphoma も含めて、JPLSG 臨床研究の中で、これらの腫瘍の治療反応性や生物学的特性が明らかになっていくことが期待される。

E. 結論

小児リンパ腫における中央病理診断システムは確立し、臨床試験における基盤として十分に機能している。さらに遺伝子転座などの遺伝子診断を取り入れた、より総合的な病理診断を試みた。小児の DLBCL や follicular lymphoma は成人と生物学的特性が異なることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato T, Kaneda M, Ichikawa M, Suzuki D, Nakagawa A, Kobayashi R. Current approaches to management of central fungal infection in pediatric patients with hematologic disorders. *J Pediatr Heatol Oncol* 30(3):249-253, 2008
- 2) Hossain MS, Ozaki T, Wang H, Nakagawa A, Takenobu H, Ohira M, Kamiyo T, Nakagawara A. N-MYC promotes cell proliferation through a direct transactivation of neuronal leucine-rich repeat protein-1 (NLRR1) gene in neuroblastoma. *Oncogene* 27(46):6075-6082, 2008

- 3) Yokoyama S, Kasahara M, Fukuda A, Sato S, Koda F, Nakagawa A. Epstein-Barr virus-associated erythema nodosum after living-donor liver transplant - a case report. Liver Transplantation [in press]
- 4) Ando K, Takenobu H, Nakagawa A, Ohira M, Kamijo T, Nakagawara A. Expression of TSLC1 a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23 is down-regulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation. Int J Cancer 123(9):2087-2094, 2008
- 5) Yajima M, Inadome K, Nakagawa A, Watanabe S, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that produces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. J Infectious Dis 198(5):673-682, 2008
- 6) 佐藤智信, 山本浩史, 安田一恵, 中川温子, 小林良二, 小林邦彦 「腹腔内破裂をきたした腎細胞癌の女兒例」 小児がん 45(1):51-55, 2008
- 7) Matsubara K, Tanaka T, Taki T, Nakagawa A, Nigami H, Tamura A, Fukaya T. ATIC-ALK-positive anaplastic large cell lymphoma: a case report and review of the literature. 臨床血液 49(5):325-330, 2008
- 8) 中川温子, 大喜多肇 「小児固形腫瘍の病理(2)神経芽腫群腫瘍・腎腫瘍・胚細胞腫瘍」病理と臨床 26(9):938-944, 2008

2. 学会発表

- 1) A Nakagawa. Advanced Neuroblastoma Research 2008 「MYCN amplified Neuroblastoma with Favorable Histology」Chiba, Japan 5月22日 2008.
- 2) 中川温子, 大喜多肇, 松岡健太郎. 第28回小児病理研究会 「小児ホジキンリンパ腫の臨床病

理的検討ーEBVとの関連についてー」松本 9月6日 2008.

- 3) 恩田恵子, 清川信敬, 藤本純一郎, 齊藤正博, 大喜多肇, 梶原道子, 福島敬, 犬飼岳史, 牧本敦, 真部淳, 康勝好, 中川温子, 小原明, 林泰秀, 花田良二, 土田昌宏. 「東京小児がん研究グループ(TTCSG)急性リンパ性白血病(ALL)マーカー中央診断におけるT-ALLのマーカー解析」第50回日本小児血液学会 千葉 11月14日 2008.
- 4) 黒田達夫, 松岡健太郎, 本名敏郎, 森川信行, 田中秀明, 高安肇, 藤野明浩, 種村比呂子, 武藤充, 中川温子, 熊谷昌明, 森鉄也, 野坂俊介, 正木英一. 「進行神経芽腫における微小転移の臨床的意義」第24回日本小児がん学会 千葉 11月14日 2008.
- 5) 山本真実, 末永雄介, 中川温子, 上條岳彦, 中川原章. 「神経芽腫予後因子としてのp53ファミリー発現量」第24回日本小児がん学会 千葉 11月14日 2008.
- 6) 坂田尚己, 上田悟史, 八木誠, 木村雅友, 青木光希子, 中川温子, 竹村司. 「悪性末梢神経鞘腫におけるPDGFRの発現とイマチニブおよびJNK阻害剤の効果」第24回日本小児がん学会 千葉 11月14日 2008.
- 6) 野中裕子, 木澤洋恵, 二宮佑美, 吉村稔, 山下敦, 塩田曜子, 森鉄也, 中川温子 「小児ランゲルハンス組織球症における骨髄評価」第55回日本臨床検査医学会学術集会 名古屋 11月29日 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)
分担研究報告書

小児造血器腫瘍の分子・細胞遺伝学的中央診断システム確立のための研究

研究分担者 林泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨 小児造血器腫瘍の大規模治療研究では標準的分子・細胞遺伝学的診断の確立は重要であり、これまでにワーキンググループにより診断基準の作成を行ってきた。JPLSG の分子・細胞遺伝学的診断委員会は、分子診断と微小残存病変(minimal residual disease, MRD)の2つを大きな課題として取り組んでいる。今年度は、急性骨髄性白血病(AML)のAML-05 プロトコールでは、初診時のキメラ遺伝子、*FLT3* 遺伝子およびキメラ遺伝子を用いたMRDを国立病院機構名古屋医療センターで行い、さらに形態、マーカーと染色体/遺伝子解析結果の中央診断が順調に動いて診断の精度の向上に貢献している。再発急性リンパ性白血病(ALL)と T-ALL のプロトコール開始に向けて表面マーカーを用いたMRDと免疫グロブリン遺伝子およびT細胞受容体遺伝子を用いたMRDの準備を行っている。

研究協力者

岩本彰太郎 (三重大学医学部)
太田秀明 (大阪大学医学部)
清河信敬 (国立成育医療センター研究所)
滝 智彦 (京都府立医科大学)
出口隆生 (三重大学医学部)
照井君典 (弘前大学医学部)
堀 寿成 (愛知医科大学)
横澤敏也 (国立病院機構名古屋医療センター
臨床研究センター)
横田昇平 (京都府立医科大学)

