

levels of caspase-dependent apoptosis that accompanies a number of intracellular mechanisms, such as an increased generation of ROS, cytochrome c release from mitochondria, and activation of downstream effector caspases. The findings of 4HPR-induced apoptosis presented in this study are mostly consistent with those reported previously, except for the evidence of caspase-8 activation. It has been shown that caspase-8 is almost exclusively inactivated in NB cells with amplified *MYCN* protein through DNA methylation or gene deletion. By contrast, the protein of procaspase-8 was detected in NB-39-nu cells and underwent cleavage to be

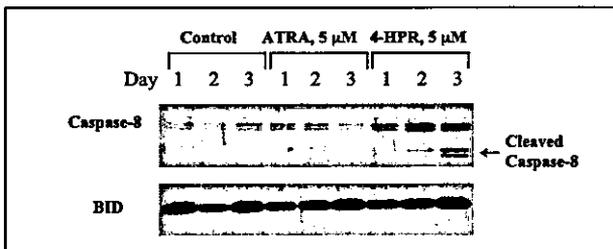


Figure 5. Western analysis of caspase-8 and BID in NB-39-nu treated with 4HPR or RA at 5 mM

activated in response to 4HPR, but not RA.

As reviewed in Figure 6, caspase-8 is a cysteine protease regulated in both a death receptor-dependent or -independent manner during apoptosis and plays important roles as an apoptosis-initiator. Interestingly, caspase 8 may act as a tumor suppressor in NB with amplification of *MYCN*. When transfected with wild caspase-8 gene, NB cells with inactivated intrinsic caspase-8 are prone to undergo apoptosis spontaneously or in response to Fas stimulation or chemotherapeutic agents. Moreover, an involvement of caspase-8 activation in 4HPR-induced apoptosis has been reported in several tumors, such as ovarian cell carcinoma cells, suggesting the possibility that 4HPR activates caspase-8 in a death receptor-independent manner.

Although the liability to apoptosis of NB-39-nu cells may be closely related the preserved expression of caspase-8, this study suggests that apoptotic initiator mechanisms other than caspase-8 may be involved in RA-induced apoptosis of this cell line. MYC overexpression leads to caspase-independent sensitization of cells to apoptotic signals, and cancer cells with deregulated MYC frequently exhibit defects in apoptotic pathways that inactivate MYC-driven mechanisms prone to apoptosis. Tajiri et al have shown that Bin1, a *MYCN*-interacting tumor suppressor, is reduced

in unfavorable NB, and, therefore, altered expression or function of Bin1 may be involving RA-induced apoptosis of NB-39-nu cells.

Alternative mechanisms by which RA induces apoptosis of NB-39-nu cells may modify the function of p53, which is rarely mutated in NB cells including NB-39-nu. Takada et al. reported that, in CHP134 NB cell line that has sequestration of p53 in cytoplasm, RA-induced translocation of p53 into the nucleus was involved in RA-induced apoptosis of CHP134. Therefore, modification of inactivation of p53 function is another mechanism by which RA induces apoptosis of NB-39-nu.

E. Conclusion

This study demonstrated that both of 4HPR- or RA-induced apoptosis of NB-39-nu cells similarly involved activation of effector caspases-3 and 9. In contrast with this similarity, we also presented findings that suggest a marked difference between 4HPR- and RA-induced apoptosis of NB-39-nu, which involves in the activation of initiator caspase-8 and the generation of ROS.

F. References

1. Matthay et al. *N Engl J Med* 341:1165, 1999; Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur

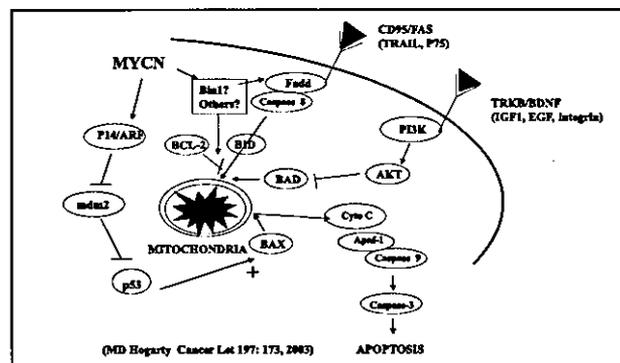


Figure 6. Schematic pathways of cellular apoptosis

- GM, Gerbing RB, Reynolds CP. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med.* 341:1165-1173, 1999.
2. Garaventa A, Luksch R, Lo Piccolo MS, Cavadini E, Montaldo PG, Pizzitola MR, Boni L, Ponzoni M, Decensi

- A, De Bernardi B, Bellani FF, Formelli F. Phase I trial and pharmacokinetics of fenretinide in children with neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* 9:2032-2039, 2003.
3. Melino G, Thiele CJ, Knight RA, Piacentini M. Retinoids and the control growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *J Neurooncol.* 31:65-83,1997.
 4. Takada N, Isogai E, Kawamoto T, Nakanishi H, Todo S, Nakagawara A. Retinoic acid-induced apoptosis of the CHP134 neuroblastoma cell line is associated with nuclear accumulation of p53 and is rescued by the GDNF/Ret signal. *Med Pediatr Oncol.* 36:122-126, 2001.
 5. Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Melino G. The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis).*Eur J Cell Biol.* 54:246-254, 1991.
 6. Rikiishi T, Imaizumi M, Stauffer J, Iinuma K, Hayashi Y and Thiele CJ. Potentiation of RA-induced growth arrest or apoptosis of neuroblastoma cells by Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, at IC50 or lower concentrations. *Advances in neuroblastoma research Paris (France) 2002.6 (Poster)*
 7. Wu JM, DiPietrantonio AM, Hsieh TC. Mechanism of fenretinide (4-HPR)-induced cell death. *Apoptosis.* 6:377-388, 2001.
 8. Kalli KR, Devine KE, Cabot MC, Arnt CR, Heldebrant MP, Svingen PA, Erlichman C, Hartmann LC, Conover CA, Kaufmann SH. Heterogeneous role of caspase-8 in fenretinide-induced apoptosis in epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Mol Pharmacol.* 64:1434-1443, 2003.
 9. Miyazaki K, Asai N, Iwashita T, Taniguchi M, Isomura T, Funahashi H, Takagi H, Matsuyama M, Takahashi M. Tyrosine kinase activity of the ret proto-oncogene products in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 193:565-570, 1993.
 10. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of *MYCN*. *Nat Med.* 6:529-535, 2000.
 11. Tajiri T, Liu X, Thompson PM, Tanaka S, Suita S, Zhao H, Maris JM, Prendergast GC, Hogarty MD. Expression of a *MYCN*-interacting isoform of the tumor suppressor BIN1 is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res.* 9:3345-3355, 2003.
 12. Hogarty MD. The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with *MYCN* amplification. *Cancer Lett.* 197:173-179, 2003.

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato A, Imaizumi M, Chikaoka S, Niizuma H, Hoshi Y, Takeyama J, Fujii K, Nishio T, Watanabe M, Maesawa C, <u>Hayashi Y</u> , Iinuma K:	Acute renal failure due to leukemic cell infiltration followed by relapse at multiple extramedullary sites in a child with acute lymphoblastic leukemia.	Leuk Lymphoma.	45	825-828	2004.
Sato A, Imaizumi M, Hoshi Y, Rikiishi T, Fujii K, Kizaki M, Kagechika H, Kakizuka A, <u>Hayashi Y</u> , Iinuma K.:	Alteration in the cellular response to retinoic acid of a human acute promyelocytic leukemia cell line, UF-1, carrying a patient-derived mutant PML-RARalpha chimeric gene	Leuk Res.	28	959-967	2004
Lu L, Suzuki T, Yoshikawa Y, Murakami O, Miki Y, Moriya T, Bassett MH, Rainey WE, <u>Hayashi Y</u> , Sasano H.:	Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders.	J Clin Endocrinol Metab.	89	4113-4118	2004

神経芽細胞腫マススクリーニング研究班—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—に関する研究

分担研究者 福澤 正洋 大阪大学大学院医学系研究科小児発達医学（小児外科）教授
米田 光宏 大阪大学大学院医学系研究科小児発達医学（小児外科）助手

研究要旨

目的:神経芽腫マススクリーニング (MS) 発見症例を後方視的に検討し、MS 休止後に生じる臨床像の変化について考察する。
対象と方法:過去に経験した MS 例 100 例を対象とし、臨床経過と生物学的予後因子をもとに以下の如く分類した。
Group1: MS 休止後は臨床的に発見されないと予想される症例、Group2: MS 休止後も臨床的に発見されると予想される症例、Group3: Group1、2 に分類できない症例。
結果: Group1 に分類されたのは 53 例で、その内訳は無治療経過観察 (OB) 続行中の 16 例、OB の後に摘出したが予後不良因子を認めなかった 6 例、早期例で摘出したが予後不良因子を認めなかった 31 例であった。Group2 に分類されたのは 19 例で、明かな MYCN 増幅を認めたのは 3 例であった。このうちの 1 例と、治療拒否の stageIII の 1 例のみが腫瘍死している。StageIII、IVA、IVB の進行例が 11 例 (58%) を占めた。早期例では、OB 中に opsomyoclonus を発症した症例、OB 中に upstage (I → III) した 2 例、OB 後の摘出にて composite type の神経節芽腫と判明した症例、治療中に眼窩転移が出現した StageIVS 例が含まれている。Group 3 に分類されたのは 28 例で、このうち stageIII が 19 例を占めた。
考察および結論: MS 休止後に臨床的に発見される症例は MS 発見例の 19% (Group2 のみと仮定) から 47% (Group2 および 3 と仮定) に減少すると予想された。但し 1 歳前後に発見される症例の 60% 以上は進行例と予想され、これらに対する適切な治療法を考える必要がある。MS 休止後には、神経芽腫の死亡率や罹患率の変化のみならず、症例の質の変化を正確に観察する必要があり、全数登録を目指したシステムの完備が急務であると考えられる。

Summary

Objective: Recent reports indicated that neuroblastoma mass screening (MS) in late infancy did not show any clear benefit. The Japanese government decided to make a pause in MS program for 6-months old infants at the end of March 2004. In order to estimate clinical feature of neuroblastoma in Japan after the cessation of MS, we performed retrospective review of 100 MS patients.

