

お子さんの 10 日間の睡眠リズムをお伺いいたします。

この質問紙を返送（または持参）するまでの1か月の間で、任意の連続した10日間についてお子さんが眠っている時間をぬりつぶしてください。

（※記載する期間は自由にお決めください。ただし、必ず連続する 10 日間をご記入ください。）

日付	時刻																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
記入例3/24	■										■						■							■			
/																											
/																											
/																											
/																											
/																											
/																											
/																											
/																											
/																											

厚生労働省科学研究費補助金
(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業) H22-次世代一般-008
分担研究報告書

神経芽腫スクリーニングの成果からみた本症の病態解明に関する研究

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

研究要旨 6ヶ月児を対象とした神経芽腫検査事業が、平成15年に休止されたが、この休止の条件として①本症の罹患と死亡の正確な把握、②マス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本症による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立、の三点について速やかに対応することが検討会から課せられた。その後の検査事業を施行していた時期の本腫瘍の動向を調査した結果の解析から罹患率が約2.8倍に上昇した一方で、6才までに罹患した本腫瘍による死亡率は半数に減少していた。そのことを受け、本分担研究では、母子コホート研究として、本症の発症形態を明らかにするとともに、死亡率に結びつく予後不良な神経芽腫の新たな早期発見法について検討した。

神経芽腫検査事業の休止後のコホート解析から、現時点では正確に累積罹患率や死亡率の算出は未だ不可能な時期であるが、検査事業休止後1才未満症例の発症率は速やかに減少したのに対し2才以降の症例が有意に増加していた。国際神経芽腫リスク分類委員会(INRG)のデータとの比較からは、検査事業を施行したコホートでは2才以上のMYCN増幅した予後不良例の有意な低下が示された。

18ヶ月でのスクリーニング検査を施行している大阪、京都、札幌でのデータを集計すると、18カ月受診124,102人中20例発見:6,205人に1例の発見率で、明らかな過剰診断症例がなく、全例生存であった。

血清の予後不良例に特異的ペプチドMHを見出し、これについて保存血清で検討した結果、予後不良例の感度96%、特異度は100%であった。さらに、尿中マーカーについても候補分子を絞り、その解析を継続している。

A. 研究目的

わが国で1984年頃から全国的に展開された尿中VMA, HVAをマーカーとする生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業(以下、神経芽マス)は過剰診療が指摘され平成15年度から休止したが、その後の後

向き研究の結果(Lancet, 2008)から死亡率の低下が明らかになった。そこで、本分担研究では神経芽腫の発生动向を検査事業休止後の母子コホートの動向と国際比較から検証し、さらに、予後不良な神経芽腫を早期発見するために有効かつ特異性の高い

検査法の確立を目的として以下の方法で検討した。

B. 研究方法

1. 生後6ヶ月児神経芽マスの再評価：

1) 休止後のコホート解析：(休止後の2006-2009年出生 (n = 334万) の解析) 比較対象のコホートは1971年から日本小児外科学会および日本小児がん学会に登録されてきた症例約5,000例(マス発見2,500例)とした。このデータは、病理所見や腫瘍特性を再評価され、治療法と予後の推移について検討され、乳児神経芽腫研究グループの症例とも照合されて、重複症例をチェック後に、人口動態調査死亡票から得られる神経芽細胞腫による死亡確認を出生日と地域コードから照合して予後等が確認訂正されている。これらのちに個人情報が消去されているデータベースのうち、1981年から2000年までの発症例4,049例(マス発見例2,288例)を、まず対象とした。このデータベースの補足率を推定するために、死亡個表での神経芽腫の死亡数との比較と、厚生労働科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「小児慢性特定疾患治療研究事業の登録・管理・評価・情報提供に関する研究」(主任研究者：加藤忠明)から提供された平成10年から12年までの小児慢性特定疾患のコードC74.9の新規症例を診断年齢別に症例数との比較から67.5%であることが明らかになっている。

休止後のデータは主に日本小児外科学会の神経芽腫群腫瘍のデータを使用した。

2) コホートの国際比較解析：国際神経芽腫リスクグループ(INRG)データ(約11,000例)と比較検討。

1)で対象とした神経芽細胞腫検査事業が行われていた時期及びその後の時期と同時期の欧米の神経芽腫の動向とその治療成績との比較検討を行うべく、INRG(国際神経芽腫リスクグループ)から、欧米での神経芽腫のデータベースを用いた。このデータベースは1990年以降に治療された北米(Children's Oncology Group)と欧州及び日本の神経芽腫を登録し、リスク分類を行うために作成されたもので、これらのうち、スクリーニングを行っていない北米と、1才でスクリーニングを行っていたドイツの症例を中心に比較検討した。

2. 生後18か月マススクリーニングの成績の検討動向

札幌、京都、大阪で行われてきた生後1才半での尿中VMA,HVAによる神経芽腫スクリーニングの動向を調査し、その成果と有用性について検討した。

3. 新規血中、尿中マーカーの検討：神経芽腫の特異的マーカーのLC-MS探索

1) 血清遊離DNAを用いたMYCN遺伝子増幅判定法の開発

神経芽腫の治療前の保存血清87例の血清遊離DNAを抽出。血清遊離DNA中のMYCN(2p24.1)および対照遺伝子NAGK(N-acetylglucosamine kinase, 2p12)をTaqMan法によるReal-time PCR法で各々定量した。

2) 患者および健常児の血中・尿中マーカー探索

患者および健常児の血中のNM23HIタンパク質の濃度の検討を行った。さらに、血中・尿中のカテコラミン類のプロテオーム解析法を用いて、悪性度の高い腫瘍の特異的マーカー探

索を目的とし、尿中 VMA・HVA に替わる有効な腫瘍マーカーの検出をめざした。そこで、まず、血中の小分子とくにアルブミンなどに結合したカテコラミン類の一斉分析法を開発し、これらを分子量と電荷にて分離するマスマッピングを行い、特徴的な蛋白やペプチドの LC/MS/MS で検討を行った。LC/MS/MS は Micro21 Series と QSTAR[®] XL, ESI-QqTOF/MS (Applied Biosystems) のセット及び Prominence Series

(SHIMADZU) と API3200, ESI or APCI-QqQ/MS (Applied Biosystems) を使い、データ処理は同社の AnalystQS により行った。また Mariner への導入はスプリッターティーにより流量を 1/40 になるよう調整し測定を行った。

特徴的なペプチドである MH ペプチドに対して、予後良好であった症例 (n=42) と、予後不良であった症例 (n=15) の保存血清を用いて検証した。対照は、ほぼ健常と考えられる

単径ヘルニアの小児例で同意を得て保存した血清 (n = 18) を用いた。

C. 研究結果

1. 生後 6 ヶ月児神経芽マスの再評価：
 1) 休止後の後向きコホート解析： 6 ヶ月神経芽腫検査事業によって予後良好な腫瘍が増加し、その中に過剰診断例が含まれていたことは明らかであったが、実際に年長児に発生する予後不良腫瘍をどの程度見いだせていたかを検討する目的で、年代をおって診断時年齢別の症例数を検討した(図1)。1才未満の乳児は、スポット法による定性法が始まった 1980年頃から漸増し、全国的に実施された 1985年頃から明らかに増加していた。1990年ころに定量法である HPLC 法が全国的に導入され、その頃から、乳児例は年間150例前後と一定化した。その1-2年後の1992年ころから2歳以上の診断症例が半減し2004年まで継続していた。出生数の減少をかんがみてもその減