A. 研究目的

小児造血器腫瘍の大規模治療研究では、染色体・遺伝子異常が診断、治療法の決定や予後の予測に重要である。これまでに分子・細胞遺伝学的診断標準化のワーキンググループで、診断の基準のガイドラインの作成を行った。また一昨年に立ち上がった、JPLSG 分子・細胞遺伝学的診断委員会(以下分子診断委員会)では、今年度は、AML-05 プロトコールの形態、マーカー、キメラ遺伝子等の結果の中央診断とキメラに

よる微小残存病変(minimal residual disease, MRD) (キメラMRD)が順調に行われ、診断の精度を高めている。さらにプロトコールが立ち上がる再発急性リンパ性白血病(ALL)と T-ALL での分子診断と MRD の検索システムを立ち上げる準備を行っている。

B. 研究方法

昨年度に引き続きAML-05 プロトコールのキメラ遺伝子の中央診断とキメラMRDの整備を行った。全登録症例の形態、マーカー、染色体、キメラ遺伝子、*FLT3*・internal tandem duplication (ITD)の結果について、それぞれの専門の委員からなる診断小委員会による最終診断およびリスク分類に関与する予後因子の確認を行い、診断の精度を高めている。

MRDについては、再発ALL、T-ALL、B前駆型 ALL のフローサイトメトリー(FCM)によるMRD(FCM-MRD)と、免疫グロブリン(Ig)とT細胞受容体(TCR)遺伝子によるMRD(分子MRD)を行う準備を行っている。

C. 研究結果

第1回分子診断委員会

平成 20 年 6 月 14 日に名古屋で開催した。

FCM-MRD は三重大学小児科の出口隆夫先生に責任者となっていた。

(1)各プロトコルにおけるMRDの推進と解析
1. 再発 ALL(堀壽成委員、岩本彰太郎委員)

分子 MRD では、従来行ってきた半定量的 PCR から RQ-PCR へ移行するためシステムを立ち上げている。まず再発 ALL と T-ALL について施行することになるが、この症例数であれば施行可能である。今後、B-precursor ALL がスタンディーに加わってきた場合、コストや人員面での体制についてはどうなるか検討する必要がある。検査費用については再発-ALL や T-ALL では堀部班のサポートが得られるが、RQ-PCR に移行すると費用は高くなり、今後の検討課題となる。検出率は現在は約 80% だが、もう少し率を上げられるようにプライマーの設定を変更し、精度を上げる努力をしている。

FCM-MRD については再発 ALL 委員会で検討され、今回の研究では観察研究のみで、検索ポイントは分子 MRD 同様に 8 ポイントとなっているが、費用の面が問題になる。FCM-MRD はプロトコル本体に組み入れるのか、附随研究にするのか今後の検討課題である。費用の面でポイント数を減らすなどの検討を要する。FCM-MRD を全例三重大学で行い、再発診断はすべて成育医療センターで施行するようになっていたが、実際の再発診断や MRD 設定には初診時の診断情報があった方が良いので、診断については JACLS と TCCSG の各 1 施設で行うか、全体で 1 施設でやるか等検討を要する。

2. T-ALL(出口隆生委員)

T-ALL プロトコルの骨格が決まってきて、BFM 同様にプレドニン反応性とポイント 2 の MRD で層別化を行うことになる。ポイント 2 の BMA 後、6MP 内服が開始されるが、8 日目に大量 MTX が入ってくるので、その前にポイント 2 の MRD 結果を出す必要がある。しかし実際には再検が必要な場合もあるため、現在の CCLSG でも 2 週間

の報告猶予期間を設けている。これについては ALL 委員会で早急に検討を要する。

FCM-MRD については、当初は観察研究の予定であったが、BFM で行うように分子 MRD が測定できなかった症例(10-20%)では day 15 の FCM-MRD で層別化することを考えている。BFM では 10%以上、0.1%以上10%以下、0.1%以下の 3 群で分けている。そのため day 15 の FCM-MRD は全例で検索するためプロトコル本体に入れていく必要があると考えている。ただ現時点では、T-ALL は中央診断する施設も決まっていないこと、診断パネルも決定していないことなどの問題を解決する必要がある。T-ALL、B-precursor の診断はマーカー診断後に決定されるので、ALL 全体の診断の問題もあり、診断については免疫診断委員会や全体で決定する必要がある。MRD のこともあり T-ALL 委員会に出口隆生委員が参加してきたが、分子診断面からのアプローチも必要であり、T-ALL では林泰秀委員が、それ以外では滝智彦委員が担当することとなった。

3. 乳児 ALL(滝智彦委員)

現在新規プロトコル MLL09 を作成中であり、その中で観察研究として MRD を行う予定である。MRD の方法については他の ALL と同様に分子と FCM の両方を行い、さらに MLL 関連のキメラ mRNA による MRD も行う。3 種類のこれらの結果により、次々期プロトコルでの MRD による層別化の可能性を探る。しかし、それぞれの方法に問題点が存在する。これまでのところ乳児 ALL における TCR/IG による分子 MRD は BFM でもやっているが、あまり詳細なデータはなく文献化もされていない。また、MLL-03 ではキメラ mRNA による MRD を 16 例しか追跡できていない。一方、FCM-MRD についても報告はまれであるが、CD10 陰性症例はそれだけでもある程度追跡できるので可能では

ある。さらに、現在3種類の方法でのMRDの測定を計画しているが、乳児の骨髄からそれらの検査をすべてできる量を採取できるかという問題があり、優先順位を考えた検討が必要になる。