Patients and methods: Between 1985 and 2003, 100 neuroblastomas were detected through MS and introduced to our hospitals. All patients except two cases are alive (overall survival 98%). "Wait and see" observation program (OB) has been started since 1994. Since then, of 29 cases entered this program, 16 cases are still under observation. The following patients were considered "undetectable" after the cessation of MS (Group 1); patients under observation, patients with localized tumor showing favorable biology. The following patients were considered "detectable" after the cessation of MS (Group 2); Dead patients, stage IV patients, clinically unfavorable patients (progression, metastasis or recurrence), presented clinical symptoms during OB. Others were classified into Group 3.

Results: 53 cases, 19 cases and 28 cases were classified into Group 1, 2 and 3, respectively. In Group 2, 11 of 19 (58%) cases were diagnosed as advanced stages (III, IVA, IVB). Even though in Group 1, 10% of the patients had major complications and they would not be observed after the cessation of MS.

Conclusion: At least half of the patients previously detected through MS will not be detected clinically after the cessation of MS. On the other hand, high incidence of the patients with unfavorable tumors will be detected clinically over one year of age and they may require intensive treatment.

A. 研究目的

本邦では2004年3月に神経芽腫マスキリーニング(MS)が休止されたことにより、神経芽腫の臨床像が変化することになる。この変化を詳細に検討することによりMSを後方視的に評価することが可能になると思われる。また、MSにより早期発見され恩恵を受けていたと思われる症例が、1歳前後に臨床発見されてくると予想される。これらの症例に対する新しい治療戦略を立てておくことが必要である。そこで過去に経験したMS発見症例を後方視的に検討し、MS休止後に生じる臨床像の変化について予想して考察することとした。研究班として対象とする日本小児外科学会悪性腫瘍登録および日本小児がん学会神経芽腫委員会の登録症例の検討を行う前に、本年度の研究では大阪大学ならびにその関連施設である大阪府立母子保健総合医療センターのMS発見例についてパイロット的に検討した。

B. 研究方法

平成15年までに大阪大学および大阪府立母子保健総合医療センターで経験したMS発見例のうち1年以上follow upしている100例を対象とした(表1)。両施設の症例の特徴として、Stage III以上の進行例が30%を占め、全国集計の23%に比し、進行例が多く集まる傾向にある。

表1 対象症例	
• 1985~2003年マスキリーニング発見例100例	
- Follow up: 1年以上	
- Stage I: 36例・II: 30例・IVS: 4例	
- Stage III: 23例・IVA: 2例・IVB: 5例→進行例30%	
• 1994年以降無治療経過観察開始	
- 29例中16例観察継続中	
• 死亡例2例(生存98%)	
- Stage III: 治療拒否	
- Stage III: 手術のみで再発(MYCN3倍増幅→FISHで著明な増幅が判明)	

また両施設では1994年より無治療経過観察を行っている¹³。対象症例のうち29例に適用し、うち16例が現在も観察継続中である。

死亡例は2例で、いずれもstage IIIの症例である。1例は宗教上の理由より両親が治療を拒否され、約2年半の経過で腫瘍死した症例である。もう1例は、手術のみで治療終了した後2カ月で多発性転移を来した症例である。術直後のサザンプロット法によるMYCN増幅は3倍であったが、死亡後にFISH法で再評価したところ、著明なMYCN増幅が判明した。

この100例の対象症例の臨床経過と予後因子を検討し、

これらの症例がMS休止後に臨床的に発見されるか否かを予測し、以下のように分類した。Group 1はMS休止後には臨床的に発見されないと予想される症例、Group 2はMS休止後であっても臨床的に発見されると予想される症例、Group 3は臨床的に発見されるかどうか判断できなかった症例とした。Group 1は無治療経過観察中の症例および摘出標本の生物学的予後因子が良好で、手術のみで再発なく生存中の症例とした。Group 2は腫瘍死症例、Stage IVAおよびIVBの進行症例、Stage IIIで明かなMYCN増幅を示した症例と術前化学療法に抵抗して増大傾向を示した症例。早期例のうち、治療経過中または無治療経過観察中に新たな転移巣が出現した症例、無治療経過観察中にopsomyoclonusを発症した症例、複数の予後不良因子を認めた症例とした。Group 1または2に分類し得なかった症例をGroup 3とした。

なお、本研究はすでに両施設から提出されている日本小児外科学会悪性腫瘍登録のデータ、ならびに日本小児がん学会神経芽腫委員会のデータを用いた。個人情報取り扱いに留意しつつ、既存のデータを利用して研究を行っており、患者の不利益は生じないと考えられる。

C. 研究結果

検討の結果、Group 1は53例、Group 2は19例、Group 3は28例となった。

Group 1の53例の内訳は、表2の通りである。無治療経過観察継続中の16例、無治療経過観察を中止して摘出したが生物学的にfavorableであった6例、無治療経過観察開始以前の早期例で摘出したが生物学的にfavorableであった31例である。

表2 Group1 - 53例 MS休止後発見されないと予想される症例	
• 無治療経過観察(OB)中	16例
• OBの後摘出→favorable biology	6例
• 早期例で摘出→favorable biology	31例

次にGroup 2の19例の内訳は、表3の通りである。まず、腫瘍死した2例。Stage IVAおよびIVBの進行7例。Stage IIIで明かなMYCN増幅を示した1例と術前化学療法に抵抗して増大傾向を示した1例。早期例は8例で、治療中に眼窩転移が出現したIVS例、無治療経過観察中に新た

な転移巣が出現した3症例、複数の予後不良因子を認めた5症例（重複あり）、経過観察中に opsomyoclonus を発症した1例が該当した。

表3 Group2 - 19例 MS休止後も発見されると予想される症例	
腫瘍死した症例	2例
進行例: stage IVAおよびIVB	7例
Stage III・MYCN増幅→化学療法後10年生存中1例	
治療抵抗例 (stage III, 治療中に増大)	1例
早期例	8例
– 治療中に眼窩転移が出現したStageIVS 例	1例
– OB 後に摘出→unfavorable biology	*5例
– OB 中にupstage(I→III)した症例	*2例
– OB 中にopsomyoclonus を発症	1例
(*:重複1例あり)	

Group 1 または 2 に分類し得なかった 28 症例を Group 3 とした (表 4)。症例の内容は、MYCN 増幅や 1p deletion を認めない Stage III の 19 症例、および stage I と II の一部の症例であった。

表4 Group3 - 28例 MS休止後臨床的に発見され得るか判定できなかった症例	
Stage III	19例
Stage II	8例
– 摘出→一部unfavorable biology	5例
– Biology不明(標本なし)	2例
– Dumb-bell症例	1例
Stage I→10年後にGNを発症	1例

D. 考察

神経芽腫 MS 発症例の多くは生物学的に予後良好で、金子らの生物学的予後因子の検討によると、MS 発症例の約 80% は予後良好とされる⁴⁵。今回、我々は無治療経過観察を含む臨床経過を中心とした検討を行い、MS が施行されなかったと仮定した場合、過去の MS 発症症例が臨床的に発見されたか否かを検討した。臨床的に発見されると予想された Group 2 の症例が 19% を占め、金子らの検討で生物学的に予後不良因子をもつとされた症例の割合 20% にほぼ合致する。

Group 別の病期分類を表 5 に示す。Group 2 のみが MS 休止後に発見されると仮定すると、19 例中 11 例、58% 以上は III 期以上の進行例で発見されることになる。また

group 2 および 3 が全例 MS 休止後に発見されると仮定すると、少なくとも 47 例中 30 例、64% 以上は進行例で発見されることになる。

表5 Group別病期分類							
	総数	I	II	IVS	III	IVA	IVB
Group 1	53	31	20	2	0	0	0
		53 (100%)			0 (0%)		
Group 2	19	4	2	2	4	2	5
		8 (42%)			11 (58%)		
Group 3	28	1	8	0	19	0	0
		9 (32%)			19 (68%)		