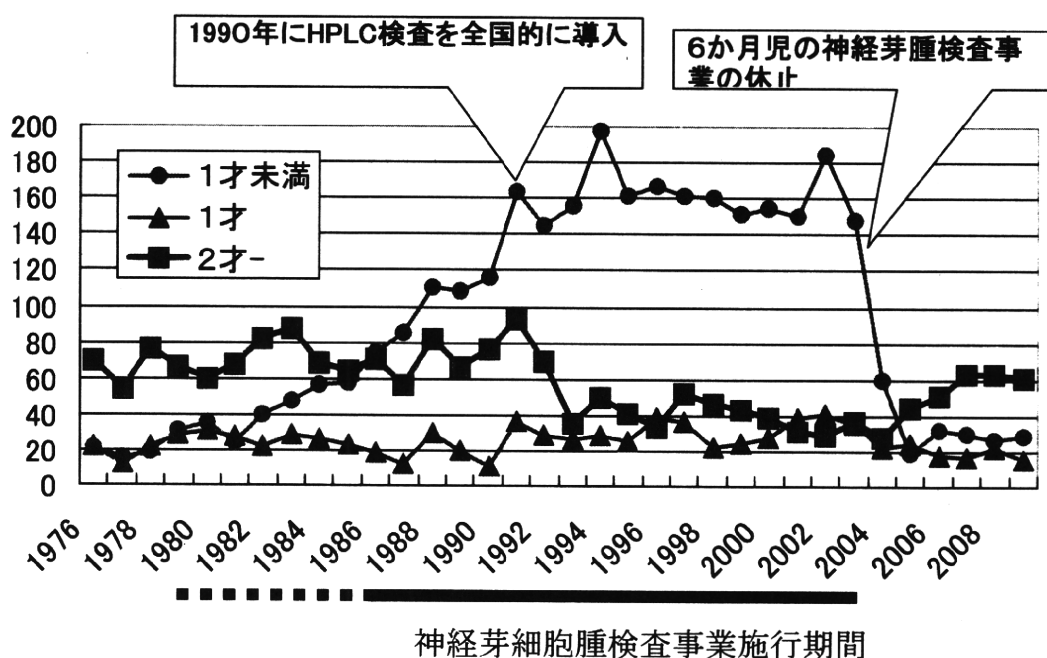


図 1：診断時年齢毎の神経芽腫登録数の年次別変化

少率は有意でであった。この事業が休止された以降は、2005年から明らかに1才未満の症例は減少し、検査事業を開始前の値に近い数になったが、2006年以降2歳以上の年長児に発生する神経芽腫症例が増加し、年間60例程度になり、特に進行例が増加し、この増加分が検査事業にて早期発見していた症例と考えられた。

2) コホートの国際比較解析：

次に、検査事業の施行時期の本邦の症例数の割合を、1980年以前の症例および休止後2年に以上経過した2007年以降の症例とともに、ドイツ、北米(COG)のほぼ同時期のコホートとで比較検討を行なった(表2)。ドイツを除い

て6ヶ月までの臨床発見例には、スクリーニングによる介入がないことから6ヶ月以前の症例を対象としてその比較を行なった(図1)。その結果、検査事業が全国の実施される以前の本邦の神経芽腫症例の年齢別分布は、ドイツ、北米と有意な差はなく、ほぼ同様の年齢分布であった。そこで、生後6ヶ月までの診断例を基準に他の年齢の分布を検討した。その結果、生後6-11ヶ月診断例は、本邦で神経芽細胞腫検査事業を施行されていた時期には約5-6倍に増加していたが、一方で2歳以上の症例は有意に減少し、ほぼ1/2になっていた。このことから、6ヶ月検査事業では、予後良好な神経芽腫を約5-6倍の頻度で過剰診断していたが、一方で年長児の神経芽腫が減少する

表1:本邦およびドイツ、北米での年齢別診断数

	日本 (1990-94)	日本 (1970-84)	日本 (2006-2009)	ドイツ (1990-1994)	COG (1990-1994)
<6	132	271	76	160	245
6 ≤ <12	791** (6.0)	199 (0.734)	50 (0.658)	104 (0.65)	170 (0.694)
12 ≤ <24	106 (0.803)	326 (1.203)	72 (0.947)	111 (0.694)	245 (1.0)
24 ≤ <60	130 (0.984)	478** (1.764)	163 (2.144)	224 (1.40)	406 (1.657)

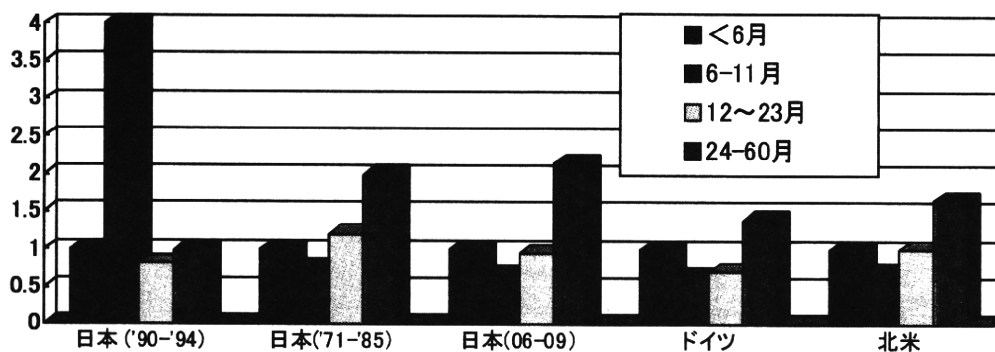


図2：生後6ヶ月未満症例を1とした時の各年代別発症比率

結果となり、これらが、以前の前向きコホート研究で報告された死亡率の低下のデータを一致する結果となっていた(平成15年度、厚生労働科学研究(難知性疾患克服研究事業)マスキューニングの効果的実施及び開発に関する研究(主任研究者:黒田泰弘)、分担研究:神経芽腫マスキューニング・プログラムの疫学評価(分担研究者:林邦彦))。さらに、予後不良腫瘍の典型例である MYCN 遺伝子増幅症例の診断時年齢別の分布を 1990-2003 年

高値、MYCN 増幅を有する aggressive な症例であった。ドイツや北米(COG)との比較検討では、MYCN 増幅例、stage 4 症例が本邦において有意に高頻度であった。この傾向は 18 カ月未満症例で顕著で、この年代の治療成績も不良であった。集計された症例について、33 項目について予後への寄与度を検討した。ダンベル型以外の因子は、単因子解析で全て有意差を認めた。

多因子解析では、病期、MYCN 増幅、に加

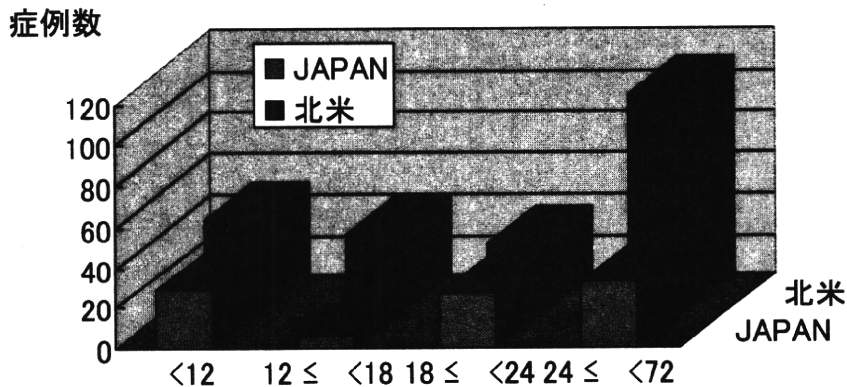


図4：日本と北米の MYCN 増幅症例の分布

の北米症例と比較した。MYCN 増幅症例には過剰診断例はないとすると、ほぼ同様の分布をするはずであるが、明らかに本邦の 2 歳以降の MYCN 増幅例の絶対数が少ないことが明らかとなった(図3)。これは MYCN 増幅例が 6 ヶ月マスで早期に発見されたことが一因と考えることも可能で、実際 12-17 ヶ月の MYCN 増幅例が本邦で北米に比べ少ないことはこれで説明可能である。しかし、2 歳以降の症例の減少は早期発見効果だけでは説明困難であった。一方、1 歳代に臨床発見された神経芽腫症例 104 例についての検討では、欧米のデータと比較すると、本邦における 1 歳代神経芽腫症例のほぼ半数以上が stage 4、NSE、LDH 著明

