

札幌市における神経芽細胞腫 マス・スクリーニング

Mass Screening for Neuroblastoma in Sapporo City

佐藤 泰昌 佐藤 勇次 田口 武
林 英夫 高杉 信男 武田 武夫*

Yasumasa Sato, Yuji Sato, Takeshi Taguchi,
Hideo Hayashi, Nobuo Takasugi and Takeo Takeda

札幌市では、昭和56年4月から乳幼児の採尿ろ紙による神経芽細胞腫マス・スクリーニングを開始した。

スクリーニングは、その疾病の性質上、発見もれの少ない方法でなければならないことから、バニールマンデル酸（以下「VMA」）の定性に加え、ホモバニリン酸（以下「HVA」）を定量し、さらに疑わしいものについては高速液体クロマトグラフィー（以下「HPLC」）により測定するという方法で実施している。

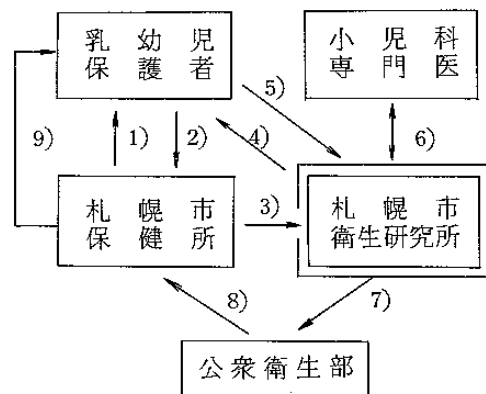
このスクリーニング法により、第1例目の症例が発見され、早期治療が行われた。

1. 緒 言

神経芽細胞腫は、発生頻度において小児悪性腫瘍の首位を占め、悪性度も極めて高い腫瘍である。しかし、早期発見、早期治療により大部分が根治できる疾病であることから、マス・スクリーニングの成果が期待されている。

スクリーニングは、この腫瘍がカテコールアミン（以下「CA」）産生能をもつことから、尿中に排泄されるCA代謝産物を測定することにより行うことができる^{1) 2)}。

札幌市では、昭和56年4月から要綱に定めたシステム（図1）により、マス・スクリーニングを開始した。



- 1) 検査セット送付
- 2) 検査申込み
- 3) 検体回収
- 4) 検査結果の通知
- 5) 再検査尿送付
- 6) 精密検査の連絡
- 7) 精密検査の報告
- 8) 受診指導の指示
- 9) 受診指導

図1 神経芽細胞腫スクリーニングシステム

* 国立札幌病院小児科

スクリーニングは、VMAの定性とともに発見率を高めるためにHVAを薄層クロマトグラフィー（以下「TLC」）により定量し、同時に各検体のクレアチニン量を測定し、クレアチニン比でVMA、HVAの増量を判定している。さらにこの結果が疑わしいものについては、再検査及び精密検査依頼のため、HPLCで定量し判定するという方法で実施している。