4. AML-05(横澤敏也委員)

AML-05では161例のキメラ解析を行い64例(40%)でキメラを検出した。AML1-ETOが半数以上を占め、2例でPML-RAR α を検出し、4例で検体量が不足であった。P05ではPML-RAR α 陰性が1例あった。FLT3-ITDは159例の解析で24例(15%)が陽性であった。FLT3-ITDはDNA量不足が4例あり、cDNAで解析をやり直した例もある。附随研究のキメラ遺伝子を用いたMRDはAML-05の30例で97検体、P05では6例で14検体の登録がある。AML1-ETOは残存する傾向がみられた。t(9;22)が3例みられ、全例minor BCR-ABL陽性で、マーカーでCD10が出た例もみられた。リスク分類に関連していることから今後キメラスクリーニングに入れる必要があるかも知れない。

(2)分子中央診断(滝智彦委員)

AML-05登録症例の形態、マーカー、染色体とキメラなどが不一致であった症例についてメールで検討を行っている。データセンターから染色体、キメラ遺伝子、FLT3-ITD、マーカーの検査結果が担当委員宛に全例送付されている。多い時は1日に4例の送付がある。

(3)委員会内の役割分担(林泰秀委員)

委員長は引き続き林泰秀委員が務めることが決定された。現在、MRDは分子診断の中に入っているが、やや色合いの異なる面もあり将来的には分けることも考えている。天理よろず相談所病院の林英蔚委員が留学のため委員会を離れた。今年度の役割分担については、岩本彰太郎委員、清河信敬委員、堀壽成委員が再発ALLのプロトコルに参画している。ALL委員会には出口隆生委員が分子診断委員会からという立

場で参加している。乳児は滝智彦委員が引き続き担当する。Ph1とCML委員会には太田秀明委員が、移植委員会からの派遣も兼ねて参加する。リンパ腫委員会から分子診断委員会へ派遣がある予定である。HLH委員会とJMML委員会からは愛媛大学や名古屋大学から実際に検査を担当している方に入ってもらうことを考えていく。公募も考えていくが、この委員会は各々の研究グループとは関係なく、実際に分子診断に関わっている人に参加してもらう方向で考えている。

D.考察

AMLのAML-05プロトコルでは、キメラ遺伝子を用いたMRDも行っている。またAMLの中央診断が開始され、診断の精度が高まり、臨床試験のレベルの向上に貢献している。

ALLにおいては、FCM-MRD解析は費用が安価である利点があるが、実際にやっていくなかでいくつかの問題を検討中である。プロトコルが開始される再発ALLやT-ALLについてはMRDの実用化の検討を行っており、抗体の統一も含め標準化を3施設で検討している。

遺伝子を用いたALLの分子MRDでは、検索は愛知医科大学小児科で行う予定で、再発ALLとT-ALLでは準備中である。検索を行う人員、費用の問題があり、特にB前駆型ALLの分子MRDを行うのであれば、愛知医科大学以外のもう一施設でも検索できる施設を立ち上げる必要がある。

E.結論

今年度はAMLの中央診断が順調に行われている。また再発ALLとT-ALLのMRDの実用化について検討を行い準備している。

F.健康危険情報

該当なし。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Kawamura M, Kaku H, Taketani T, Taki T, Shimada A, Hayashi Y. Mutations of

- GATA1, FLT3, MLL-partial tandem duplication, NRAS, and RUNX1 genes are not found in a 7-year-old Down syndrome patient with acute myeloid leukemia (FAB-M2) having a good prognosis. *Cancer Genet Cytogenet.* 180 : 74-78, 2008
2. Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, Suda T. Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. *Genes Dev.* 22 :986-991, 2008
 3. Tauchi H, Tomizawa D, Eguchi M, Eguchi-Ishimae M, Koh K, Hirayama M, Miyamura N, Kinukawa N, Hayashi Y, Horibe K, Ishii E. Clinical features and outcome of MLL gene rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants with additional chromosomal abnormalities other than 11q23 translocation. *Leuk Res.* 32 : 1523-1529, 2008
 4. Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Taketani T, Hanada R, Tawa A, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Tandem duplications of MLL and FLT3 are correlated with poor prognoses in pediatric acute myeloid leukemia: A study of the Japanese childhood AML Cooperative Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 50 : 264-269, 2008
 5. Chinen Y, Taki T, Nishida K, Shimizu D, Okuda T, Yoshida N, Kobayashi C, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y, Taniwaki M. Identification of the novel AML1 fusion partner gene, LAF4, a fusion partner of MLL, in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with t(2;21)(q11;q22) by bubble PCR method for cDNA. *Oncogene.* 27 : 2249-2256, 2008
 6. Suzuki M, Kato M, Chen Y, Takita J, Sanada M, Nannya Y, Yamamoto G, Takahashi A, Ikeda H, Kuwano H, Ogawa S, Hayashi Y. Whole genome profiling of chromosomal aberrations in hepatoblastoma using high-density single nucleotide polymorphism genotyping microarrays *Cancer Science.* 99 : 564-570, 2008
 7. Manabe A, Ohara A, Hasegawa D, Koh K, Saito T, Kiyokawa N, Kikuchi A, Takahashi H, Ikuta K, Hayashi Y, Hanada R, Tsuchida M. Significance of the complete clearance of peripheral blasts after 7 days of prednisolone treatment in children with acute lymphoblastic leukemia: the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Haematologica.* 93 : 1155-60. 2008
 8. Sawada T, Nishiyama C, Kishi T, Sasazuki T, Komazawa-Sakon S, Xue X, Piao JH, Ogata H, Nakayama J, Taki T, Hayashi Y, Watanabe M, Yagita H, Okumura K, Nakano H. Fusion of OTT to BSAC results in aberrant up-regulation of transcriptional activity. *J Biol Chem.* 283:26820-8, 2008
 9. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature.* 455:971-974. 2008
 10. Hiwatari M, Ono R, Taki T, Hishiya A, Ishii E, Kitamura T, Hayashi Y, Nosaka T. Novel gain-of-function mutation in the extracellular domain of the PDGFRA gene in infant acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23). *Leukemia.* 22 : 2279-2280, 2008
 11. Taketani T, Taki T, Sako M, Ishii T,