さらにこれら症例の生物学的特性を明らかにするため、Brodeur の提唱する神経芽腫 genetic model⁶ を用いて biology の面から検討を加えた (表 6)。まず Group 1 では

表6 Biology			
	Brodeur GM, 2003 Nature Reviews Cancer		
	MYCN増幅	Di or Tetraploid	Type
Group 1	0* / 29 (0%) *2例gain含む	4 / 31 (13%)	→ 1
Group 2	4** / 16 (25%) **1例増幅疑い含む	8 / 15 (53%)	→ 2B / 2A
Group 3	0* / 23 (0%) *2例gain含む	7/18(39%)	→ 1 / 2A

MYCN 増幅症例は存在しなかった。Diploid を示した症例の中には分化したために diploid と判定されたと考えられる症例も含まれており、Group 1 のほとんどの症例は Brodeur 分類の type1 で分化・退縮傾向をもつと考えられる。Group 2 では MYCN 増幅症例が 25%、1p deletion も 4 例に認められ、これらは type 2B に分類され予後不良であると考えられる。また diploid または tetraploid の症例が半数以上を占め、これらは type 2A に分類されると思われる。Group 3 では MYCN 増幅例はないものの、diploid または tetraploid の症例が 4 割程度存在し、type1 と 2A が混在していると思われた。Group 2 および Group 3 の一部、すなわち type 2A や 2B の症例は MS 休止により発見が遅れることになり、より進行した状態で発見されると予想される。したがって、かかる症例に対する治療戦略を準備しておく必要がある。特に、1 歳台に発見される stage III 症例をどう治療するのかは難しい。MS で発

見られていたと思われるような症例に強い治療を行う必要があるのか？それではどのように治療層別化を行うのかは問題である。時を同じくして、米国の Children's Oncology Group (COG) では、過去に行ってきた1歳（12カ月）を境界とした治療層別化を、1歳半（18カ月）に変更する新しい治療プロトコルが検討されているとのことである。実際嶋田分類や INPC 分類のリスク層別化は1歳半で行われてきた^{7,8}。この動きとも関連し、今後本邦でも1歳から1歳半の神経芽腫治療方針について再考を迫られることになる。

最後に MS 治療上の合併症の面から考察を加えた。表7に主な合併症を Group 別に示す。進行例が多く含まれる Group 2 および Group 3 では約3分の1の症例に合併症を認めている。これはある程度避け得ないものも含まれると思われるが、MS 休止により発見されなくなると思われる Group 1 の症例中、9%に腎萎縮を含む major な合併症を認めている。これらは MS がなければ生じなかったものである。MS の評価の一部として、MS 休止後に合併症の頻度、様式が変化することも今後観察、検討していく必要があると思われる。

表7 合併症	
• Group1 (n=53)	5例 (9%)
- 腎萎縮:2例	
- 腸閉塞、閉塞性黄疸、リドカイン中毒:各1例	
• Group2 (n=19)	6例 (32%)
- 腸閉塞:2例	
- 腸管運動障害、聴力障害、Opsomyoclonus、側彎:各1例	
• Group3 (n=28)	9例 (32%)
- 腎萎縮、脚長差、聴力障害:各2例(症例重複有り)	
- 腸閉塞、肝機能異常、乳糜腹水、膀胱直腸障害:各1例	

E. 結論

MS 休止後にはこれまでの MS 発見例のうち少なくとも約半数は発見されずに経過すると予想され、臨床的に発見される症例は、19～47%に減少すると予想された。

臨床的に発見される症例のうち、60%以上は III 期以上の

G. 研究発表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	40(2)	359-363	2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきものなし。

進行例として発見されることが予想され、これらに対する適切な治療法を準備する必要がある。

したがって MS 休止後には神経芽腫の死亡率や罹患率の変化のみならず、症例の質の変化や合併症の内容を正確に観察する必要があり、わが国の神経芽腫全数登録を目指したシステムの完備も急務であると考えます。

F. 参考文献

1. 米田光宏, 井村賢治, 八木誠: 当センターにおける神経芽腫マスキリーニング症例の治療方針 自然退縮を期待した無治療経過観察の試み. 小児がん 33:197-201, 1996
2. Yoneda A, Oue T, Imura K, et al: Observation of untreated patients with neuroblastoma detected by mass screening: a "wait and see" pilot study. Med Pediatr Oncol 36:160-162., 2001
3. 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 40:359-363, 2005
4. Kaneko Y, Kanda N, Maseki N, et al: Current urinary mass screening for catecholamine metabolites at 6 months of age may be detecting only a small portion of high-risk neuroblastomas: a chromosome and N-myc amplification study. J Clin Oncol 8:2005-2013, 1990
5. 金子安比古, 武田修: マスキリーニングによりハイリスク神経芽腫は発見されるか マスキリーニング陽性腫瘍と陰性腫瘍の生物学的特性, 医学のあゆみ 164: 634-637, 1993
6. Brodeur GM: Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. Nat Rev Cancer 3:203-216, 2003
7. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). Cancer 86:364-372, 1999
8. 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 92:2451-2461, 2001

神経芽細胞腫マスキリーニングの適切な施行時期、およびマスキリーニングの有効性検証のための前向き介入研究実施要綱の検討

分担研究者 赤澤 宏平 新潟大学医歯学総合病院医療情報部長
鳥谷部 真一 同副部長

研究要旨

乳児期のマスキリーニングによって神経芽細胞腫の累積罹患率は倍増するが、その中には非進行例及び自然退縮例が含まれる。一方、1歳以降に発見される進行例を減少させるかどうかは明らかでない。マスキリーニングによって進行例を効率良く発見するためには、施行時期を再検討する必要がある。今回、過去の神経芽細胞腫登録症例を種々の観点から再解析し、適切なマスキリーニング施行時期について検討した。その結果、16ヶ月以降にマスキリーニングを施行するのが適切であると考えられた。この結果を踏まえて、18ヶ月でマスキリーニングを行うことを想定し、マスキリーニングの有効性を検証するための前向き介入試験実施要項を作成した。

Summary

Several studies on neuroblastoma screening of infants have resulted in substantial increase in the number of the patients with non-advanced neuroblastoma without decreasing the incidence of advanced disease. Some of these non-advanced neuroblastomas may undergo spontaneous regression. An option to reduce the detection of these non-advanced diseases could be to change the timing of the screening. We retrospectively reviewed registered neuroblastoma patients and analyzed the most suitable timing for the screening from various angles. In consequence, we found that screening over 16 months of age was the optimum timing. Based on the results, we proposed the new protocol for prospective intervention study whether neuroblastoma screening at 18 months of age decrease the incidence of advanced disease and the rate of death due to neuroblastoma.

A. 目的

かつて行われていた生後6ヶ月の神経芽細胞腫マスキリーニングでは、マスキリーニング発見例を主体とする1歳未満例が激増した一方で、1歳以降発見例および進行例の発見には有意の減少はみられなかった。1歳未満発見例には自然退縮例を含むことから、治療の必要がない非進行例の発見を減らし、進行例のみを発見することが理想である。マスキリーニングで進行例を効率よく発見する方法としては、まずマスキリーニング施行時期を遅らせることが考えられる。しかし、マスキリーニングの適切な施行時期に関する報告はこれまでなされていない。今回、過去の神経芽細胞腫登録症例を様々な角度から再検討し、適切なマスキリーニングの施行時期について検討した。

マスキリーニングの有効性を検証するためには、ドイツとカナダで行われた前向き介入試験に匹敵するデザインで研究を行う必要がある。前記の検討で設定した新しい実施時期でマスキリーニングを行うことを想定して、前向き介入試

験の実施要項を作成した。

B. 研究方法

過去の神経芽細胞腫登録症例を対象として、種々の解析を行い、マスキリーニングに適切な時期を設定する。

1) マスキリーニングが与える影響を避けるために、マスキリーニング事業開始前の登録症例で検討する。非進行例の発見が減少し、進行例の発見が増加する時期をマスキリーニング時期とする。

2) マスキリーニング施行後の登録症例を対象とする。マスキリーニング陰性で、その後に神経芽細胞腫が発見された例を対象とする。これらの例はマスキリーニングの施行時期が早すぎたため、マスキリーニングで発見できず、時期が遅ければマスキリーニングで発見できた可能性がある。マスキリーニング陰性で発見時にVMA/HVAが高値であった例の発見が急激に増える時期をマスキリーニング施行時期とする。

3) 同じ生物学的特徴を持った神経芽細胞腫（N-myc 増幅を伴う神経芽細胞腫症例）は同じ時期に体内で発生し、同じ速度で増殖すると仮定する。発見時の VMA/HVA 値から標準的な月齢-VMA/HVA 回帰曲線を作成する。VMA/HVA 値が正常値を超える時期をマス施行時期とする。