今回は、札幌市における神経芽細胞腫スクリーニング方法及びその結果について述べ、あわせて発見症例について報告する。

2. 方法

2-1 採尿

ろ紙（東洋ろ紙No. 2, 10cm×7cm）を体とおむつの間にはさみ、尿を染みこませたものを検体とした。

2-2 ろ紙尿の前処理

TLC及びHPLCの試料とするため、以下の操作によりろ紙尿の前処理を行った（図2）。

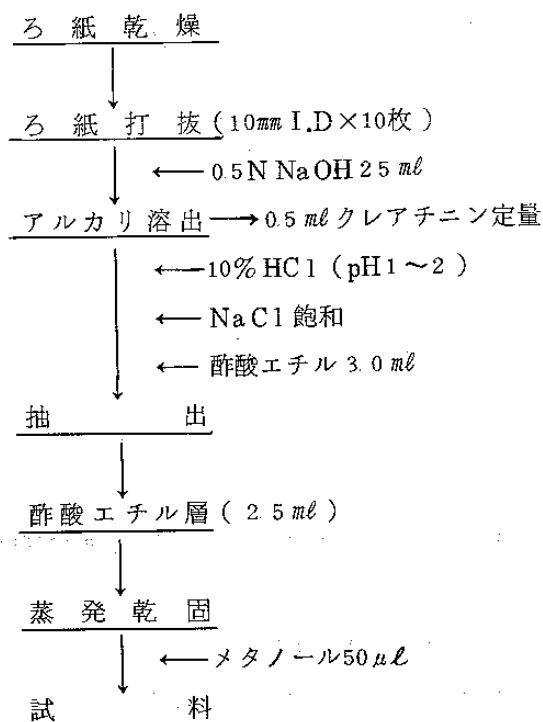


図2 ろ紙尿の前処理工程図

1) ろ紙尿をドラフト中で乾燥後、直径10mmに10枚パンチアウトし、小試験管にとる。

2) 0.5 N NaOH 25 mlを入れ、30分間超音波洗浄器にて溶出する。

3) 溶出液の一部0.5 mlをクレアチニン測定用に他の小試験管に分取後、残りの液に10% HClを入れ、pH 1~2とする。

4) NaClで飽和後、酢酸エチル3.0 mlを入れ、10分間振盪し、抽出する。

5) 静置後、抽出液2.5 mlをバイエルびんにとり、蒸発乾固し、その残渣にメタノール50 μlを加え溶解し、試料とする。

2-3 VMAの定性

試料10 μlをセルロースプレートにスポットし、ジアゾ化パラニトロアニリン試薬で発色後³⁾⁴⁾、デンストメーターでその濃度を測定した（波長560 nm）。さらにこの濃度のクレアチニン比を求め、その値の上位約10%につきHPLCによる測定を行った。

2-4 TLCによるHVAの定量

試料10 μlを濃縮ゾーン付シリカゲルプレートにチャージする。ベンゼン：酢酸：水=2：3：1の溶媒で展開し、風乾後、1 Nのフォーリン試薬及び10% Na₂CO₃を噴霧して発色し⁵⁾、デンストメーターでその濃度を測定した（波長610 nm）。各プレート板ごとに、検体と同じ前処理をした標準液をチャージし、その検量線から濃度を算出した。この濃度のクレアチニン比から35 μg/mgクレアチニン以上のものにつきHPLCによる測定を行った。

2-5 クレアチニンの定量

溶出液の一部0.5 mlを小試験管に分取し、以下Jaffeの反応を利用したFolin-Wu法⁶⁾⁷⁾により濃度を測定した。

2-6 HPLCによるCA代謝産物の定量

2-6-1 試料の調整

直径10mmにパンチアウトしたる紙尿を10枚ずつ小試験管にとり、一方には標準液を添加する。以下図2の前処理により試料を調整し、各々その10 μ lをHPLCに注入し、標準液添加試料との対比からその濃度を算出した。

2-6-2 HPLCによる測定

CA代謝産物の測定は、それぞれの物質がもつ自然けい光検出法で行った。

HPLC測定条件を表1に示す。

表1 HPLC条件

カラム	日立ゲル#3013-0. 5 μ m (2.6mm I.D \times 250mm)
移動相	0.05M酒石酸緩衝液(pH3.5): アセトニトリル(500:70)
カラム温度	40 $^{\circ}$ C
圧力	115 kg/cm ²
流量	1.0 ml/min
測定波長	EX 282nm, Em 315nm
チャート速度	5.0 mm/min
注入量	10 μ l

標準液のクロマトグラムを図3に、絶対検量線を図4に示す。

この条件により、約15分でVMA, HVA及びバニール乳酸(以下「VLA」)の定量を行うことができた。なお、発見された患児のクロマトグラムを正常児のものに対比し図5に示す。

2-6-3 HPLC測定による判定

HPLCによる測定の結果が、VMAで20 μ g/mgクレアチニン、HVAで35 μ g/mgクレアチニンを超えるものについて再採尿による再検査を行うこととした。また、病院への精密検査依頼は、再検査の結果、なお上記カットオフ値を超える者について実施することとした。なおVLAについては、特にカットオフ値を定めず、判定のための参考値としている。