- Yamaguchi S, Hayashi Y. MNX1-ETV6 fusion gene in an acute megakaryoblastic leukemia and expression of the MNX1 gene in leukemia and normal B cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 186 : 115-119, 2008
12. Shimada A, Kato M, Tamura K, Hirato J, Kanegane H, Takechi Y, Park MJ, Sotomatsu M, Hatakeyama S, Hayashi Y. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with uncontrolled inflammatory cytokinemia and chemokinememia which were caused by systemic anaplastic large cell lymphoma: A case report and review of the literature *J Pediatr Hematol Oncol* 30 : 785-787, 2008
 13. Matsushita H, Nakajima H, Nakamura Y, Tsukamoto H, Tanaka Y, Jin G, Yabe M, Asai S, Ono R, Nosaka T, Sugita K, Morimoto A, Hayashi Y, Hotta T, Ando K, Miyachi H. C/EBPalpha and C/EBPvarepsilon induce the monocytic differentiation of myelomonocytic cells with the MLL-chimeric fusion gene. *Oncogene*.27 : 6749-6760, 2008
 14. Ohnishi H, Taki T, Yoshino H, Takita J, Ida K, Ishii M, Nishida K, Hayashi Y, Taniwaki M, Bessho F, Watanabe T. A complex t(1;22;11)(q44;q13;q23) translocation causing MLL-p300 fusion gene in therapy-related acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 81 : 475-480, 2008
 15. Shimada A, Hirato J, Kuroiwa M, Kikuchi A, Hanada R, Wakai K, Hayashi Y. Expression of KIT and PDGFR is associated with a good prognosis in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 50 : 213-7, 2008
 16. Kitoh T, Taki T, Hayashi Y, Nakamura K, Irino T, Osaka M. Transient abnormal myelopoiesis in a Down syndrome newborn followed by acute myeloid leukemia: identification of the same chromosomal abnormality in both stages. *Cancer Genet Cytogenet.* 188 : 99-102, 2009
 17. Jo A, Tsukimoto I, Ishii E, Asou N, Mitani S, Shimada A, Igarashi T, Hayashi Y, Ichikawa H. Age-associated difference in gene expression of pediatric acute myelomonocytic lineage leukemia (FAB M4 and M5 subtypes) and its correlation with prognosis. *Brit J Haematol* (in press)
 18. Park MJ, Taki T, Oda M, Watanabe T, Yumura-Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. FBXW7 and NOTCH1 mutations in childhood T cell acute lymphoblastic leukaemia and T cell non-Hodgkin lymphoma. *Brit J Haematol* (in press)
2. 学会発表
1. Park MJ, Taki T, Oda M, Yagi K, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y : FBW7 and NOTCH1 mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell non-Hodgkin's lymphoma ; a Japan association of childhood leukemia study group. 第48回イギリス血液学会 2008.4.5-9 イギリス
 2. 山田佳之、林泰秀:好酸球增多症候群/好酸球形白血病マウスモデルの検討。第111回日本小児科学会学術集会 2008. 4.25-27 東京
 3. 滝田順子、陳玉彦、加藤元博、山本豪、南谷泰仁、真田昌、菊地陽、小川誠司、林泰秀、五十嵐隆:横紋筋肉腫における網羅的ゲノム解析。第111回日本小児科学会学術集会 2008.4.25-27 東京
 4. 加藤元博、滝田順子、陳玉彦、康勝好、井田孔明、菊地陽、滝智彦、林泰秀、小川誠司、五十嵐隆:マイクロアレイを用いた乳児白血病の網羅的ゲノム・エピゲノム解析。第111回日本小児科学会学術集会 2008. 4.25-27 東京
 5. 陳玉彦、加藤元博、滝田順子、中村文彦、山本豪、真田昌、南谷泰仁、小川誠司、林