4) 予後良好の神経芽細胞腫（N-myc 非増幅例）には自然退縮例が数多く含まれ、VMA/HVA が時間経過とともに低下するもの仮定する。VMA/HVA が低下した頃にマスキリーニングを行えば、予後良好群の発見を減らせる可能性がある。N-myc 非増幅例において、VMA/HVA が低下する時期からマス施行時期を設定する。

以上の検討から適切な神経芽細胞腫マスキリーニングの時期を設定する。その結果を踏まえて、マスキリーニングの有効性を検証するための前向き介入試験実施要項を作成する。

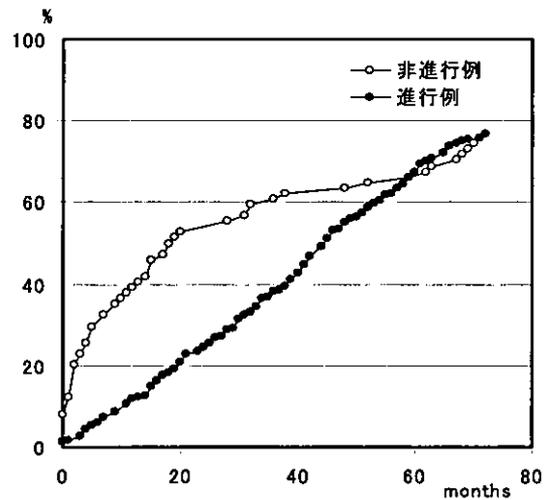
C. 研究結果

1) 非進行例と進行例の発見月齢のずれに基づく解析

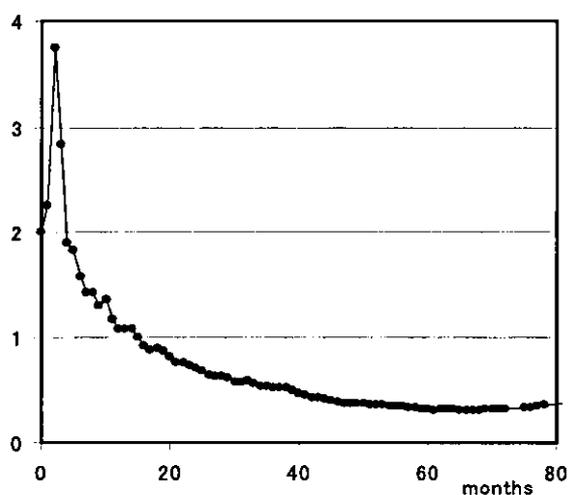
全国的な神経芽細胞腫マスキリーニング（マス）事業が始まる以前の登録症例は 800 例あった。そのうち、パイロット的に施行されたマスキリーニングも受けていない例が 562 例あった。562 例のうち、発見時年齢と病期がはっきりしていたのは 517 例で、そのうち発見時に尿 VMA/HVA が高値であった症例は 301 例（53.6%）だった。

病期	VMA/HVA	
	陽性	陰性
非進行例	74	103
I	26	66
II	24	30
IVS	24	7
進行例	227	113
III	41	35
IVA	149	51
IVB	37	27
合計	301	216

マス事業開始前・VMA/HVA高値例の月齢別累積比率



マス開始前・VMA/HVA高値例中の非進行例/進行例

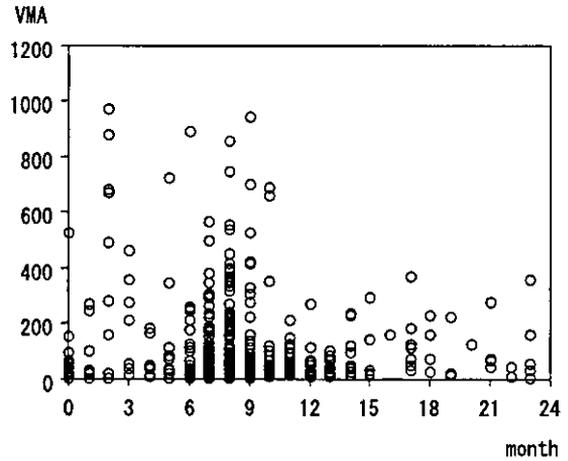
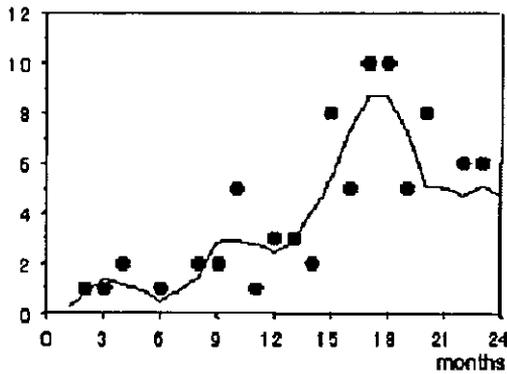


進行例と非進行例の発症数の比は月齢とともに低下し、16ヶ月以降で1以下となった。

2) マスキリーニング施行時に VMA/HVA 陰性で後に発見された時には陽性になった症例の解析

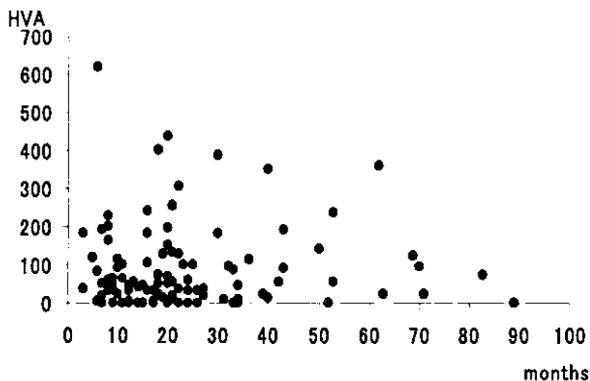
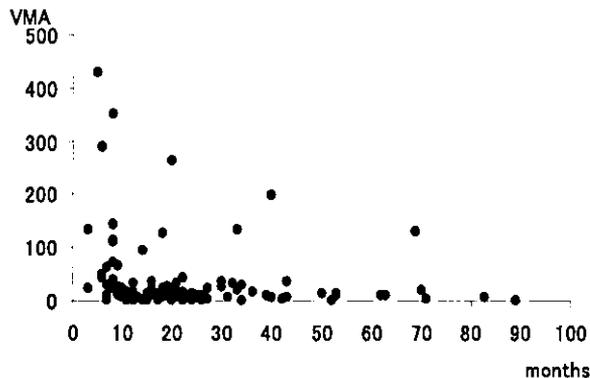
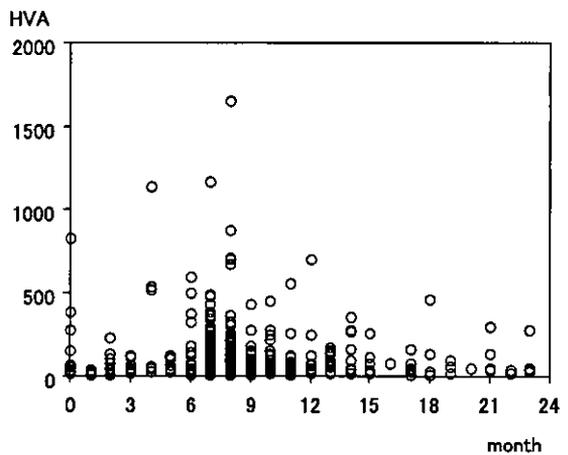
登録症例 2494 例中、マスキリーニング施行時に VMA/HVA が陰性であった症例は 298 例、そのうち発見時に VMA/HVA が測定されていたのは 288 例だった。この 288 例のうち、209 例（72.6%）が後日神経芽細胞腫を発見された際に VMA/HVA が高値であった。下図に示すように、マスキリーニング陰性で発見時 VMA/HVA 陽性例は 15ヶ月以降に発症が急増した。

齢と発見時 VMA/HVA の関係は下図に示すとおりであった。
N-myc 増幅がない神経芽細胞腫では 15 ヶ月以降に VMA/
HVA が低下する傾向が認められた。



3) N-myc 増幅陽性症例における VMA/HVA 上昇速度の解析

登録症例のうち腫瘍の N-myc 増幅を調べてある症例は 924 例だった。そのうち、N-myc 増幅が認められた症例は 107 例 (11.6%)、N-myc 増幅が認められなかった症例は 817 例 (88.4%) だった。N-myc 増幅が認められた症例における発見時の VMA/HVA の値は下図の通りで、尿 HVA は 1 歳を越えるといったん低下するが、15 ヶ月を越えると再上昇していた。