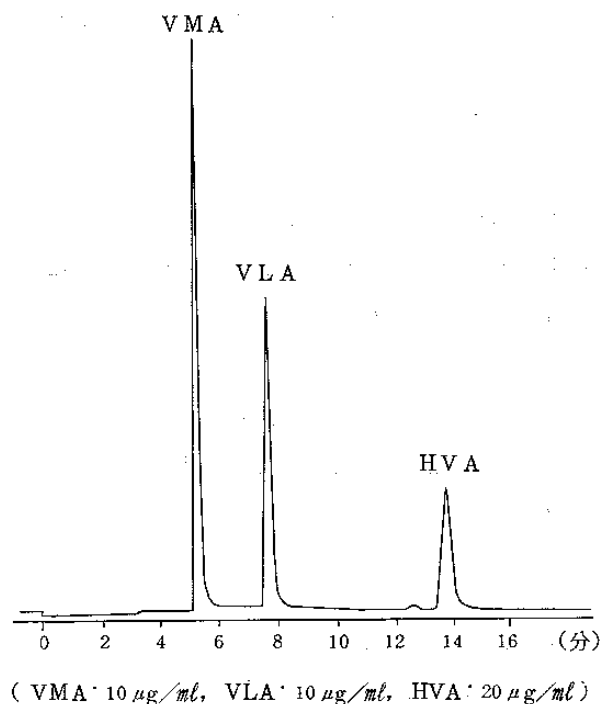


図3 標準液のクロマトグラム

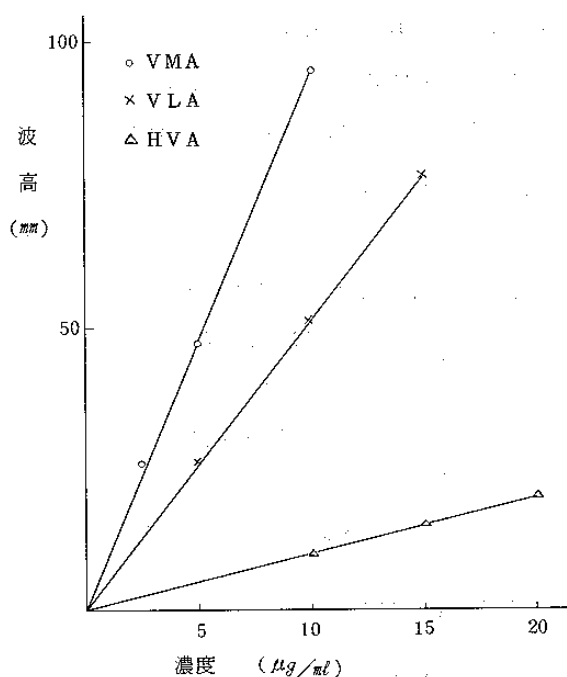


図4 VMA, VLA及びHVAの絶対検量線

3. 結果及び考察

昭和56年4月から昭和57年3月末までと、昭和57年4月から昭和57年8月末までのスクリーニング検査結果を表2に示す。

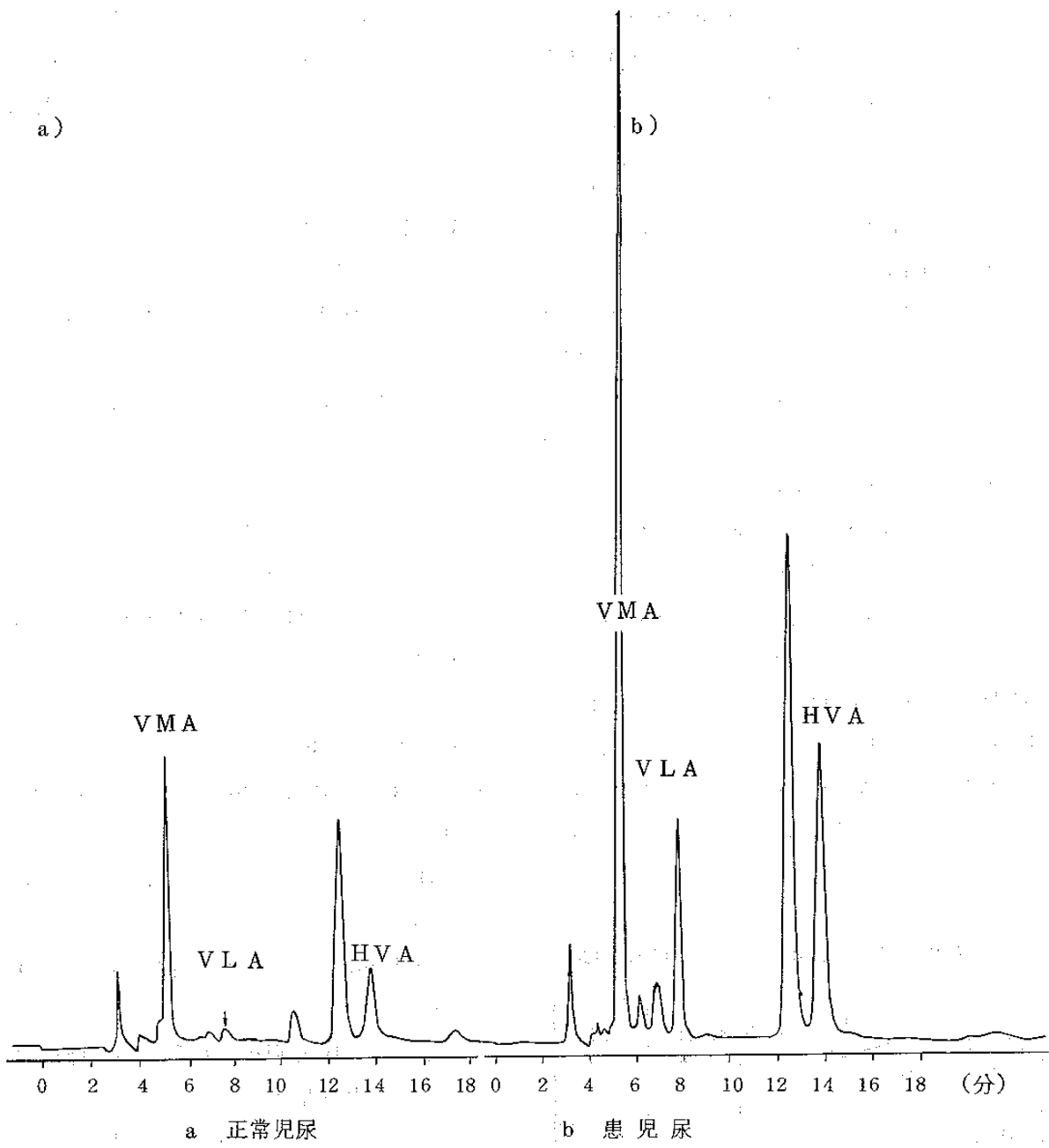


図5 尿抽出液によるクロマトグラム

表2 神経芽細胞腫スクリーニング検査結果

期 間	被検者数	HPLCによる 測定実施数(率)	再検査数(率)	精 検 数(率)	患児数
56.4 ~ 57.3	10,634	1,012 (9.5%)	66 (0.6%)	2 (0.02%)	0
57.4 ~ 57.8	5,817	421 (7.2%)	77 (1.3%)	1 (0.02%)	1
総 計	16,451	1,433 (8.7%)	143 (0.9%)	3 (0.02%)	1

VMAの定性, TLCによるHVAの定量の結果からHPLCによる測定を実施した数は, 昭和56年度が被検者数10,634名中1,012例, 9.5%であったが, 昭和57年度は8月末までの被検者数5,817名中421例, 7.2%と減少した。これは昭和56年度が検査開始初年度ということで, 特にVMAの定性結果からHPLCに回す数を多目にとったためである。またHPLCによる測定を実施した1,433例中, 再採尿により再検査を行ったものは143例, 10%であり, さらに精密検査となったものは3例, 0.2%であった。従って被検者総数16,451名に対し, 再検率を0.9%, 精検率を0.02%と著しく低くできたのは, HPLCによる測定を実施しているためといえる。なお, 精密検査となった3例のうち, 神経芽細胞腫と確定診断されたのは1例であった。以下にその症例を報告する。

症例: 昭和56年8月生まれ, 女児, (No.11,428)
昭和57年4月20日採尿。スクリーニング検査の結果(表3), VMA, HVAともにカットオフ値を大幅に超えたため専門医に連絡。直ちに国立札幌病院に入院し精密検査を受ける。

表3 患児のスクリーニング検査成績

検査項目	検査名	初回検査	再検査
VMA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニン)	陽性	105*	73*
