

〔資料〕

神経芽細胞腫マス・スクリーニング
— “直接法” による VMA、
HVA 測定をとり入れて —

Mass Screening for Neuroblastoma in Infants
— Application of “Direct Method” to
Measurement of VMA and HVA in Urine
on Filter Paper —

花井 潤師 川合 常明 佐藤 泰昌
清水 良夫 富所 謙吉 高杉 信男
武田 武夫*

Junji Hanai, Tsuneaki Kawai, Yasumasa Sato,

Yoshio Shimizu, Kenkichi Tomidokoro, Nobuo Takasugi
and Takeo Takeda*

1 緒言

札幌市では、昭和56年4月から、乳児の神経芽細胞腫マス・スクリーニングを実施しており、当初から、スクリーニングの精度の向上を目的として、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を導入し、検査を行ってきたが、その後、本症スクリーニングは昭和61年1月から、国の事業としてとり上げられ、全国の自治体で実施されるようになった。

最近、全国的なスクリーニング結果の集計が行なわれるにつれ、VMAの定性検査 (Spot法またはDip法) とHPLCによる定量検査でのスクリーニング結果において、患児の発見頻度の違いが明らかになり¹⁾ 改めて、HPLCでの検査精度の高さが確認された。

これまで、全検体について、有機溶媒抽出による前処理後、VMAやHVAなどの定量を行ってきたが²⁾ 検査の迅速化および前処理の簡便化を計るため、簡易な前処理 (以下 “直接法”) による

検査法を確立した³⁾

今回、“直接法”によるスクリーニングの概略を述べるとともに、昭和61年度のスクリーニング結果とあらたに発見した2例の患児の症例について報告する。

2 方法

2-1 測定法

2-1-1 “直接法”

既報³⁾に従って行ったが、その概略を図1に示した。

2-1-2 “抽出法”

尿ろ紙 (8×20mm) 2枚を試験管にとり、0.05 M酒石酸塩緩衝液 (pH 3.6) を 3.0 ml 加え10分間激しく振とうし、遠心分離後、上清 0.75 ml ずつを2本の共栓遠心管に分取した。

次に、このうち1本に標準液 (VMA、VLA 5-HIAA それぞれ 4 μg/ml, HVA 8 μg/ml)

*国立札幌病院小児科

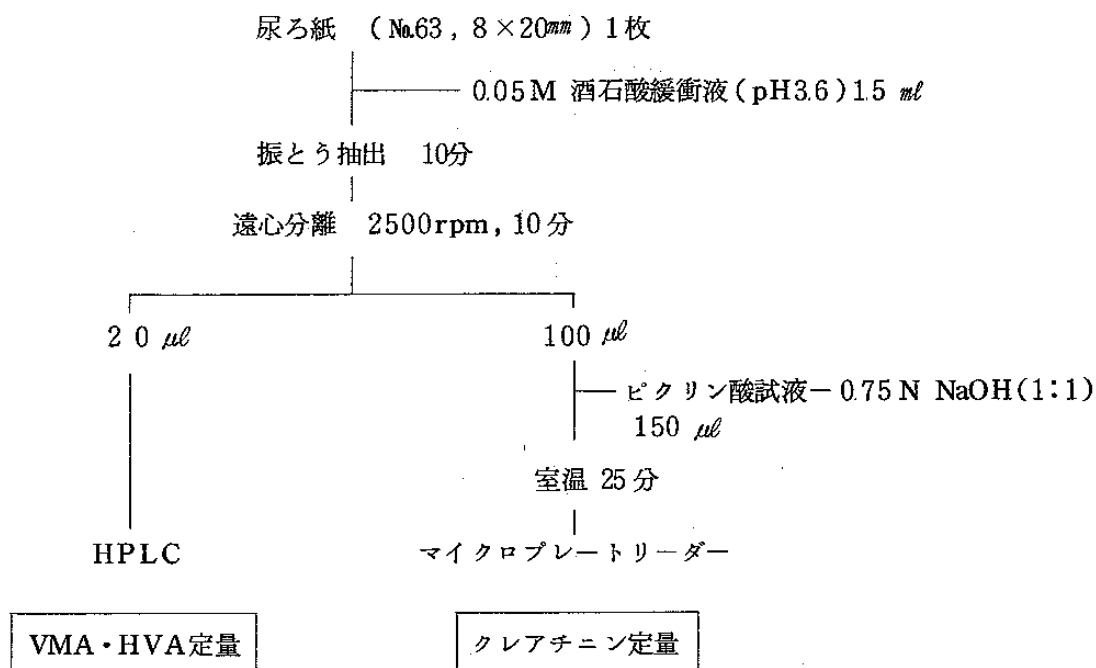


図1 直接法によるVMA, HVA, クレアチニンの測定法

50 μ l を加えた後、それぞれに、2.6% 塩酸0.5ml、塩化ナトリウム約 0.8 g、酢酸エチル 2.5 ml 加え、10分間振とう抽出した。遠心分離後、酢酸エチル層 1.5 ml をサンプルカップに分取し、遠心濃縮器により蒸発乾固した。その後、上記緩衝液200 μ l を加え、混和し、HPLC 測定を行った。なお、VMA などの定量は標準添加法により行ったが、その概略、HPLC 条件を図2に示した。