4) N-myc 非増幅例で VMA/HVA が低下する時期の解析

N-myc 増幅がみられなかった 817 例のうち、発見時に VMA/HVA を測定していたのは 810 例だった。発見時の月

D. 考察および神経芽細胞腫マスキリングの有効性を検証するための前向き介入試験実施要綱 (案) の作成

マスキリング事業開始前の登録症例での検討結果からは、16 ヶ月を越えると非進行例よりも進行例の発見が多くなることが明らかになった。この結果からは 16 ヶ月以降のマスキリングが望ましいと考えられた。次に、マスキリング施行後の登録症例で、マスキリング施行時には発見できず、後日発見された際に VMA/HVA が高値であった例は 15 ヶ月以降に頻発していた。したがって 15 ヶ月以降にマスキリングを施行していれば、これらの例を発見できていた可能性がある。第三に、N-myc 増幅例を伴う例の発見時 VMA/HVA 値の検討からは、尿 VMA が 15 ヶ月以降に上昇していた。したがって、15 ヶ月以降にマスキリングを行えば、N-myc 陽性の予後不良群をより効率的に発見できる可能性がある。第四に、N-myc 陰性の神経芽細胞腫例の検討からは 15 ヶ月以降

に発見時のVMA/HVAが低下する傾向がみられた。したがって、15ヶ月以降にマスキリーニングを行えば、N-myc陰性の予後良好群の発見を減らすことが可能かもしれない。

以上の解析結果からはマスキリーニングの時期を15ないし16ヶ月以降に設定することにより、自然退縮する可能性がある非進行例の発見を減らし、真に治療が必要な進行例の発見を増加させる可能性があることが示唆された。

続いて、上記の結果に基づき、マスキリーニング実施時期を18ヶ月とした場合、前向き介入試験をどう行うかについて実施要綱案を作成した。

【マスキリーニングの有効性検証のための前向き介入研究実施要綱（案）】

1. 目的

神経芽細胞腫マスキリーニング（MS）の有効性を、1歳6ヶ月以上の進行ステージ症例の発症率と死亡率を評価尺度として評価する。

2. 研究デザイン

前向き介入試験で行い、MS実施群に対して、比較可能な未実施群を設定し、両群をフォローアップ調査する。

3. 対象

MS実施群：京都府、大阪府、札幌市、新潟県、川崎市、静岡県（検討中）、熊本県（検討中）。

MS未実施群：上述以外の自治体の中で、1)本プロジェクトに協力ができ、2)過去の悪性腫瘍登録の実績から登録率が高く、3)人口流出入が比較的少ない、という条件を満たす自治体とする。

4. 研究期間

症例集積期間を平成18年4月から平成21年3月までの3年間とし、フォローアップ期間は平成26年3月までとする。

5. 症例数

MS実施群：3年間での約60万人

MS未実施群：60万人

6. MSの検査法ならびに実施時期

1)検査法：HPLCで行う。同一検体の検査値を提供してもらい計測誤差を評価する。

2)検査時期：18ヶ月

7. データセンター

1) データセンターの設置

①JNBGSに対して、以下の作業が可能なセンターの設置と稼働を要請する。平成18年度からのスタディをめざしていること、既に京都、大阪では1歳6ヶ月のマスキリーニングが開始されていることから、可及的すみやかな稼働を要請する。

②小児がん学会、小児外科学会の登録システムと連携し、整合性のある登録事業を展開する。

③全数登録から、MS受診の有無、MSの結果（陽性または陰性）、対照地域からの発症例のデータ、フォローアップデータを検索できるシステムとする。

2) データセンターの仕事内容

①小児神経芽腫症例の登録

②検査事業主体のMS受検者リストと神経芽細胞腫症例との照合

③小児慢性特定疾患（悪性新生物）医療意見書におけるMS受検情報の確認

④住民票照会での転居の確認

⑤人口動態統計（MS実施自治体とMS未実施自治体の新生児数）の収集ならびに死亡票の調査

⑥ステージ分類・組織学的診断結果のレビュー

⑦その他、データ収集、集計に関わる業務

3)MS受検リストの電子媒体での収集

検査事業主体や検査センターの協力を得て、MS受検者リストを電子媒体で収集する。

4)登録症例がMS受検者かどうかの確認作業

①MS実施月齢（18ヶ月）前の発症の場合、その症例はMS受検なしである。

②MS実施月齢後の発症の場合、自治体すべてのMS受検者リストとマッチングを図る。キー項目は氏名、性別、生年月日である。

③②でのマッチング件数が0の場合、MS未受検者とする。

④②でのマッチング件数が2件以上ある場合、登録書の内容を精査の上、住所等でMS受検者であることを特定する。

⑤登録書で「MS受検あり」のある場合には、その記載の信頼性を精査した上で採用する。

5)神経芽細胞腫の死亡の同定

JNBGSのデータセンターが以下で収集される情報に基づき、死亡患者氏名、性別、死亡日、死因等のデータを収

集する。

- ①小児外科学会
- ②小児がん学会
- ③小児慢性特定疾患の追跡
- ④死亡票の閲覧

8. 検査の同意取得

インフォームドコンセントで同意が得られた親から検体を提出してもらう。同意の取得方法は各自治体に任せる。

9. MS 未実施群へのインフォームドコンセント

母子手帳などに小児神経芽腫の説明書を挿入し、MS 実施群と同程度の知識を持ってもらう。

10. 全国の病院での症例登録の義務化（全数登録システムの構築）

小児神経芽腫の確定診断をつけた医師は、小児慢性特定疾患（悪性新生物）医療意見書を記載する際に、マスキューニングを受診したか否かも同時に記載する。

11. 収集されるべきデータ項目

- ①月齢、性別、生年月日、現住所などの基本情報
- ②INSS 基準でのステージ分類、原発部位、病理分類
- ③組織型、腫瘍染色体、N-myc、DNAploidy、trk 遺伝子、Ha-ras 遺伝子発現
- ④血清フェリチン、カテコラミン代謝、LDH、NSE
- ⑤尿 VMA、HVA
- ⑤治療プロトコールに基づく生物学的データ

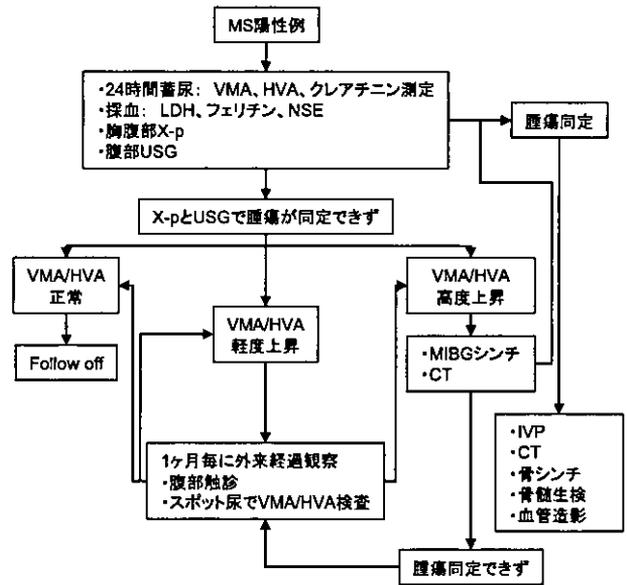
12. 統計学的な解析

- 1) 年齢別人・年
- 2) SIR とその 95% 信頼区間（日本全体での 1 歳における罹患率を基準とする）
- 3) 受診率
- 4) フォローアップ期間
- 5) フォローアップ率

13. 発見例の治療指針

- 1) MS 陽性例の診断は、限られた施設と医師とで行う。
- 2) 全例に治療介入を行い、無治療経過観察は行わない。診断前にこのことのインフォームドコンセントを得ておく。
- 3) 治療プロトコールは標準化することがのぞましい。
- 4) 外科治療、化学療法、放射線療法など、治療方法の詳細についてもデータを取る。

14. 発見例の診断手順



E. 結論

マスキューニングにより非進行例の発見を減らし、進行例を効率よく発見するために、まず考えられる方法はマスキューニングの時期を遅らせることである。しかし、いつ施行するのが適切かについて検討した報告はこれまでなかった。今回、過去の登録症例を様々な観点から後方視的に検討することにより、神経芽細胞腫マスキューニングの施行時期を遅らせるとしたら、15～16ヶ月以降が適当であることが示唆された。

この結果に基づき18ヶ月で神経芽細胞腫のマスキューニングを施行することを想定して、マスキューニングの有効性を検証するための前向き介入試験の実施要綱を作成した。

F. 参考文献

- 1) Schilling FH, Spix C, Berthold F et al. Children may not benefit from neuroblastoma screening at 1 year of age. Updated results of the population based controlled trial in Germany. Cancer Lett 197:19-28,2003.
- 2) Schilling FH, Spix C, Berthold F et al. Neuroblastoma screening at one year of age. N Engl J Med 346:1047-53,2002.
- 3) Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. N Engl J Med 346:1041-6,2002.
- 4) Woods WG, Tuchman M, Robison LL et al. Screening for neuroblastoma is ineffective in reducing the

incidence of unfavorable advanced stage disease in older children. Eur J Cancer 33:2106-12,1997.