HVA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニン)	149	159*	105*

(* HPLCによる測定値)

入院直後の尿検査では, VMA $70 \mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニン, HVA $76 \mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニンであった。腹部CTスキャン, 血管造影等で右副腎に腫瘤が認められ, 血液・尿の生化学的検査等から, 神経芽細胞腫と臨床診断された。昭和57年6月8日, 腫瘍摘出手術が施行され, 病理組織学的診断から, 副腎髄質から発生した原発臓器に限局した神経芽

細胞腫と確定診断された。術後1週目の尿検査では, VMA $17 \mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニン, HVA $20 \mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニンとともに正常値を示し, 術後経過も極めて良好である。

4. 結 語

神経芽細胞腫マス・スクリーニングは, 小児悪性腫瘍の早期診断のため, その測定法は発見もれの少ない確実な方法でなければならない。そこで札幌市では, VMAの定性に加え, TLCによるHVAの定量を行い, さらにその結果が疑わしいものについてはHPLCにより測定するという方法で実施している。この方法により, 家族に心配を与える再検査及び精密検査の数を著しく少なくするとともに, 第1例目の神経芽細胞腫患児を発見し, 早期治療を行うことができた。

5. 文 献

- 1) Sandler, M. & Ruthven: Lancet, II: 114, (1959)
- 2) Gitlow, S. E. et al: Cancer, 25: 1377, (1970)
- 3) 佐藤辰男, 吉永馨, 石田望: 最新医学, 16, 371, (1961)
- 4) 沢田淳: 現代小児科学大系, 年刊追補 168, (1974) 中山書店
- 5) 今宿晋作, 高田洋, 楠智一: 小児科, 10, 168 (1969)
- 6) Bonsnes & Taussky: J. Biol. Chem, 158: 581 (1945)
- 7) 金井泉, 金井正光: 臨床検査法提要, 第28版, VII-39 (1978)