えて、骨髄転移が有意な因子として認められ、本邦特有の病期分類である IVB 期が有意な予後因子となる可能性も考えられた。

2. 18 ヶ月の神経芽腫検査について

1) 後向き研究

過去の 1990-2000 年に施行された京都府の 18 ヶ月二次マスキューニング(以下マス)、と 1992-2002 年に施行された宮城県の 18 ヶ月二次マス発見例については、6 ヶ月で一度施行し、さらに二次マスとして 18 ヶ月マスを施行された対象は 217,795 人のコホートの解析をおこなった。結果的に 163,704 人が 6 ヶ月マスを受診し 34 例が発見され、

さらに18ヶ月マスを133,393人が受診し12例が発見されていた。臨床発見例は、19例で、6ヶ月前に1例、6-18ヶ月の間に7例発見され、このうち4例が6ヶ月マス非受診で2例が死亡していた。18-47ヶ月例は7例で、全て18ヶ月非受診例でこのうち6例が腫瘍死していた。残りの4例は、48ヶ月以上の症例で、いずれも18ヶ月マス陰性であった。一次マス、二次マス発見例ともに死亡例はなく、あわせて、65例が診断、治療され、3,350人に1例の割合で発見されていた。罹患率から、6ヶ月でかなりの過剰診断例が存在することは、従来の報告と一致する結果であったが、特記すべきは、18ヶ月マス受診例に4才までの発症例がなく、かつ受診例では死亡例がなかったことであった。集計結果では、18ヶ月以降の神経芽腫の死亡率は、10万出生対18ヶ月受診群が2.25人、非受診群は7.10人となり、マス受診群の死亡率が低いことが明かになった。

2) 前向き研究

平成15年以降、施行時期(生後18ヶ月)を変えて神経芽腫検査事業を継続してきた札幌、京都、大阪の自治体関係者等を交えて、その成果等について論議した。生後18ヶ月神経芽腫検査事業では、6ヶ月時の検査事業で明らかに予後良好な腫瘍が発見されていること、自然退縮例のほとんどの尿中カテコラミン濃度が生後18ヶ月までに正常化することなどや、過去の宮城や京都の二次神経芽腫スクリーニングの結果も踏まえて、生後18ヶ月で施行することの根拠とした。更に、インフォームドコンセントについては、大阪、京都、札幌で実際に運用されている。

また、6ヶ月マスが休止となった以降に、大阪(2004.5~2008.12)、京都(2004.12~2008.12)、札幌(2006.4~2008.12)の18ヶ月マスの状況についてまとめてみると、合計124,102人受診し、20名の神経芽腫が見出されている。これらは、全例現時点では生存中であり、早期発見として18ヶ月が明らかに遅いことを示唆した症例や過剰診断例はなかった。発症率は6,205人に対して1(対10万出生あたり1.56)であった。先の二次マスのデータが、11116出生に1(対10万出生あたり0.89)であったことから、発見率は二次マスよりも高く、自然発生が7,000人に1人ということから、やや高値であるが妥当な値であると考えられた。さらにこれらの症例のうち、現在2年経過し、陰性例に発症例は確認されていない。これらの長期予後とともに、臨床発生例の分布、さらにそれらの悪性度解析が必要と考えられた。これらのエビデンスから、18ヶ月マスの有効性を検証する大規模な前向き研究が是非とも必要であることが強く示唆される結果であった。

3. 新規マーカー探索

1) 血清遊離DNAを用いたMYCN遺伝子増幅判定法

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

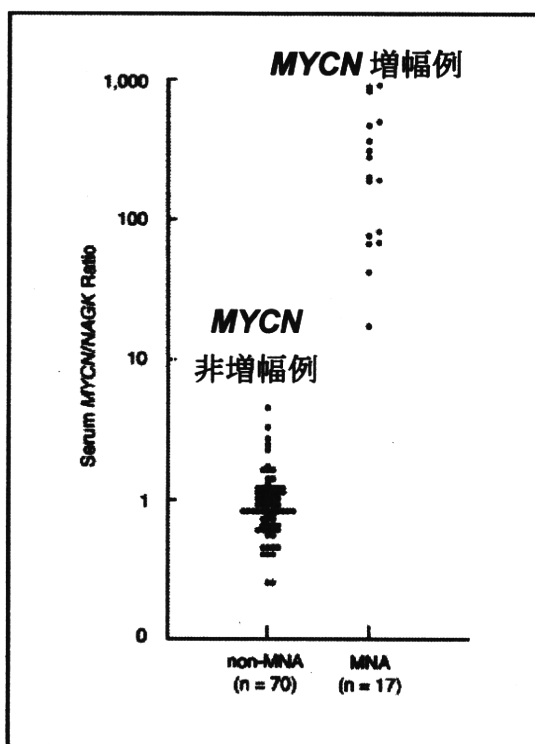


図5：血清中 MYCN 遺伝子定量

血清 NM23H1 蛋白質について、神経芽腫患者 217 例（6ヶ月マシ発見例 131 例、臨床的発見例 86 例）にて、ELISA 法で測定し、神経芽腫患者で高く、(P<0.0001)、MYCN 増幅患者は MYCN シングルコピー患者に比較して高かった (P=0.0006)。臨床的発見例 86 例で予後との相関を認めた (P=0.034)。血清 NM23H1 蛋白質濃度の測定は容易で、神経芽腫患者の予後予測として、臨床応用が期待された。

2) 血清新規マーカー探索

悪性度の高い腫瘍に特異的な新規マーカー探索、特に血中のカテコラミン代謝系を中心とした蛋白解析法として、カテコラミンの中間代謝物も対象とし、タンデム MS を

用いた尿中・血中カテコラミン代謝物の一斉分析法の確立により、9 種のカテコラミンの一斉定量法を確立した。また LC/MS/MS による網羅的分子追跡法マスマッピングにより、低分子を標的とした新しいマーカーの検索も行ったところ、候補物質を発見した。この候補物質は、予後不良な神経芽腫特異的なマーカーになる可能性が高く、これらの検討を行っている。

3) LC/MS/MS による神経芽腫患者血清中低分子の解析

すでに確立した血清中低分子の一斉分析法を用い、患者血清の分析及びその解析を行った。今回用いた検体は全部で 28 検体、広島及び京都で保存されていた血清検体であり病期および予後等の情報のついたものである。またコントロール試料としては、健常小児および単径ヘルニアの同年代患者の血清を用いた。患者血清の分析により得られた LC クロマトグラム及び MS クロマトグラムを図 5 に示す。LC においては比較的早い時間（極性の高い物質が溶出する領域）に大きなピークが 2 つ、遅い時間（極性の低い物質が溶出する領域）に小さなピークが数多く検出されているのがわかる。ほとんどのピークにおいてピークの幅が比較的広いことから 1 つのピークの中にいくつかの物質が含まれていると考えられる。MS 分析結果よりどのような物質が検出されているか抽出してみたところ、約 250 種の物質を抽出された。