- 5) Woods WG, Tuchman M, Robison LL et al. A population-based study of the usefulness of screening for neuroblastoma. Lancet 348:1682-7,1996.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akazawa K, Kameyama S, Mase R et al. MPEG digital compression and analogue videotape: a comparison of moving images and electroencephalogram data in epileptic patients. Med Inform Internet Med 29:57-63,2004.
- 2) Abe R, Shioiri T, Nishimura A, Nushida H, Ueno Y, Kojima M, Kitamura H, Akazawa K, Someya T. Economic slump and suicide method: preliminary study in Kobe. Psychiatry Clin Neurosci 58:213-6,2004.
- 3) Shimada Y, Tai H, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K. Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. J Clin Periodontol 31:463-9,2004.
- 4) Galicia JC, Tai H, Komatsu Y, Shimada Y, Akazawa K, Yoshie H. Polymorphisms in the IL-6 receptor (IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced. Genes Immun 5:513-6,2004.
- 5) Tsunoda K, Shirai Y, Wakai T, Yokoyama N, Akazawa K, Hatakeyama K. Increased risk of cholelithiasis after esophagectomy. J Hepatobiliary Pancreat Surg 11:319-23,2004.
- 6) Aihara R, Mochiki E, Nakabayashi T, Akazawa K, Asao T, Kuwano H. Clinical significance of mucin phenotype, beta-catenin and matrix metalloproteinase 7 in early undifferentiated gastric carcinoma. Br J Surg, 2004.
- 7) Motonaga A, Akazawa K, Takahashi S et al. A method for displaying two images on a screen in distance medical education. Comput Methods Programs Biomed 73:183-8,2004.
- 8) Toyabe S, Kaneko U, Uchiyama M. Decreased DAP12 expression in natural killer lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus is associated with increased transcript mutations J Autoimmun 23(4):371-378,2004
- 9) Hasegawa T, Suzuki E, Koya T, Akazawa K, Sakagami T,

Toyabe S et al. Analysis of Drug Compliance in Adult Patients with Bronchial Asthma. General Medicine 5:7-11,2004

- 10) Ikezumi Y, Kanno K, Karasawa T, Han GD, Ito Y, Koike H, Toyabe S et al. The role of lymphocytes in the experimental progressive glomerulonephritis. Kid Int 66: 1036-48, 2004.
 - 11) Kaidu M, Toyabe S, Oda J, Okamoto K, Ozaki T, Shiina M, Sasai K, Akazawa K. Development and evaluation of a teleradiology and videoconferencing system. J Telemed Telecare 10: 214-8, 2004.
 - 12) Yamakawa T, Toyabe S, Cao P, Akazawa K. Web-based delivery of medical multimedia contents using an MPEG-4 system. Comput Meth Prog Bio 75(3): 259-264, 2004.
 - 13) 園部真奈美, 瀬賀睦美, 鈴木さおり, 久住文恵, 堀田哲夫, 赤澤宏平. 砕石位の支持方法に着目した静脈血流速度と体圧の計量的比較. 日本手術医学会誌 25 : 332-334, 2004.
 - 14) 海津元樹, 小田純一, 椎名真, 赤澤宏平, 鳥谷部真一, 笹井啓資, 岡本浩一郎, 尾崎利郎. ネットワークと情報技術が創出する新潟県での遠隔医療の取り組み, 新潟県厚生連医誌 13 : 42-43, 2004
 - 15) 富所直子, 高橋泰子, 関口由紀子, 瀬賀裕子, 曹鳳宇, 鳥谷部真一, 赤澤宏平. 混合病棟と一般病棟の看護の質の差異を評価する. 看護管理 14(4) : 303-307, 2004.
- ### 2. 学会発表
- 1) Oda J, Seki H, Kunii R, Takahashi O, Kaidu M, Akazawa K. Clinical experience of two distinct teleradiology systems in Niigata Prefecture. The 11th International Symposium of the Japan-Russia Medical Exchange, Niigata, 2004.
 - 2) 鳥谷部真一, 赤澤宏平, 海津元樹, 小田純一. 新潟県における遠隔医療支援システムの稼働経験：問題点と今後の展開. 第24回医療情報学連合大会, 名古屋, 2004.
 - 3) 曹鳳宇, 鳥谷部真一, 倉島幸子, 岡田正彦, 赤澤宏平. 病院の実データに基づく Activity Based Costing (ABC) コスト計算方法の検証. 第24回医療情報学連合大会名古屋, 2004.
 - 4) 鳥谷部真一, 須藤道子, 佐々木智子, 番場朝子, 赤澤宏平. 混合病棟化に対応した病棟指示の標準化と共通指示票の作成. 第30回診療録管理学会, 千葉, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 赤澤宏平, 齊藤昌也. 匿名化プログラムおよび匿名化方法 (特許 2002-347135, 出願中)
- 2) 松戸隆之, 赤澤宏平, 鳥谷部真一. Poisson ノイズを含む画像からノイズを除去するアルゴリズムの開発 (特許 2005-003130)

多標的モデルによる神経芽細胞腫罹患過程に関する 数理モデルの構築

分担研究者 大瀧 慈 広島大学原爆放射線医科学研究所計量生物研究分野教授

研究要旨

小児神経芽細胞腫患者データに基づく後ろ向き研究として、遺伝子を標的とした多標的モデルを構築し、細胞数の動態に関するモンテカルロ数値実験により罹患年齢分布の説明を試みた。その結果、受精卵の段階で「正常細胞」であった子供の場合は神経芽腫に罹患することはほとんど無いこと、それが「悪性細胞」であった場合は出生に至り得ないこと、そして、神経芽細胞腫に罹患する場合は受精卵の段階で抑制遺伝子少なくとも片方が機能不全になっていること、また、生後間もない時点で多発する症例はそのほとんどが良性腫瘍であり、腫瘍遺伝子の変異は未発生であり正常な分化へのスイッチ機能が損なわれている状況であることが示唆された。

Summary

Neuroblastoma is biological, genetic, morphological heterogeneous tumor and demonstrates favorable or unfavorable outcomes. However, it has not been well-known how many subgroups exist in neuroblastoma and how is natural history of each subgroup. To evaluate the heterogeneous subgroups of human neuroblastoma, we developed a mathematical model for process of neuroblastoma using "target" theory in molecular biology, where we hypothesized three target genes for neuroblastoma as follows: one pair of tumor suppressor genes, one oncogene, and switch gene to differentiation. We performed Monte Carlo simulation study for induction of neuroblastoma, which revealed that few neuroblastoma cases are expected when initial cell is in normal stage. Favorable tumor consists of cells losing the switch function for normal differentiation. This proposed model could qualitatively explain favorable-unfavorable distribution of neuroblastoma.

A. 研究目的

神経芽細胞腫は生物学的にも遺伝的にも形態的にも異なる複数のタイプの腫瘍の総称でありその予後に関して、悪いものと良いものに大別される。しかしながら、幾つの群に類別されるのか、また、それらの群ごとの病理学的な自然史が如何なるものなのかといったことについては未だよく分かっていない。日本では、過去20年にわたり生後6ヶ月の乳児を対象として神経芽細胞腫の集団検診が実施されたが、その結果異常が検出された大部分の症例が自然退縮性、あるいは分化する予後の良い腫瘍であることが判明した。

我々は、予後不良な腫瘍と良好な腫瘍をできるだけ早期に識別することを究極の目的として、神経芽細胞腫の発生機序について分子生物学的な多標的仮説の適用による数理モデルの構築を行うこととした。

B. 研究方法

本研究では、1985年から1995年の期間に日本全国で診断された神経芽細胞腫患者2493名（そのうちマススクリーニングにより検出された患者は1750名）のデータを資料とした。

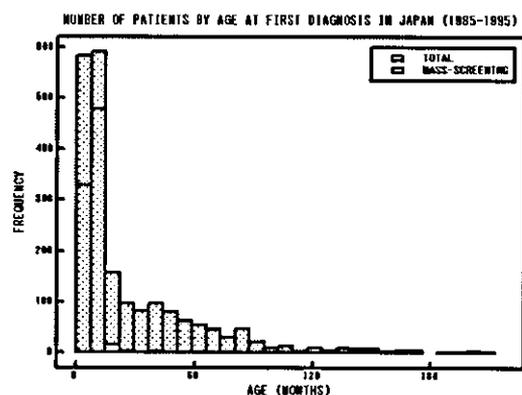


図1. 神経芽細胞腫患者の初診時年齢分布
(日本全国、1985年～1995年)