- 泰秀、五十嵐隆:若年性急性骨髄単球性白血病における網羅的ゲノム・メチル化解析。第 111 回日本小児科学会学術集会 2008.4.25-27 東京
6. 加藤元博、滝田順子、陳玉彦、大平美紀、山本豪、真田昌、南谷泰仁、五十嵐隆、菊地陽、中川原章、小川誠司、林泰秀:神経芽腫における網羅的ゲノム解析。第 5 回北関東がんセミナー 2008.5.10 高崎
 7. Kato M, Takita J, Ohira M, Chen YY, Sanada M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Ogawa S : Molecular allelo-karyotyping of neuroblastoma using high-resolution single nucleotide polymorphism genomic microarrays. ANR 2008.5.21-24 千葉
 8. Kato M, Iio M, Takita J, Chen YY, Nakamura F, Sanada M, Watanabe T, Igarashi T, Ogawa S, Hayashi Y : Genome-wide analysis of epigenetic abnormalities in neuroblastoma using oligonucleotide tiling array. ANR 2008.5.21-24 千葉
 9. Takita J, Chen YY, Kato M, Yamamoto G, Sanada M, Nannya Y, Kikuchi A, Igarashi T, Ogawa S, Hayashi Y :High-resolution copy number analysis and identification of target genes in neuroblastoma using high-density SNP-genotyping microarrays. ANR 2008.5.21-24 千葉
 10. Sano H, Shimada A, Hirato J, Kuroiwa M, Kikuchi A, Hanada R, Wakai K, Park MJ, Sotomatsu M, Hayashi Y : Expression of KIT and PDGFR is associated with a good clinical outcome in neuroblastoma. ANR 2008.5.21-24 千葉
 11. 田内久道、富澤大輔、江口真理子、石前峰齊、康勝好、平山雅浩、宮村能子、絹川直子、林泰秀、堀部敬三、石井榮一:11q23 転座以外の付加的染色体異常を認めた MLL 再構成乳児急性リンパ性白血病の臨床的特徴及び予後。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
 12. 小原明、真部淳、牧本敦、康勝好、小川千登世、磯山恵一、杉田憲一、杉田完爾、野口靖、太田節雄、前田美穂、矢部普正、金子隆、熊谷昌明、梶原道子、高橋浩之、菊地陽、嶋田博之、外松学、福島敬、齋藤正博、林泰秀、花田良二、土田昌宏:小児 ALL に対する化学療法早期の有効性と安全性の検討:TCCSG ALL L04-16 研究。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
 13. 佐野弘純、朴明子、山田佳之、外松学、田村一志、金澤崇、林泰秀:CD10 の発現と MLL 再構成が通常のパターンと異なった乳児急性リンパ性白血病の 2 症例。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
 14. 朴明子、佐野弘純、山田佳之、外松学、菊地陽、花田良二、林泰秀:小児 AML with multilineage dysplasia の 2 例。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
 15. 滝田順子、加藤元博、陳玉彦、大木健太郎、山本豪、真田昌、南谷泰仁、滝智彦、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司:超高密度 SNP アレイを用いた MLL 再構成陽性小児白血病における molecular allelo-karyotyping。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
 16. 大木健太郎、滝田順子、加藤元博、陳玉彦、山本豪、真田昌、南谷泰仁、菊地陽、林泰秀、五十嵐隆、小川誠司:小児急性骨髄球性白血病における Molecular allelo-karyotyping。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
 17. 清河信敬、加藤元博、藤本純一郎、宮川世志幸、恩田恵子、大喜多肇、齋藤正博、牧本敦、真部淳、康勝好、小原明、林泰秀、花田良二、土田昌宏、小川誠司:高密度 SNP マイクロアレイを用いた本邦の小児急性リンパ芽球性白血病の molecular karyotyping。第 70 回日本血液学会総会 2008.10.10-12 京都
 18. 大木健太郎、滝田順子、加藤元博、陳玉彦、真田昌、菊地陽、小川誠司、五十嵐隆、林

- 泰秀:小児急性骨髄性白血病における網羅的ゲノム解析。第 67 回日本癌学会 2008.10.28-30 名古屋
19. 陳玉彦、滝田順子、加藤元博、大平美紀、真田昌、菊地陽、五十嵐隆、中川原明、林泰秀、小川誠司:神経芽腫における網羅的ゲノム解析および標的遺伝子の同定。第 67 回日本癌学会 2008. 10.28-30 名古屋
 20. 滝田順子、加藤元博、陳玉彦、山本豪、真田昌、南谷泰仁、大木健太郎、菊地陽、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司:横紋筋肉腫における網羅的ゲノム解析。第 67 回日本癌学会 2008.10.28-30 名古屋
 21. 加藤元博、中崎久美、竹内健吾、真田昌、千葉滋、石川雄一、滝田順子、林泰秀、森茂郎、小林幸夫、黒川峰夫、小川誠司:悪性リンパ腫における網羅的ゲノム解析。第 67 回日本癌学会 2008. 10.28-30 名古屋
 22. 朴明子、滝智彦、堀部敬三、林泰秀:小児 T 細胞型急性リンパ性白血病における PTEN 遺伝子の解析。第 67 回日本癌学会 2008.10.28-30 名古屋
 23. 城青衣、高橋広夫、月本一郎、堀部敬三、多和昭雄、五十嵐隆、林泰秀、市川仁: DNA マイクロアレイによる小児急性骨髄性白血病の診断。第 67 回日本癌学会 2008.10.28-30 名古屋
 24. 滝田順子、加藤元博、陳玉彦、大平美紀、真田昌、菊地陽、本村あい、康勝好、井田孔明、五十嵐隆、中川原章、林泰秀、小川誠司:高密度 SNP アレイを用いた神経芽腫における網羅的ゲノム解析。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
 25. 林泰秀:小児 T細胞型急性リンパ性白血病の最新の仮題—分子病態を中心に—。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
 26. 城青衣、高橋広夫、嶋田明、月本一郎、堀部敬三、多和昭雄、石井榮一、五十嵐隆、林泰秀、市川仁:DNA マイクロアレイによる小児急性骨髄性白血病の診断。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
 27. 木下明俊、宮地勇人、滝智彦、高橋浩之、林泰秀、多和昭雄:JPLSG AML05 臨床試験における新 WHO 分類を用いた横断的中央診断。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
 28. 大木健太郎、滝田順子、加藤元博、陳玉彦、真部淳、菊地陽、五十嵐隆、小川誠司、林泰秀:超高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた小児急性骨髄性白血病における網羅的ゲノム解析。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
 29. 佐野弘純、久保田知里、朴明子、山田佳之、外松学、林泰秀:急性骨髄性白血病における WT1 遺伝子変異の解析。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
 30. 加藤元博、滝田順子、陳玉彦、真田昌、大木健太郎、本村あい、康勝好、井田孔明、菊地陽、五十嵐隆、林泰秀、小川誠司:高密度 SNP アレイを用いた横紋筋肉腫における Molecular allelo-karyotyping。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
 31. 加藤元博、滝田順子、陳玉彦、真田昌、康勝好、井田孔明、本村あい、菊地陽、滝智彦、五十嵐隆、小川誠司、林泰秀:MLL 遺伝子再構成陽性白血病における網羅的ゲノム解析。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
 32. 陳玉彦、滝田順子、崔永林、加藤元博、大平美紀、真田昌、菊地陽、五十嵐隆、中川原章、林泰秀、間野博行、小川誠司:ALK 遺伝子の活性型変異は神経芽腫の発症に関与する。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
 33. 朴明子、佐野弘純、山田佳之、外松学、林泰秀:小児 AML with multilineage dysplasia の女兒例。第 50 回日本小児血液