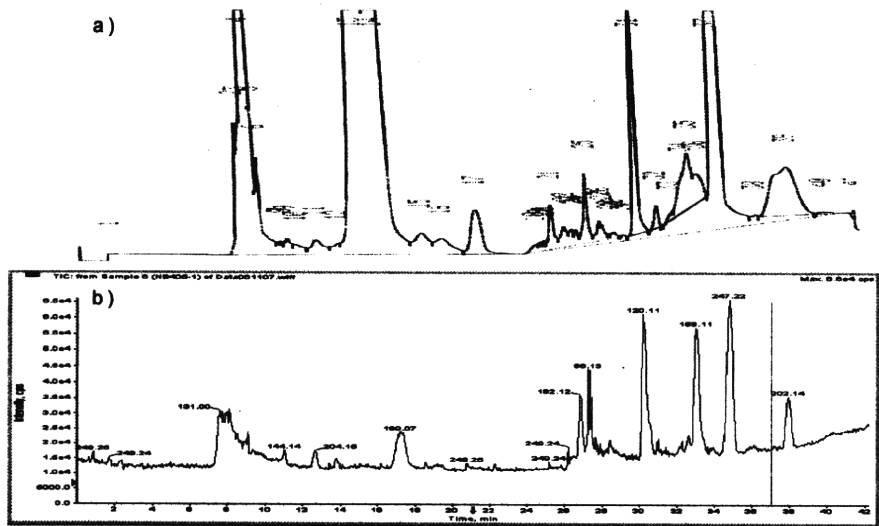


図5 患者血清分析の結果 a) LC クロマトグラム、b) MS クロマトグラム

これらの物質の変化・物質のパターンにより、予後や悪性度分類ができないかと考え、3次元のグラフ化を行った。結果が図.6, 7である。コントロール血清(図6-a)と本邦分類I期(図6-b)の結果を比較すると、ほぼ似た形状をしている。しかしINSS I期ではグラフの左側(m/zが小さく、溶出が早い物質)及びグラフの右側(m/zが大きく、溶出が遅い物質)の群が検出されていないなどの相違点も見られた。更にINSS III期(図.6-c)の結果に関しては、コントロール血清とINSS I期では似たパターンであったが、グラフの奥側(m/zが小さく、溶出が遅い物質)に関しては大きく異なっていた。しかしながらINSS IV期(図.7-a,b)を比較してみると、溶出が遅い物質)に関しても、大きくパターンが異なっていた。図.7-bに関してはコントロールと似たパターンとなっており、3次元の解析のみで病期やタイプの判別は困難である症例もあつ

た。グラフの左側(m/zが小さく、溶出が早い物質)及びグラフの右側(m/zが大きく、溶出が遅い物質)の群が検出されていないなどの相違点も見られた。更にINSS III期(図.6-c)の結果に関しては、コントロール血清と本邦分類I期では似たパターンであったが、グラフの奥側(m/zが小さく、溶出が遅い物質)に関しては大きく異なっていた。しかしながらINSS IV期(図.7-a,b)を比較してみると、溶出が遅い物質)に関しても、大きくパターンが異なっていた。しかしながらINSS IV期(図.7-a,b)を比較してみると、溶出が遅い物質)に関しても、大きくパターンが異なっていた。図.7-bに関してはコントロールと似たパターンとなっており、3次元の解析のみで病期やタイプの判別は困難である症例もあつ