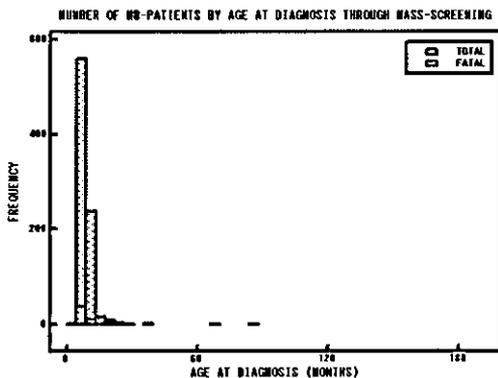


図2. マスキリングにより診断された神経芽細胞腫の年齢分布（日本全国、1985～1995年）

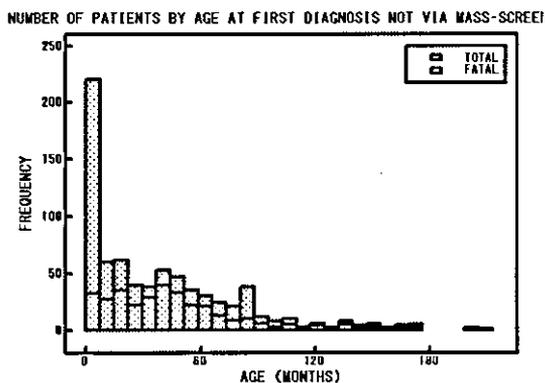


図3. マスキリング以外で診断された神経芽細胞腫の初診時年齢の分布（日本全国、1985年～1995年）

図1～図3に示すような神経芽細胞腫の初診時年齢の分布およびその年齢別予後状況を頼りに、分子生物学的な多標的仮説に基づいて疾患の発生機序に関する数理モデルを構築した。その多標的仮説では、神経芽腫の発生には1対の癌抑制遺伝子、1個の癌遺伝子および1個の分化制御遺伝子が関わっていることを想定している。（図4参照）

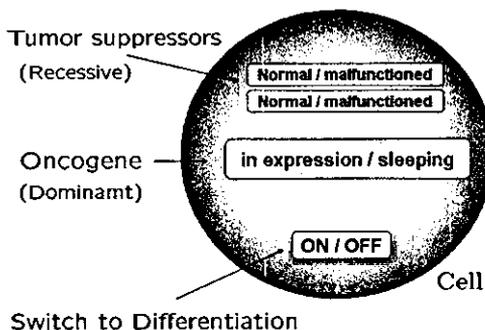


図4. 神経芽細胞腫発生に関わる標的遺伝子

疾患発生の必要条件としては、癌遺伝子の発現と抑制遺

伝子の機能不全である。さらに、癌遺伝子が発現していない状況下において分化制御遺伝子が正常に機能している神経芽細胞はある一定の分裂回数以内に神経細胞に分化し、それ以上分裂しない状態になることを仮定した（本研究では、計算機の能力上の制約により細胞分裂の最大回数を46とした。）また、1アレルの抑制遺伝子の機能不全、癌遺伝子の発現および分化制御遺伝子の機能不全の発生頻度について、それぞれ1世代時間（細胞分裂から次の細胞分裂までの時間）当りの値を母数として扱った。

受精卵から胚の生成および胎児の成長、さらに出生に至る状況を、細胞の増殖と分化の繰り返しとして見なし、確率過程の1種である分岐過程により定式化した。図5に、正常細胞から神経芽細胞腫の元となる悪性細胞への変異の過程を模式的に示す。図中で、N0は正常細胞を、S1とS2はそれぞれ片側および両側の癌抑制遺伝子アレルが機能不全になった細胞を、B0、B1およびB2は何れも分化制御遺伝子のスイッチが常にOFFになってしまった細胞を意味し、その番号の0,1,2は、それぞれ機能不全になった癌抑制遺伝子の個数を表している。

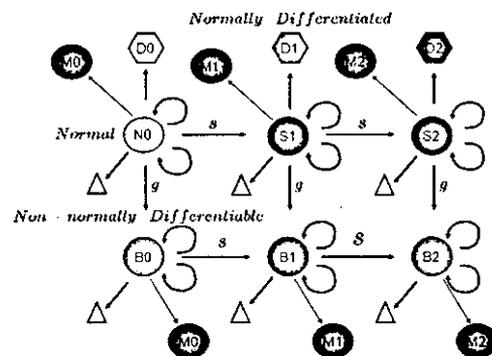


図5. 神経芽細胞腫の発生における細胞の変異過程

また、M0、M1およびM2は何れも癌遺伝子が発現している細胞を意味し、その番号の0,1および2は、機能不全になった癌抑制遺伝子の個数を示す。さらに、D0,D1およびD2は、分化した神経節細胞を意味し、その番号は機能不全になった癌抑制遺伝子の個数を示す。△は細胞死を意味する。なお、sは癌抑制遺伝子の機能不全の発生頻度に関わる母数であり、gは分化制御遺伝子のスイッチがOFFになってしまう事象の発生頻度に関わる母数である。

次に細胞の変異の推移過程を示す。図6は第j世代において分裂回数が限界に達していない正常な細胞N(j)、分化制御遺伝子のスイッチがOFFになってしまった細胞B0(j)および分化している細胞D0(j)が次世代（第j+1世代）に移りうる全ての状態を示している。例えば、N(j+1)とは、j+1世代も細胞が正常な（何も変異を起こしていない）状

態にあることを、 $D_0(j+1)$ は、 $j+1$ 世代では（神経細胞に）分化していることを、 $S_1(j+1)$ は癌抑制遺伝子の 1 個が機能不全になることを、 $B_0(j+1)$ は分化制御遺伝子のスイッチが ON にならない状態になることを、さらに、 $M_0(j+1)$ は癌遺伝子が発現することを意味している。図中の $\times 2$ というマークは、細胞分裂により次世代における細胞数が 2 個に増殖することを示しており、 $\times 1$ は、細胞分裂が起こらない（その意味では、世代は更新しない）ことを意味する。

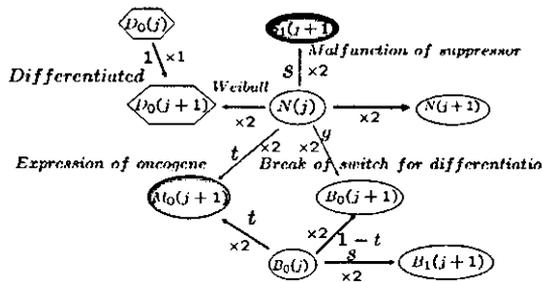


図 6. 分裂回数が限界に達していない状態で癌抑制遺伝子に損傷がない神経芽細胞からの可能性のある次世代の細胞への推移過程

なお、これらの推移のうち時間依存性のあるものは、 $N(j)$ から $D_0(j+1)$ への推移（ワイブル分布を仮定）のみである。

同様に、図 7 は第 j 世代において分裂回数が限界に達していない状態で癌抑制遺伝子の 1 個が機能不全になっている細胞 $S_1(j)$ 、 $B_1(j)$ および $D_1(j)$ が次世代に移りうる全ての状態を示している。

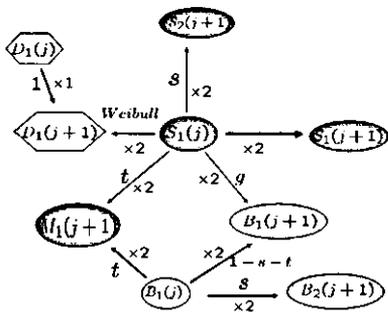


図 7. 分裂回数が限界に達していない段階にある神経芽細胞からの可能性のある次世代の細胞への推移過程

また、図 8 は第 j 世代において分裂回数が限界に達していない状態で癌抑制遺伝子の 2 個とも機能不全になっている細胞 $S_2(j)$ 、 $B_2(j)$ および $D_2(j)$ が次世代に移りうる全ての状態を示している。

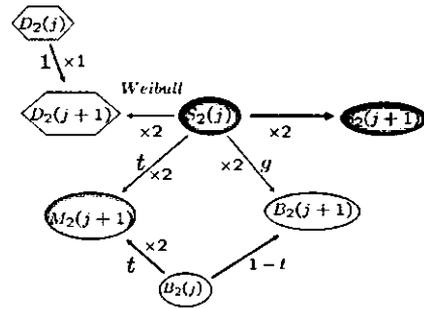


図 8. 分裂回数が限界に達していない段階にある神経芽細胞からの可能性のある次世代の細胞への推移過程

図 9 は、第 j 世代において既に癌遺伝子が発現している細胞 ($M_0(j)$, $M_1(j)$ および $M_2(j)$) が次世代に移りうる全ての状態を示している。

これらの細胞では、世代番号にかかわらず細胞死を起ささない限り細胞分裂が行われるものとしている。

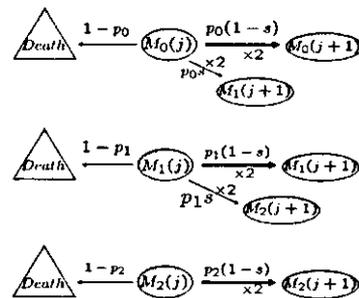


図 9. 癌遺伝子が発現している神経芽細胞からの可能性のある次世代の細胞への推移過程

図 10 は第 j 世代において分裂回数が限界に達した状況で、未だ癌遺伝子が発現していない細胞 ($N(j)$ 、 $S_0(j)$ および $S_2(j)$) が次世代に移りうる全ての状態を示している。