2-1-3 データ処理

HPLC での測定は、試料の導入から濃度計算まで、すでに自動化されているが、今回、これら HPLC でのデータ処理装置 (SIC 7000 B、システムインストゥルメント) とクレアチニン測定のマイクロプレートリーダー (NJ 2000、日本インターメッド) を RS-232 C を介して、コンピューター (NEC PC 9801 VF 2) とオンライン化し、クレアチニンの濃度計算、VMA、HVA などのクレアチニン補正や再計算、さらに、判定を含めた検査台帳の出力などのプログラムを作成し、

検査結果の管理などのコンピューター化を行った。

2-2 スクリーニング方法

スクリーニングでは、HPLC 測定における精度を上げ、さらに再検査率を低くおさえるため、“直接法”で行った初回検査で疑陽性となった検体は、すべて、同一のろ紙を用いて、“抽出法”による再チェック検査を行い、判定を行った。これは、“直接法”においては VMA 付近の分離状態により、不明ピークと重なる検体がまれに出現することがあり、このための再採尿を除くことを目的としている。なお、再検査についても同様に、“抽出法”により測定したが、カットオフ値は、初回検査 (“直接法”) では VMA 20、HVA 30 μ g/mg クレアチニン、再チェックおよび再検査 (“抽出法”) では、それぞれ 25、32 μ g/mg クレアチニンとした。