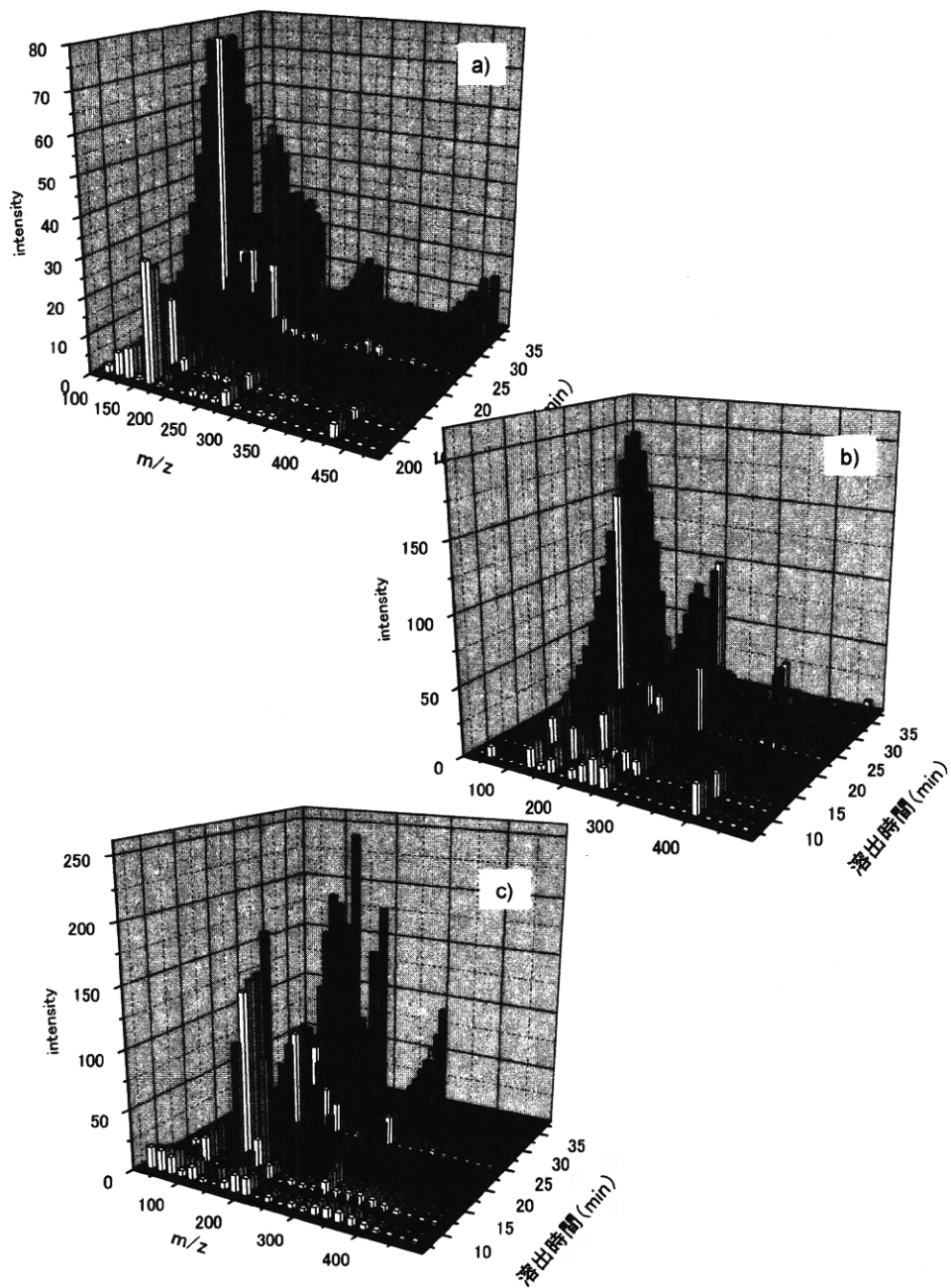


Fig.6 患者血清分析の3次元解析 a) コントロール血清、b) 本邦分類Ⅰの患者血清、c) 本邦分類Ⅲの患者血清

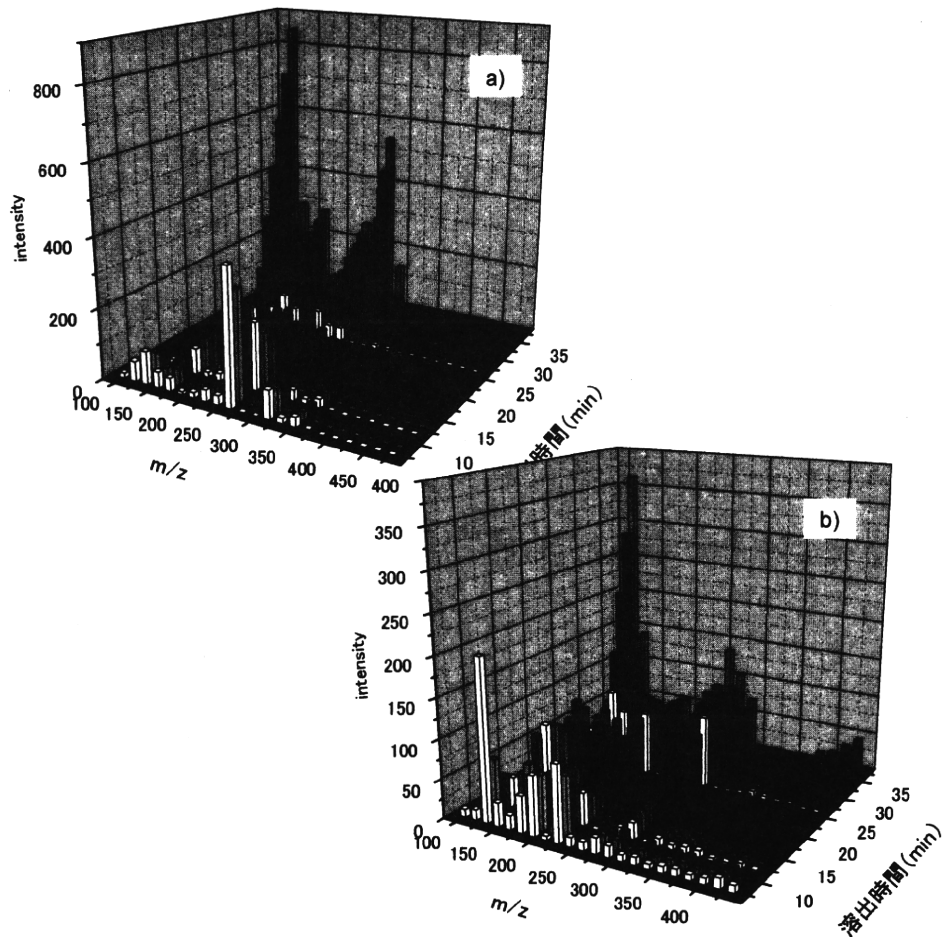


図7. 患者血清分析の3次元解析 a) 本邦分類IVAの患者血清、b) 本邦分類IVAの患者血清

そこで **MakerView** という MS 専用の統計解析ソフトを用いて解析を行った。このソフトは MS 分析の結果から検出されたピークを自動的に抽出し、グループ間で t 検定を行うことにより有意差のある物質を検索するソフトである。本邦分類 I 期とコントロール血清間で t 検定を行った結果をいくつかの神経芽腫の検体において検出されていないもののコントロールでは全く検出されておらず、これらの物質が神経芽腫のマーカーになりうると思われた。また、

INSS 4 期と 1 期の t 検定の結果においては 15 の物質において有意な差が見られた。しかし INSS1 期では全く検出されず、INSS4 期でカウントが高い物質など、どちらかの病期に特異的な物質がほとんどなく、病期分類が可能なマーカーの候補を発見することは困難であった。さらに INSS4 期とコントロールについてピークの中で、12.0 分の $m/z204.2$ のピーク、10.8 分の $m/z243.0$ のピーク、7.2 分の $m/z333.2$ のピークに関して図 8 から 10 に示す。

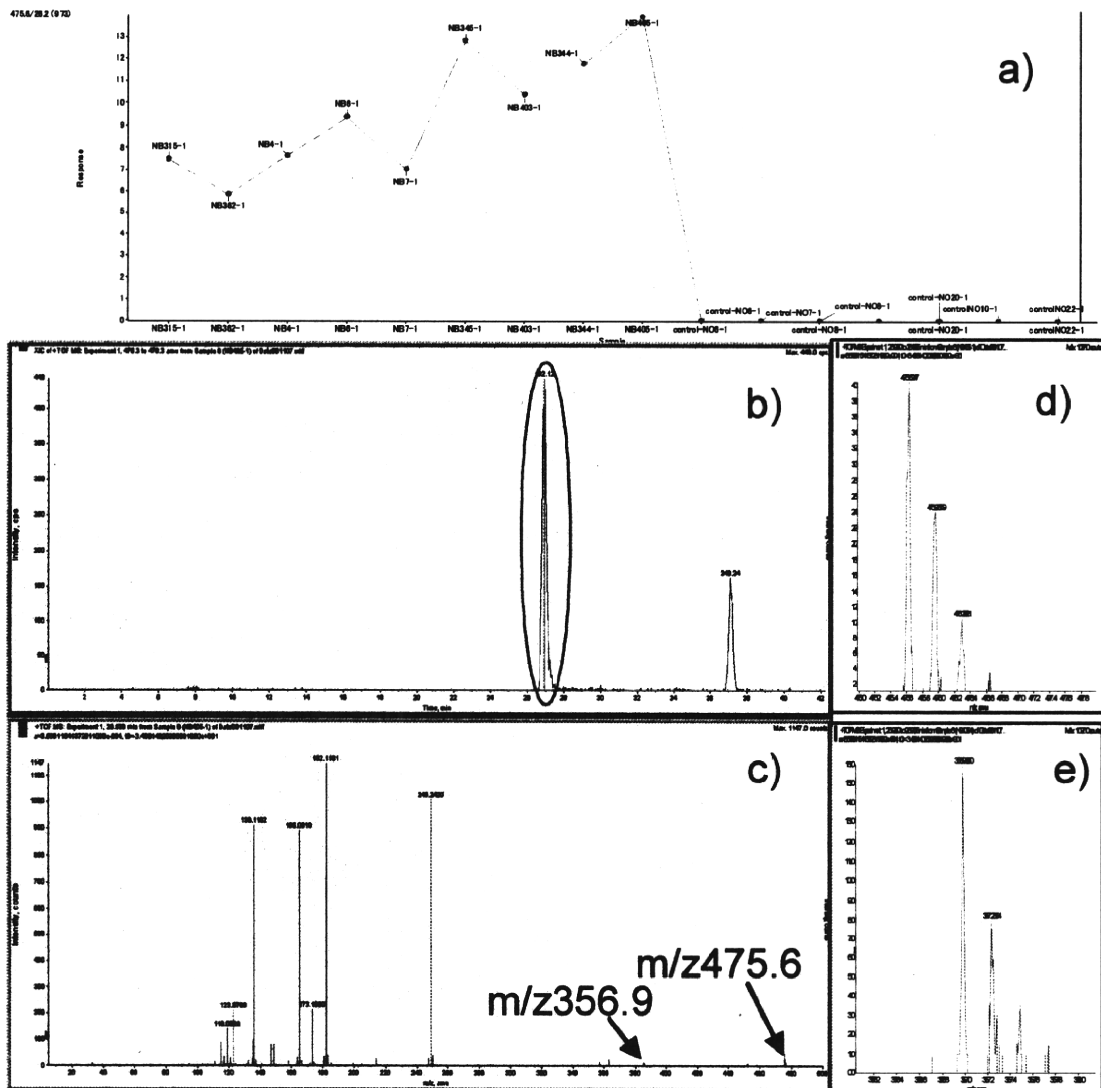


図8 患者血清分析のMakerView解析 IVA期患者血清(赤)とコントロール血清(青)間で有意な差が見られた物質(26.2分の $m/z475.6$ のピーク)

a) t検定の結果、b) $m/z475.6$ のMSクロマトグラム、c) MSスペクトル、d) $m/z475.6$ のMSスペクトル(3価)、e) $m/z356.9$ のMSスペクトル(4価)

I期でt検定を行った結果及びINSS I期とコントロールでt検定を行った結果からこれらのt値をまとめたものを表10に示す。INSS I期の検体の中には、これらの物質が検出されない検体もあったものの、本邦分類I期とコントロールにおいてもt値が90以上となり、これらが神経芽腫特異的な物

質であることが考えられる。しかしながらINSS4期とINSS1期でt検定を行った結果では、有意な差が見られなかったため予後に関わる物質ではないと判断した。しかしながら各病期の検体が7例程度とまだ例数が少なく、患者間のばらつきが大きく出ており、微量の変化が見えていない可能性が