学会・第 24 回日本小児がん学会
2008.11.14-16 幕張

34. 佐野弘純、若井公子、朴明子、山田佳之、
外松学、林泰秀：神経芽腫における
receptor tyrosine kinase の発現、変異と臨床
像。第 50 回日本小児血液学会・第 24 回日
本小児がん学会 2008.11.14-16 幕張
35. 朴明子、滝智彦、佐野弘純、山田佳之、外
松学、林泰秀：小児 T 細胞型白血病におけ
る PTEN 遺伝子の解析。第 50 回日本小児
血液学会・第 24 回日本小児がん学会
2008.11.14-16 幕張

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

小児固形腫瘍の病理中央診断システムの確立と病理診断の標準化に関する研究

研究分担者 堀江 弘 千葉県こども病院検査部病理科 検査部長

研究要旨

本研究は希少腫瘍、あるいは臨床研究非登録例を含む全ての固形腫瘍を対象とした新しい中央病理診断システムを確立し、蓄積された症例は匿名化のうえデータベース化し、そのアウトカムあるいは生物学的特性の研究に資する基盤を構築し、併せてその診断精度の向上のため病理診断業務の標準化に向けた取り組みを行うことにより、小児固形腫瘍の治療成績の向上に寄与することである。本年度は中央病理診断システムの骨子を策定し、現在、各種の臨床研究グループにその趣旨を示しコンセンサスを得る段階にいたっている。病理診断の標準化に関しては、新システムに備えての診断手順の作成、診断担当医の追加などのインフラ整備を行った。なお、2008年度の各種小児固形腫瘍(横紋筋肉腫、Ewing 腫瘍、神経芽腫、腎腫瘍、肝腫瘍)の中央病理診断実施例は約 170 例であった。それぞれの研究目的が異なることから、診断症例あるいは診断内容の単純な比較はし得ないが、中央病理診断と施設診断との不一致例は横紋筋肉腫 7 例(19%)、JWITS 6 例(12.8%)、肝腫瘍 1 例(2.9%)であった。

研究協力者(小児腫瘍組織分類委員会委員)

石田 剛 国立国際医療センター国府台病院
小林庸次 大阪市立総合医療センター
田中祐吉 神奈川県立こども医療センター
恒吉正澄 九州大学
中川温子 国立成育医療センター病院
中山雅弘 大阪母子総合保健医療センター
秦 順一 前国立成育医療センター長
浜崎 豊 静岡県立こども病院
藤本純一郎 国立成育医療センター研究所
北條 洋 福島医科大学
宮内 潤 東京歯科大学市川病院
森川征彦 都立清瀬小児病院
横山繁昭 北海道子ども総合医療療育センター

A.研究目的

小児固形腫瘍の治療あるいは臨床研究において、病理診断は最も重要であり、精度の高い中央病理診断システムの確立が求められる。本邦においては臨床研究グループ毎に独自の

中央診断が実施されてきた。本研究においてはそれらの臨床研究からもれた症例、あるいは希少な小児固形腫瘍の治療成績の向上にも寄与しうる中央病理診断システムを確立することをめざしている。また、中央病理診断の対象となった症例のデータを蓄積し、それらの腫瘍のアウトカム研究や小児がんの特性研究などに資することを目指している。

さらに診断の精度の向上のため、日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会の先生方を研究協力者として、病理診断の標準化に取り組む。

B.研究方法

1. 国立成育センター内に小児腫瘍中央診断委員会事務局を設置し、病理診断は小児腫瘍組織分類委員会のメンバーが担当する。
2. 診断対象は各種の臨床研究グループ登録例のみでなく、非登録例あるいは希少腫瘍も含むものとする。
3. 集積された症例は匿名化処理の後、デー

データベース化し、アウトカム研究などに活用しうるような基盤を構築する。

4. 上記の基本方針に則り、新しい中央診断システムを構築する。

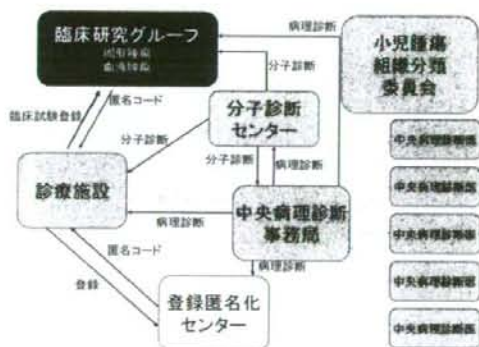
5. 診断精度の向上のため、コンセンサス診断の確立、診断の手引の作成（次年度）に取り組む。

C. 研究結果

初年度における病理中央診断システムの立ち上げに向けての決定事項ならびに中央病理診断の実績は以下のとおりである。

1. 新中央診断システムの診断対象、データ集積によるアウトカム研究を目指す等の基本方針は、小児腫瘍組織分類委員会において合意が得られ、試案が策定された（図1）。

（図1）



2. 国立成育センター内に小児腫瘍中央診断委員会事務局を設置した。

3. 診断体制の充実のため、新たな協力研究者となる新委員3名を選出した。

4. 2008年の当委員会が実施した小児固形腫瘍の中央診断症例総数は、一部が年度集計未了で正確な実数把握はできないが、約170例であった。その内訳は横紋筋肉腫37例、Ewing肉腫15例、神経芽腫35例（2007年度実績）、ウィルムス腫瘍47例、肝腫瘍34例であった。

施設診断と中央診断の不一致例は横紋筋肉腫7例（19.0%）、腎腫瘍6例（12.8%）、肝腫瘍1例（2.9%）であった。なお、Ewing肉腫と神経芽腫では従来の集積においても、標本の不良や亜分類の軽度の相違を除くと不一致例はほとんど認めていない。