2-3 スクリーニングでの判定

検査での判定は、カットオフ値に基づいて行うが、この際、尿量不足の検体や細菌汚染等により

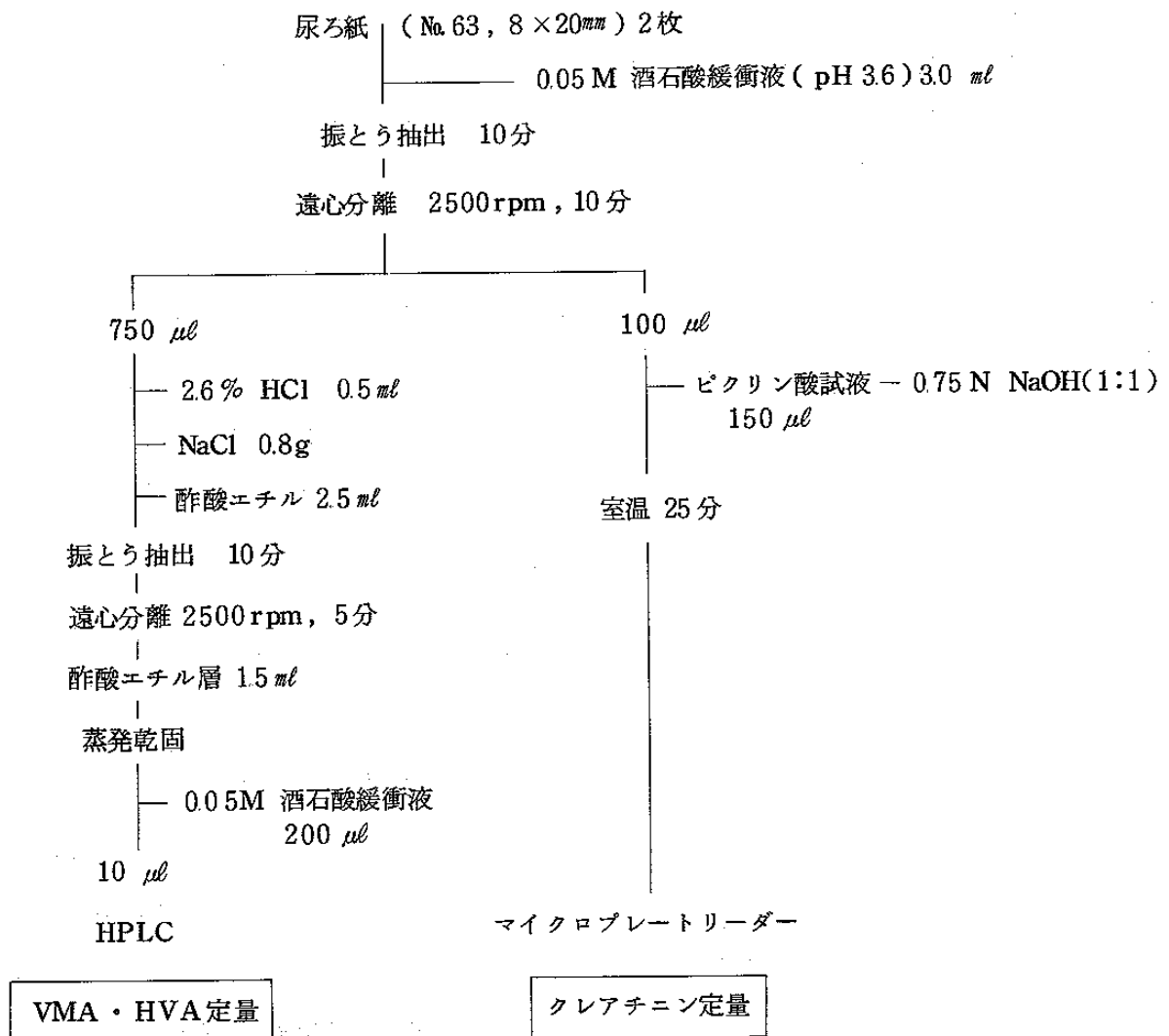


図2 抽出法によるVMA, HVA, クレアチニンの測定法

クレアチニンが低下した不良検体を区別するため、クレアチニン値を考慮して行った。すなわち、クレアチニンが $1 \mu\text{g}$ （ろ紙1枚当り、以下同じ）以下の場合には尿量不足として、再採尿を行った。また、再チェック検査においては、クレアチニンの分解などによるVMAやHVAの異常高値の可能性^{4) 5)}を考慮して、カットオフ値を超えたもののうち、クレアチニンが $5 \mu\text{g}$ 以下の検体については、原則的に不良検体とし、再採尿を行った。これら尿量不足や不良検体は、採尿後、再度、初回検査から検査を行った。

3 結果および考察

3-1 疑陽性率とカットオフ値

各検査段階における疑陽性数および率、並びにカットオフ値を図3に示した。再チェック検査は、受検者15,661人のうち2.4%、381人であり、この中から76人が再検査のための再採尿となった。しかし、これらの検体のうち、再チェック検査検体の150件がクレアチニン $5 \mu\text{g}$ 以下であり、さらに、再検査検体中の45件が低クレアチニン検体であったことから、真の疑陽性率は低クレアチニン検体を除いて考える必要があり、その結果は、それぞれ14%、0.2%であった。

さらに、採尿後にろ紙を乾燥することで低クレアチニン検体を大幅に減少できることが明らかとなり⁶⁾また、測定値のばらつきも少なくなることから、カットオフ値の再検討を行った。初回検査(“直接法”)では、疑陽性率1%程度となる。5,000件の測定値の平均+3SDのVMA 18、HVA 28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニンとした。また、再チェックおよび再検査(“抽出法”)では、疑陽性率0.5%程度となるVMA 20、HVA 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニンとし、昭和62年度から、スクリーニングのカットオフ値とした。

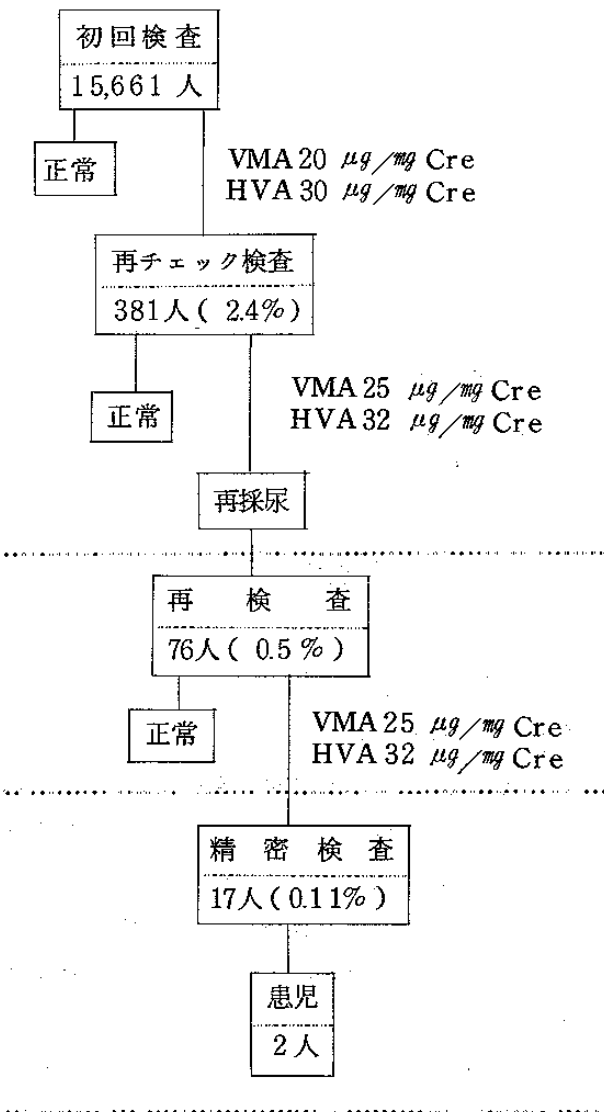


図3 検査の流れとカットオフ値

3-2 スクリーニング結果

昭和61年度は、15,661人がスクリーニングを受検し、2例の患児を発見し、治療が行なわれたが、これまでの発見患児は合計17例となり、その発見頻度は5,230人に1人であった(表1)。