考えられた。現在、この解析で発見したマーカー候補 6.2 分の m/z 475.6 のピーク、12.0 分の m/z 204.2 のピーク、10.8 分の

m/z 243.0 のピーク、7.2 分の m/z 333.2 のピークに関して構造解析を進めるとともに、例数を増やし解析を行っていく予定である。

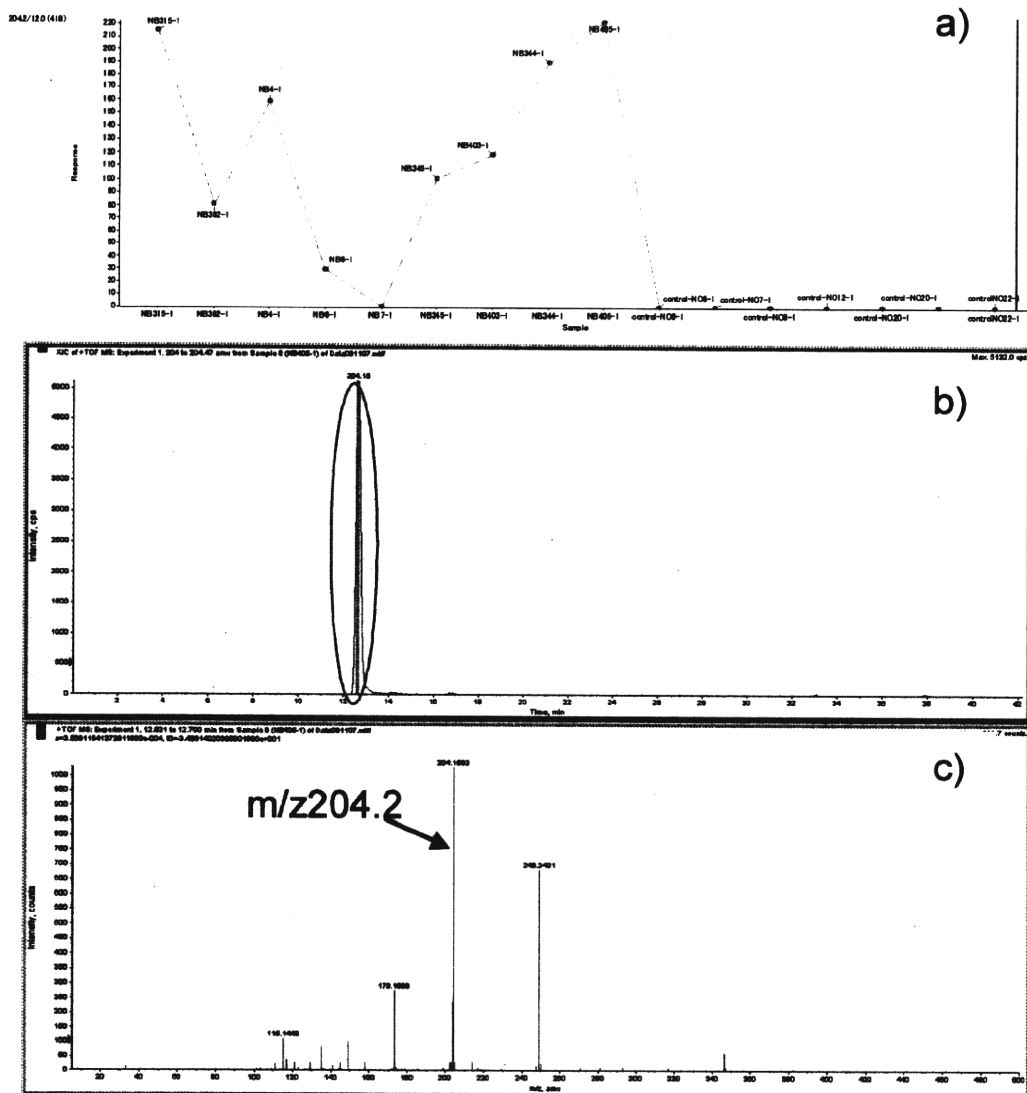


図.9 患者血清分析の MakerView 解析 IVA 期患者血清 (赤) とコントロール血清 (青) 間で有意な差が見られた物質 (12.0 分の m/z 204.2 のピーク)

a) t 検定の結果、b) m/z 204.2 の MS クロマトグラム、c) MS スペクトル

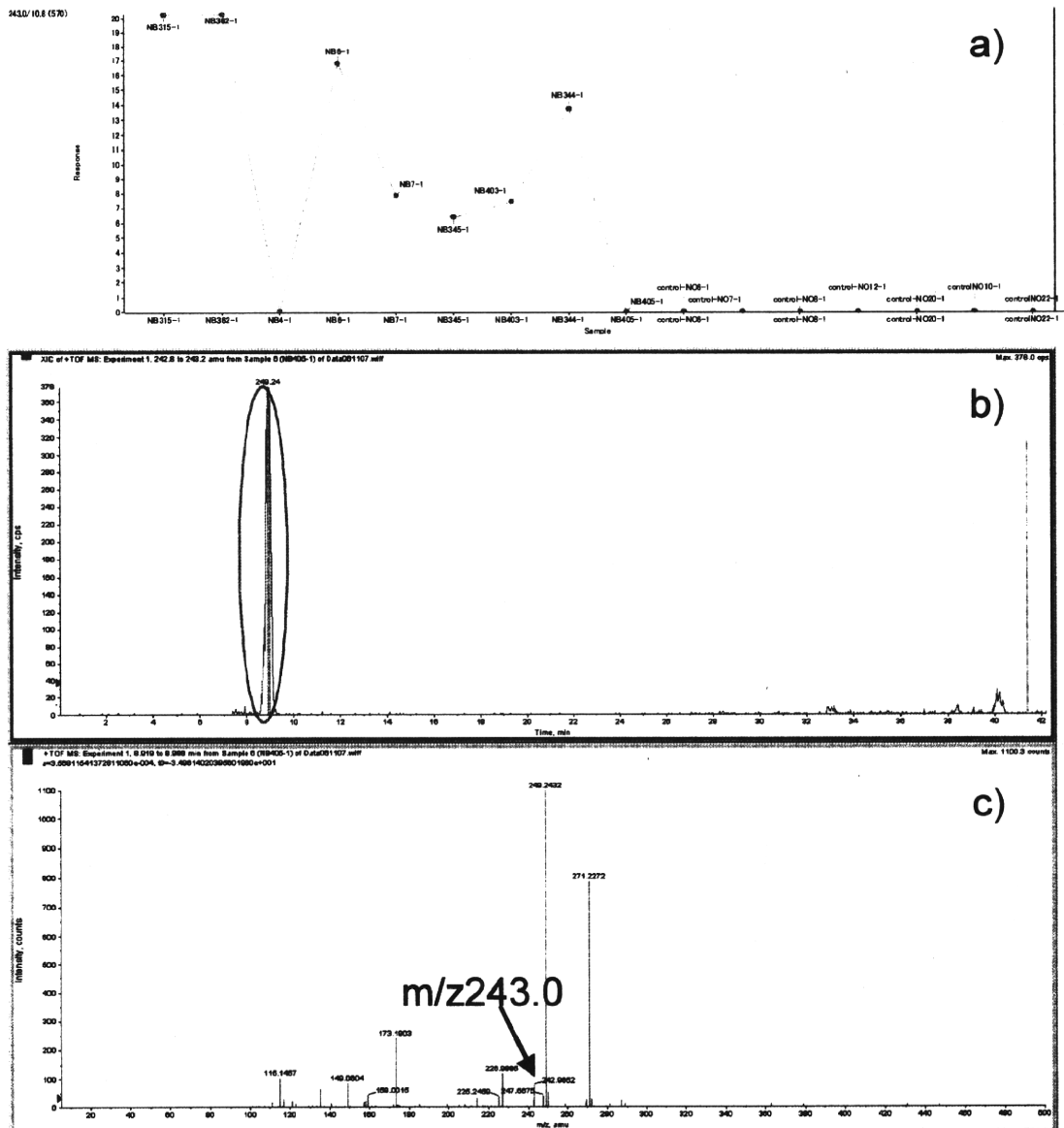


図.10 患者血清分析の MakerView 解析 IVA 期患者血清 (赤)

	4A-control	1-control	4-1
475.2/26.2	99.999961	98.417156	-56.268898
204.2/12.0	99.894408	97.528707	-94.431961
243.0/10.8	99.607239	99.829179	-32.314386
333.2/7.2	99.454352	91.870757	32.904877

表 10 患者血清分析の MakerView 解析

INSS 4 期患者血清とコントロール血清間で有意な差が見られた物質について 1 期患者血清とコントロール血清、4 期と I 期で t 検定を行った結果の t 値の比較