5. 上記の小児固形腫瘍の病理中央診断の現状についての報告会を、平成21年2月13日に日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会（東京）に併せて実施した。

D. 考察

2008年の中央病理診断結果においても、中央診断と施設診断との不一致例が少なからずみられることから、中央病理診断の重要性が再確認された。また、一般に臨床研究グループに登録される症例は、研究の目的によって、症例あるいは施設が限定されることがあり、日本における小児がん治療の全体的な底上げを目指すという観点から、臨床研究の対象から除外される症例、あるいは希少な固形腫瘍も登録しうる体制を構築することが重要と考える。

新登録システムの基本的な骨組みが提案されたが、新システムのキーとなるデータベース構築のためには、各臨床研究の合意が不可欠である。この点に関しては現実的にはかなり難しい問題を含んでおり、過渡期的な方策を考えることが必要であると思われる。

日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会は、日本小児外科学会、日本小児科学会からの要請により設置され、1975年の小児腫瘍組織分類図譜第1篇小児肝癌、腎芽腫、神経芽腫群腫瘍の発刊を初めとして、小児がんに関する分類図譜を編集・発行し、わが国における小児がんに係る情報提供を通じて、疾患概念の認識と診断の標準化を目指すことを主たる業務としている。当委員会のメンバーの多くが小児がんの臨床研究グループの中央診断担当医として参画してきたが、小児腫瘍組織分類委員会としてのまとまった活動ではなく、個々の委員の個人的な活動であった。また、

一般に臨床研究グループに登録される症例は限られたものであるため、わが国の全体像を把握することはできないといった問題も明らかとなった。これらの問題の解決する目的もあり、本委員会が本研究に参画することとなった。

E. 結論

小児がん治療における病理診断の重要性は周知の事実である。現状の医療体制における小児がん治療の均てん化を図るためには、全ての癌種を対象とした中央診断を実施し、その精度の向上を図ることが肝要であり、早期の新中央診断システムの立ち上げが望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 藤本純一郎、堀江 弘：小児腫瘍のグループスタディと病理. 病理と臨床, 26:969-974, 2008
- 2) Honda S, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Ohira M, Matsunaga T, Yamaoka H, Horie H, Onuma N, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y: The methylation status of RASSF1A promoter predicts responsiveness to chemotherapy and eventual cure in hepatoblastoma patients. *Int J Cancer* 123: 1117-1125, 2008
- 3) Honda S, Arai Y, Haruta M, Sasaki F, Ohira M, Yamaoka H, Horie H, Nakagawara A, Hiyama E, Todo S, Kaneko Y: Loss of imprinting of IGF2 correlates with hypermethylation of the H19 differentially methylated region in hepatoblastoma. *Br J Cancer* 99: 1891-1899, 2008
- 4) 永井雄一郎、堀江 弘：二相性を有する軟部肉腫の1例 —滑膜肉腫の典型例—, 小児がん

45: 186, 2008

2. 学会発表

- 1) 小児がんに対する標準治療・診断確立のための研究 —小児腫瘍組織分類委員会の取り組み—, 堀江 弘
堀部班会議 名古屋 2008.6.14
- 2) 小児がん中央診断システムの確立について
堀江 弘
日本小児病理研究会 松本 2008.9.6
- 3) JPLT中央病理診断,
堀江 弘、田中祐吉
JPLT第三回施設代表者会議 千葉
2008.11.13
- 4) JPLT病理部門よりの報告,
堀江 弘、田中祐吉
日本小児肝癌スタディグループ(JPLT)研究会
2009 東京 2009.1.31
- 5) JWITS中央病理診断報告,
堀江 弘 田中祐吉、大喜多肇
平成20年度日本ウィルムス腫瘍スタディ(JWITS)研究会 東京 2009.1.31
- 6) JWITS病理登録の現状
堀江 弘、田中祐吉、大喜多 肇
日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会
東京 2009.2.13
- 7) JPLT病理登録の現状
堀江 弘、田中祐吉
日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会
東京 2009.2.13
- 8) 小児固形腫瘍の生物学的特異性の解明と新たな病理組織分類アトラスの作成
秦 順一、堀江 弘、浜崎 豊、小林庸次、田中祐吉、横山繁昭、北條 洋、森川征彦、中山雅弘、宮内 潤、恒吉正澄、藤本純一郎、石田 剛、中川温子
第24回日本小児がん学会、千葉 2008.11.15
- 9) 日本ウィルムス腫瘍スタディグループ(JWITS)登録症例の追跡調査報告。

大植孝治、福澤正洋、越永従道、樋之津史郎、
秦 順一、堀江 弘、田中祐吉、大喜多 肇、
金子安比古、陳 基明、中館尚也、麦島秀
雄、斎藤正博、北野良博、野崎美和子
第24回日本小児がん学会、千葉 2008.11.15

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

小児固形腫瘍の中央診断システムに基づく分子遺伝学的予後因子の
探索と生物学的リスク分類に関する研究

研究分担者 中川原 章 千葉県がんセンター研究局・局長

研究要旨

わが国における小児固形腫瘍の中央組織保存および標準化された遺伝子診断のあり方とその基盤整備について、とくに神経芽腫および肝芽腫の面から検討し、具体的な作業を行った。神経芽腫に関しては、平成7年に当研究所において腫瘍バンクと遺伝子診断を開始して以来その数は2700に達した。これまでに、DNA ploidy (FACScan)とMYCN増幅をFISH法と定量的PCR法によって測定し、on-line systemでその結果を主治医に返送する体制を確立した。しかし、問題のひとつは、検体が日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)施設からのものと非JNBSG施設からのものとあり、さらに、前者に関しては、JNBSG登録検体と非登録検体が存在することである。これは、JNBSGそのものの整備が遅れていることに大きく起因しており、その整備・確立を急ぐ必要がある。また、新しい診断・検査項目として、アレイCGH法、発現ミニチップ検査、Alk等遺伝子変異解析をどのように組み込むか、早急な検討が必要である。なお、肝芽腫に関しては、JPLT-IIまでの検体220個を凍結保存しているが、第2検体センターとしての位置付けが必要と思われる。