表1 神経芽細胞腫マス・スクリーニング検査結果

1981.4-1987.3

期間	受診者数 (受診率)	再検数(率)	精検数(率)	患者数
'81.4 - '82.3	10,634 (63.0%)	66 (0.6%)	2 (0.02%)	0
'82.4 - '83.3	15,007 (74.3%)	190 (1.3%)	9 (0.06%)	4
'83.4 - '84.3	15,796 (76.1%)	361 (2.3%)	17 (0.11%)	3
'84.4 - '85.3	15,474 (75.5%)	173 (1.1%)	14 (0.09%)	4
'85.4 - '86.3	16,315 (83.5%)	79 (0.5%)	15 (0.09%)	4
'86.4 - '87.3	15,661 (82.1%)	76 (0.5%)	17 (0.11%)	2
総計	88,887 (75.8%)	945 (1.1%)	74 (0.08%)	17

なお、受診率は届出出生数をもとに算出した。

3-3 あらたに発見した2症例

前報での15例につづき、61年度にはあらたに2例(症例16、17)の患児を発見した。2例はそれぞれ、生後6、8か月でスクリーニングを受検し、スクリーニング時、精密検査時を通して、VMA、HVA値ともにカットオフ値の2倍以上の高値を示した。

両症例は精密検査時において、単純X線、IVP、骨シンチなどの画像診断から異常所見が得られ、このうち、症例17は腫瘍を触知することができた。その後、摘出手術が行われ、両例とも後腹膜原発の神経芽細胞腫と確定診断されたが、その病期はそれぞれⅡ、Ⅲ期であった。

なお、尿中VMA、HVA値は、術後直ちに正常値となり、術後の化学療法も打ち切り、外来にて経過観察を行っている(表2)。

表2 スクリーニング発見症例

1986.4-1987.3

症 例			16. T.K.	17. S.O.
スクリーニング時月令			6か月	8か月
スクリーニング結果	初回検査	VMA	46	58
		HVA	78	73
	再検査	VMA	57	78
		HVA	54	80
	精密検査	VMA	45	116
		HVA	51	123
手術時月令			7か月	9か月
原発部位			後腹膜	後腹膜
原発腫瘍の大きさ			25.5g 4×3.5×2cm	61g 7×5.5×3cm
病 期			Ⅱ	Ⅲ
経過('87.3現在)			良好	良好

※測定値はすべてHPLCによる定量結果
(単位: $\mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニン)

4 結 語

- (1) 昭和61年度から、一次検査に“直接法”によるVMA、HVAの測定法を導入し、さらに、クレアチニン補正、判定などの検査台帳の作成などをコンピュータ化し、検査の迅速化、自動化が計られた。
- (2) 1年間の測定結果から、カットオフ値は“直接法”でVMA 18、HVA 28 $\mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニン、“抽出法”でVMA 20、HVA 30 $\mu\text{g}/\text{mg}$ クレアチニンが適当と考えられ、昭和62年度以後、カットオフ値として、用いることとした。
- (3) 昭和61年度は15,661人がスクリーニングを受検し、2例の患児を発見したが、これまでの発見例の合計は17例となった。なお、2例は、

術後の化学療法も終了し、外来にて経過観察を行っている。

5 参考文献

- 1) 菊池和男、土田泰雄：小児科診療、50(8), 1526-1531(1987)
- 2) Sato, Y., Hanai, J., Takasugi, N., Takeda, T.: Tohoku, J. Exp. Med., 150 169-74(1986)
- 3) Hanai, J., Kawai, T., Sato, Y., Takasugi, N., Nishi, M., Takeda, T.: Clin. Chem., 33(11), 2043-2046 (1987)
- 4) 水田満里、海佐裕幸：昭和61、62年度代謝異常スクリーニング研究会会報, 10, 183-184 (1987)
- 5) 今井準三、田中久子、後藤喜一、森下有輝、河合 信：日本衛生学雑誌, 42(1), 511 (1987)
- 6) 川合常明、花井潤師、以頭まゆみ、佐藤泰昌、清水良夫、富所謙吉、高杉信男、武田武夫：札幌市衛生研究所報, 14, 137-141 (1987)