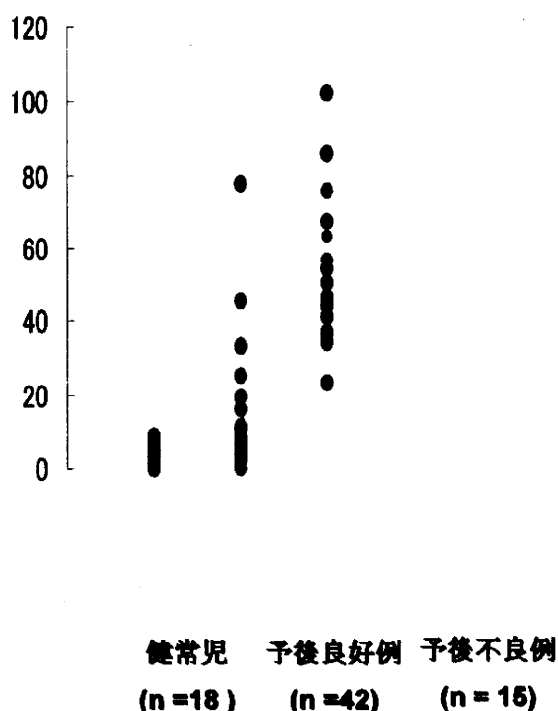


図 11：ペプチドMHの神経芽腫及び健常児の血清濃度

次に、予後との相関から、予後不良例に特異的に上昇しているペプチドをペプチドMHと命名し、このペプチドに対するポリクローナル抗体を作製し、神経芽腫患者および対照児の保存血清を用いて定量した(図11)。検体数が十分ではないが、有意に予後不良例で血清中濃度が高値であり、有用な送別マーカーと考えられた。今後、早期例を中心に検討し、また18ヶ月スクリーニングへの応用について検討を行う予定である。

D. 考察

2003年まで過去20年近く継続された生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業は、過剰診断による不利益から、休止となったが、一方で、これらから得られたエビデンスを神経

芽腫の診断と治療成績向上に確実に結びつける必要がある。特に休止にあたり、早急に解決すべき点として①本症の罹患と死亡の正確な把握、②マスの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価、③本症による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立、の三点が挙げられ、これに対して、国内外のコホートをもちいてすでに終了している後向き研究に加えて②前向き研究野成果と、③腫瘍特性解析からの新規マーカーによる早期発見法の確立について検証を行った。

本年は後向き研究の継続として、2006年以降に診断された症例の発生頻度と予後の統計解析と病理所見の検討に加え、これらの後向き研究から得られるエビデンスについて検討を

行った。休止後は、1才未満の症例が減少し、予想通りに2才以降の症例数が休止後2年たった頃から増加し、小児人口の減少を鑑みるとほぼ休止前と同様の発症年齢分布となり、また、欧米とも同様の分布となったことから、6ヶ月の神経芽腫検査事業の本腫瘍における早期診断例の存在は再確認された。

奇しくも、欧米のデータが公表され、これらのデータと比較検討することで人種間の問題はあるものの、同時代の比較さらに生物学的特性解析のデータの解析も可能となった。

そこで、これらの後向き研究の成果を基に、施行された生後18ヶ月の前向き研究グループ成果では、現時点で10症例が発見され、6391出生に対して1の割合であり、これらのうち明かな早期診断症例はなく、有効性を検証する前向き研究の早期施行が期待される。

新たな前向き研究を行うにあたり、施行時期の問題と共に新たな検査法の導入の検討を行ってきた。昨年来、血清を用いたMYCN増幅の検討、さらに、血清NM23H1の測定などを行ってきたが、本研究では、LC/MS/MSによる網羅的分子追跡法（マスマッピング）により、予後不良な神経芽腫に特異的なマーカー探索が可能となり、いくつかの候補蛋白が絞り込まれ、これらを同定することによって、予後不良腫瘍に特化したマーカーによるスクリーニングが可能となると考えられ、同定を急いでいる。さらに、この治療が必要な腫瘍に特異的な腫瘍マーカーは、新たなスクリーニング法の開発だけでなく、臨床の場での診断や治療効果の判定に応用可能なマーカーとなる。

今後、保存血清を用いて悪性度の高い腫瘍の特異的なマーカー探索に応用する予定である。

E. 結論

6ヶ月施行神経芽マス前後の2500万以上のコホート解析で、神経芽腫の発症形式とその経過への大きな知見を得た。罹患率（2500例に1例）が2倍以上に上昇したが、死亡率は半減していた。故に、乳児例は相当数が退縮・分化する一方、その中から悪性度を増して進行する腫瘍が存在することが示された。18か月神経芽マスは前者の腫瘍の発見は少なく、また、新規マーカーを用いることによる効果的な神経芽マス確立に向けてさらに検討を継続する。

さらに、血清を用いた悪性度診断法へのアプローチとして、血清DNAによる腫瘍のMYCN遺伝子増幅の検討、血清NM23H1濃度などのマーカーの評価ともに、尿中、血中のカテコラミン代謝物を含めた低分子マーカーの一斉解析法としてLC/MSによる網羅的検出法の確立、特に、LC/MS/MSによる網羅的分子追跡法（マスマッピング）により、予後不良な神経芽腫に特異的なマーカー探索し、特異的なマーカーの候補が絞り込まれ、診断・治療効果の判定に使用可能であるだけでなく、今後の新たな形のスクリーニングへ応用する。

F. 健康危険情報

生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業は、従来から指摘されている乳児の予後良好な腫瘍を過剰診断してきたが、一方、HPLCによる定量法が導入された1990年以降の群では、明らかに2歳以上の症例が半減し、予後向上に寄与していた。そこで、過剰診断を最小にし、さらに早期発見できるスクリーニングは、生後18ヶ月が適切で、すでに10例が発見され全例生存している。

また、予後不良型に特異的な候補マーカーも見出され、より有効なスクリーニング法が組み立てられ、有効性の検証のために、充分は対象を設定した前向き研究を是非に行うべきである。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiyama, K., Hiyama, E., Danijoh, I. Public database useful for molecular diagnosis, in *Clinical Application of Molecular Diagnosis* edited by Hiyama, K., Hiyama, E. 1 edition, Vol. 1, p. 21-34. Kerala: Transworld Research Network, 2010.
- 2) Kato Y, Murakami Y, Uemura K, et al. Impact of intratumoral thymidylate synthase expression on prognosis after surgical resection for ampullary carcinoma. *J Surg Oncol*, in press
- 3) Hishiki, T., Matsunaga T, Sasaki F, Ida T, Horie H, Kondo S, Watanabe K, Oue T, Tajiri T, Kamimatsuse A, Ohnuma N, Hiyama, E. Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT. *Pediatr Surg Int. Pediatr Surg Int.* 2011; 27:1-8.
- 4) Kojima K, Hiyama E, Otani K, Ohtaki M, Fukuba I; Fukuda E; Sueda T; Hiyama K. Telomerase activation without shortening of telomeric 3'-overhang is a poor prognostic factor in human colorectal cancer *Cancer Sci.* 2011;102:330-5
- 5) Nagatani S, Sudo T, Murakami Y, Uemura K, Hiyama E, Sueda T. Edaravone, a free radical scavenger, promotes engraftment of intraportally transplanted islet cells. *Pancreas.* 2011; 40:126-30.
- 6) Arai, Y., Honda, S., Haruta, M., Kasai, F., Fujiwara, Y., Ohshima, J., Sasaki, F., Nakagawara, A., Horie, H., Yamaoka, H., Hiyama, E., Kaneko, Y. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010; 49: 596-609.
- 7) Hiyama, E., Hiyama, K. Diagnostic and prognostic molecular markers in neuroblastoma, in *Clinical Application of Molecular Diagnosis* edited by Hiyama, K., Hiyama, E. 1 edition, Vol. 1, p. 21-34. Kerala: Transworld Research Network, 2010.
- 8) Kamimatsuse A, Onitake Y, Kamei N, Tajima G, Sakura N, Sueda T, Hiyama E. Surgical intervention for patent ductus venosus. *Pediatr Surg Int.* 2010;26:1025-30
- 9) Arifin, M., Tanimoto, K., Putra, A. C., Hiyama, E., Nishiyama, M., Hiyama, K. Carcinogenesis and cellular immortalization without persistent inactivation of p16/Rb pathway in lung cancer. *Int J Oncol*, 2010; 36: 1217-1227.