A. 研究目的

小児固形腫瘍のリスク分類および治療の標準化が国際的に進められているが、わが国におけるそれらの取り組みは必ずしも確立されていない。また、一方において、診断およびリスク分類は新しい分子遺伝学的方法が日々進歩し、それらを取り入れた新しい診断システムの確立とそれに基づく臨床試験の遂行が求められている。そこで、我々は、本班研究において、わが国に相応しい中央病理診断と中央分子遺伝学診断のあり方と残存検体の保存法について検討し、その体制確立をとおして、さらに新しいリスク分類の確立を図る。

B. 研究方法

全国の日本神経芽腫スタディグループ(JNBSG)登録施設および非登録施設から送られてくる神経芽腫サンプル(凍結組織、新鮮生組織、末梢血)と匿名化された必要最小限の臨床情報を収集した。DNA ploidy

(FACScan)とMYCN増幅をFISH法と定量的PCR法によって測定し、7-10日以内にon-line systemでその結果を主治医に返した。肝芽腫については、200例分の凍結組織を保存した。

C. 研究結果

1. 神経芽腫検体の収集・保管体制

神経芽腫に関しては、平成7年に当研究所において腫瘍バンクと遺伝子診断を開始して依頼、埼玉県立がんセンター(金子安比古先生)より保存を依頼された検体まで含めて、その数は2700に達した。肝芽腫はJPLT2までの200検体が凍結保存されている。各施設で匿名化され、残存資料は血漿、DNA、RNA、凍結組織として-80℃に保存した。

2. JNBSGデータセンターとの連携体制の確立

JNBSG臨床プロトコールに登録された症例の検体については、千葉県がんセンター(第1検体センター)での中央遺伝子診断と、

国立生育医療センター（第2検体センター）の中央病理診断をすべて受け、理想的な形で系統的な中央診断するシステムが確立した。平成18年からこれまでに登録された症例数は87例にのぼった。

3. JNBSG登録施設からのJNBSG非登録検体の取り扱いについて

まだJNBSGでプロトコールが立ち上げられていないリスク症例については、データセンターを介さない形で検体が送られて来ているため、中央遺伝子診断は同じように行っているものの、倫理的問題に関しては、各施設および第1検体センター施設の倫理委員会の承認のもとで行った。

4. JNBSG非登録施設からの検体

JNBSG非登録施設から送られて来た検体についても、各施設でのI.C.取得と匿名化を条件に受け入れ、DNA ploidy (FACScan)とMYCN増幅をFISH法と定量的PCR法によって測定した。

5. 検査依頼に基づく新規遺伝子検査の実施

各施設からの個々の症例に関する相談を受け、必要に応じて、ALK遺伝子変異の検索、アレイCGH検査、神経芽腫ミニチップ検査等を無料で行った。

6. ゲノム情報を導入した新規リスク分類の作成

我々が開発したアレイCGH法に基づく網羅的ゲノム異常パターンによるリスク分類に症例を追加し、300例以上の散発性神経芽腫によるわが国独自のリスク分類を作成した。これに、ALK遺伝子異常を加えた新しいリスク分類を作成中である。

7. 肝芽腫組織バンクの課題

JPLT3の事務局が広島大学に移ったため、JPLT2までの肝芽腫凍結検体200例分の保存を行っている。

D. 考察

小児がんを含め、多くのがんにおいては、時代に合った新しいリスク分類の確立が求められる。小児悪性固形腫瘍の中でも、神経芽腫の子後は極めて悪く、現在治療抵抗性のものである。新しいリスク分類に基づく新しい治療法の選択が必要である。しかしなが

ら、これらを遂行するためには、系統的な中央診断体制の確立と標準化された診断法、さらには、新規診断法の開発がもたらされ、それを行うための検体保存体制が完成されなければならない。我々は13年前より独自の神経芽腫検体センターを立ち上げ、これまでに約2700検体の保存を行った。これは、世界的にも有数のものであり、精度の高さを考えると世界で最もクオリティの高い保存検体と言える。しかしながら、JNBSGで統一された検体保存の体制になるには未だほど遠く、グループスタディの一日も早い確立と臨床試験の整備を願うものである。いずれにしても、個々の問題ある症例の追加検査体制も迅速にできる、きめ細かな中央遺伝子診断体制と、中央病理診断とも密に連携したわが国の体制が確立した。

E. 結論

わが国における神経芽腫の、中央病理診断と密に連携した中央遺伝子診断体制がほぼ確立した。今後は、JNBSGによるグループスタディの体制確立と臨床プロトコールの作成が早急に行われ、一刻も早い新しいリスク分類の開発研究に繋がるよう努力する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Ichikawa T, Suenaga Y, Koda T, Ozaki T, Nakagawara A. TAp63-dependent induction of growth differentiation factor 15 (GDF15) plays a critical role in the regulation of keratinocyte differentiation. *Oncogene* 27:409-420, 2008
2. Tomioka N, Oba S, Ohira M, Misra A, Fridlyand J, Ishii S, Nakamura Y, Isogai E, Hirata T, Yoshida Y, Todo S, Kaneko Y, Albertson DG, Pinkel D, Feuerstein BG, Nakagawara A. Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene* 27:441-449, 2008
3. Yoshida K, Ozaki T, Furuya K, Nakanishi M, Kikuchi H, Yamamoto H, Ono S, Koda T, Omura K, Nakagawara A. ATM-dependent nuclear accumulation of IKK- α plays an