- 10) Ohtaki, M., Otani, K., Hiyama, K., Kamei, N., Satoh, K., Hiyama, E. A robust method for estimating gene expression states using Affymetrix microarray probe level data. *BMC Bioinformatics*, 2010;11:183.
- 11) Shalaby, T., Hiyama, E., Grotzer, M. A. Telomere Maintenance as Therapeutic Target in Embryonal Tumours. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010;10:196-212.
2. 学会発表
- 1) Hiyama E. Molecular diagnosis in neuroblastoma. 6th Congress of the SIOP Asia. Kish Island, Iran. March3-5, 2010.
- 2) 檜山英三 (座長). がん幹細胞. 第9回日本再生医療学会. 広島市. 2010年3月18-19日.
- 3) 檜山英三 (座長). 小児③第46回日本腹部救急医学会総会. 富山市. 2010年3月18-19日.
- 4) 檜山英三 (司会) 小児③第110回日本外科学会定期学術集会. 名古屋市. 2010年4月8-10日.
- 5) 亀井尚美, 上松瀬新, 早川誠一, 世羅康彦, 佐藤貴, 小林正夫, 檜山英三. 縦隔卵黄嚢腫瘍の1例. 第51回中国四国小児がん研究会. 広島市. 2010年4月17日.
- 6) 上松瀬新, 亀井尚美, 小林良行, 三木瑞香, 中村和洋, 佐藤貴, 檜山英三. 縦隔絨毛癌の1例. 第51回中国四国小児がん研究会. 広島市. 2010年4月17日.
- 7) Hamamoto K, Hiyama E, Fujita N, Kamimatsuse A, Kamei N, Miki M, Nakamura K, Sato T, Kobayashi M. Hickman-Broviac catheter-related infections in children with malignancy. 43rd Annual Meeting of Pacific Association of Paediatric Surgeons (PAPS). May24-28, 2010.
- 8) Kamimatsuse A, kamei N, Sueda T, Nishimura T, Kobayashi M, Hiyama E. Indication for surgical interventions for thoraco-abdominal emergencies in children receiving chemotherapy. 43rd Annual Meeting of Pacific Association of Paediatric Surgeons (PAPS). 神戸市. 2010年5月24-28日.
- 9) Hiyama E, Kamimatsuse A, Kamei N, Watanabe T, Hishiki T, Tajiri T, Idano M, Kondo S, Sasaki F, Japanese Study for pediatric Liver Tumor. Cisplatin plus pirarubicin chemotherapy and combination ifomide, etoposide, pirarubicin, and carboplatin chemotherapy for hepatoblastoma. ASCO 10th Annual Meeting. Chicago. June 4-8, 2010.
- 10) 上松瀬新, 菱木知郎, 亀井尚美, 田尻達郎, 渡邊健一郎, 矢野道広, 堀江弘, 井田孔明, 近藤知史, 大植孝治, 佐々木文章, 大沼直躬, 檜山英三. 小児肝芽腫に対する JPLT-2 プロトコールの治療成績. 第47回日本小児外科学会学術集会. 名古屋市. 2010年6月17-19日.
- 11) 檜山英三 (司会). シンポジウムⅢ小児外科における基礎研究. 第47回日本

- 小児外科学会学術集会. 名古屋市. 2010年6月17-19日.
- 12) Hiyama E, Kamei N, Kamimatsuse A, Hiyama K, Hirai Y, Masujima T. Omics analysis and evolution for identification of candidate genes in progression of neuroblastoma. *Advances in Neuroblastoma Research(ANR)2010*. Stockholm, Sweden. June 21-24, 2010.
 - 13) Hiyama E, Kamimatsuse A, Kamei N, masujima T, Hiyama K, Ohtaki M. Screening at 18 months of age using the new serum marker for reducing the mortality of neuroblastoma: Simulation using Japanese population based cohort study. *Advances in Neuroblastoma Research (ANR)2010*. Stockholm, Sweden. June 21-24, 2010.
 - 14) 檜山英三 (司会). 神経芽腫スクリーニングの正しい評価と今後. 第18回日本がん検診・診断学会. 東京都. 2010年7月16-17日.
 - 15) 檜山英三 (座長). 神経芽腫マスキングの有効性と問題点. 第18回日本がん検診・診断学会. 東京都. 2010年7月16-17日.
 - 16) 上松瀬新, 亀井尚美, 檜山英三. 神経芽腫マスキングの再評価と今後の方向性. 第18回日本がん検診・診断学会. 東京都. 2010年7月16-17日.
 - 17) Hiyama E, Kamei N, Kamimatsuse A, Hirai Y, Hiyama K, Masujima T. Identification of New Candidate Genes in Progression of Neuroblastoma Using Omics Analysis. *SIOP2010*. Boston, USA. October 21-24, 2010.
 - 18) 檜山英三 (司会). 小児悪性腫瘍に対する鏡視下手術. 第47回日本癌治療学会. 京都市. 2010年10月28-30日.
 - 19) Tanimoto K, Eguchi H, Wada S, Nakamura H, Poellinger I, Hiyama E, Nishiyama M. Molecular mechanisms of regulation of the pVHL by oncogenic UBE2S/E2-EPF. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会. 神戸市. 2010年12月7-10日.
 - 20) 檜山英三 (座長). 何治性肝腫瘍に対する治療戦略. 第26回日本小児がん学会学術集会. 大阪市. 2010年12月17-19日.
 - 21) 上松瀬新, 菱木知郎, 田尻達郎, 渡邊健一郎, 矢野道広, 堀江弘, 井田孔明, 近藤知史, 大植孝治, 佐々木文章, 檜山英三. JPLT2における高リスク群肝芽腫症例の検討. 第26回日本小児がん学会学術集会. 大阪市. 2010年12月17-19日.
 - 22) 菱木知郎, 佐々木文章, 矢野道広, 井田孔明, 堀江弘, 近藤知史, 渡邊健一郎, 大植孝治, 田尻達郎, 檜山英三. 難治性肝芽腫の治療～拡大肝切除・転移巣切除・IVR. 第26回日本小児がん学会学術集会. 大阪市. 2010年12月17-19日.
 - 23) 檜山英三, 上松瀬新, 菱木知郎, 田尻達郎, 渡邊健一郎, 矢野道広, 堀江弘, 井田孔明, 近藤知史, 大植孝治, 西村真一郎, 堀江弘. 小児肝癌の国際的標

- 準治療法の確立に関する研究. 第26回日本小児がん学会学術集会. 大阪市. 2010年12月17-19日.
- 24) 上田祐華, 上松瀬新, 亀井尚美, 檜山英三. 肝芽腫における β カテニンの転写調節に関与するBRG1およびTERT発言に関する検討. 第26回日本小児がん学会学術集会. 大阪市. 2010年12月17-19日.
- 25) 亀井尚美, 檜山英三, 上田祐華, 上松瀬新, 末田泰二郎, 檜山桂子. 神経芽腫におけるALK遺伝子活性型変異および増幅症例の検討. 第26回日本小児がん学会学術集会. 大阪市. 2010年12月17-19日.
- 26) 亀井尚美, 檜山英三, 上松瀬新, 中村和洋, 小林正夫. 積極的な外科的治療を行った進行縦隔腫瘍の3例. 第26回日本小児がん学会学術集会. 大阪市. 2010年12月17-19日.
- 27) 檜山英三(座長). 血液疾患に対する新たな分子標的薬の展開. 第26回日本小児がん学会学術集会. 大阪市. 2010年12月17-19日.
- 28) 檜山英三. 小児肝腫瘍に対する治療の現状と将来. 第40回九州地区小児固形悪性腫瘍研究会. 福岡市. 2011年2月19日.
- 29) 鎌田綾, 香川礼子, 金丸博, 三木瑞香, 世羅康彦, 川口浩, 中村和洋, 小林正夫, 亀井尚美, 上松瀬新, 檜山英三. 縦隔を原発した難治性胚細胞腫瘍の三例. 第17回西日本小児がんセミナー. 2011年3月26日.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許出願 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし
- 27) 檜山英三(座長). 血液疾患に対する