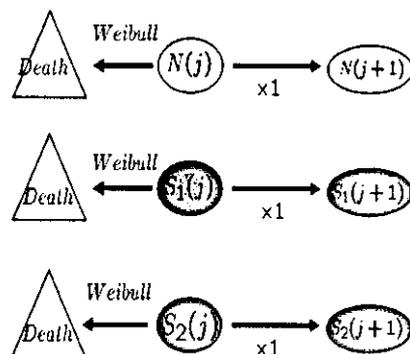


図 10. 分裂回数が限界に達した神経芽細胞からの可能性のある次世代の細胞への推移過程

上記のモデルに基づいて擬似乱数を用いたモンテカルロ法により、神経芽腫発生に関するコンピュータシミュレーション実験を行った。表1に細胞分裂の最大回数と分化制御遺伝子、癌抑制遺伝子の機能不全および癌遺伝子の発現の頻度に関する母数の値として使用した例を示す。

表1. モンテカルロ法で使用した母数の値の例

Name of Parameter	Value	Explanation
K	46	Maximum number of proliferations for undifferentiated non malignant cell
g	1.0xe-7	Incidence rate of break of switch to differentiation
s	1.0xe-7	Incidence rate of malfunction of tumor suppressor
t	1.0xe-7	Incidence rate of expression of oncogene
p0	0.52	Proliferation rate of malignant cell (M0)
p1	0.52	Proliferation rate of malignant cell (M1)
p2	0.80	Proliferation rate of malignant cell (M2)

表2. モンテカルロ法で使用したその他の母数の値の例

Name of Parameter	Value	Explanation
α_1	2.0	Power parameter for occurrence of differentiation
μ_1	30.0 (g.t.)	Median generation time of occurrence of differentiation
α_2	3.0	Power parameter for cell death
μ_2	80.0 (g.t.)	Median generation time of cell death

$$S(t|\alpha, \mu) = e^{-\left(\frac{t}{\mu}\right)^\alpha}, \quad t > 0.$$

表2は、細胞分化と細胞死の発生に関するワイブル分布関連の母数の値について使用した例を示す。

年齢別の神経芽腫罹患（神経芽細胞の総計が初めて8000万を超過する時点）を神経芽腫の罹患時年齢と定義し、各種母数の値を変化させながら、その年齢別悪性度別罹患患者数の分布を求め、現実の観察データとの比較を行った。

(倫理面への配慮)

患者データについては個人識別に関わる情報を除去したものをを用いた。

C. 研究結果

まず、モンテカルロ実験により得られた個々の個体における神経芽細胞腫関連の細胞の動態例を紹介する。図1は、

1個の受精卵が分裂を繰り返し次第に分化して神経細胞が出現し、結局のところ変異した細胞が出現しなかった例を示す。受精卵から出発して第40世代時間後（ほぼ出生時に対応するものとみなされる時点）にはほとんど全ての細胞が神経節細胞に分化し細胞数が一定となっている。いわゆる正常なケースの代表的な細胞動態が示されている。

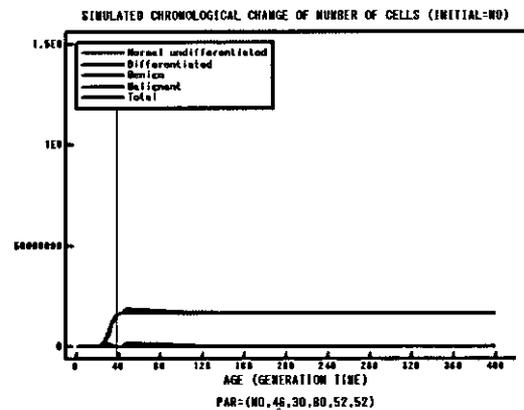


図11. 正常な個体における細胞数の経時変化の例

図12は、出生直後に細胞数が異常に多くなり、臨床診断の対象となりうる症例の場合を示す。この場合は、出生後しばらくすると時間と共に細胞数が暫減し結果的に腫瘍が退宿していく良性腫瘍患者の場合における細胞数の経時変化が示されている。

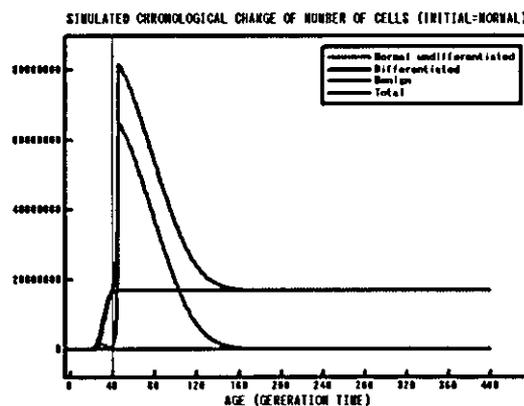


図12. 出生直後に良性腫瘍が現れるものの自然退宿して消滅してしまう個体における細胞数の経時変化の例

次に、途中までは図12の場合と似たような経過を辿るものの、後になって再び細胞数が異常増大してしまう例を図13に示す。

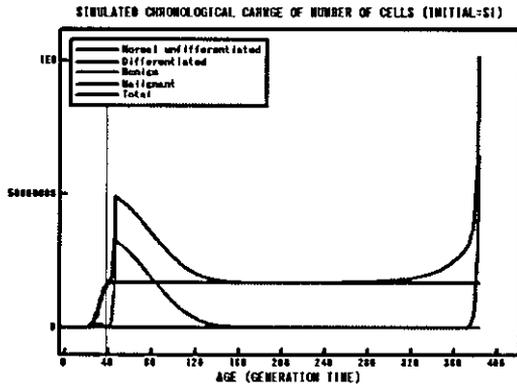


図 13. 出生直後に良性腫瘍が出現するがその後一端退宿するが、さらにその後悪性腫瘍が出現する例

図 14 は、出生直後は異常は認められなかったが、生後半
年辺りから細胞が急激に増大する症例の場合を示す。この
場合の超過した細胞のほとんど全てのものは癌遺伝子が活
性化している

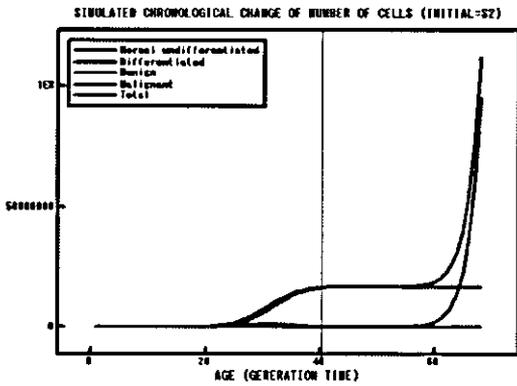


図 14. 良性腫瘍の段階を経ないで、直接に悪性細胞が出現する
例

次に、初診時年齢の分布に関するモンテカルロ実験の結
果について紹介する。

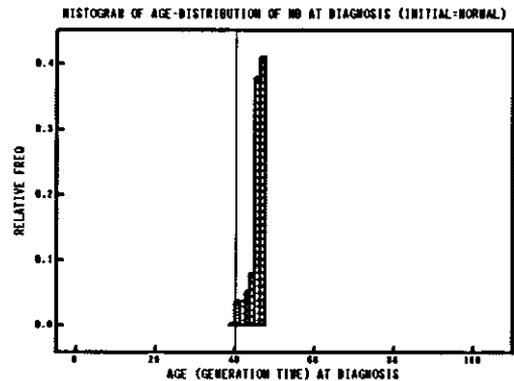


図 15. 受精卵の標的遺伝子に異常が無い細胞（正常細胞）である
場合の初診時年齢分布

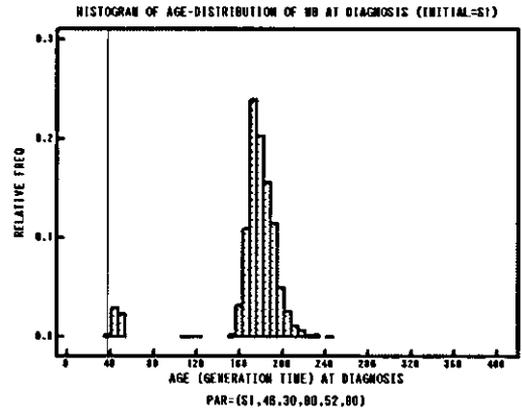


図 16. 受精卵の癌抑制遺伝子の 1 アレルが機能不全になっていた
場合の初診時年齢分布

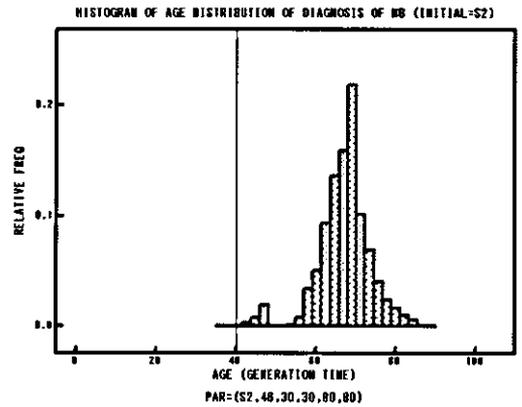


図 17. 受精卵の癌抑制遺伝子の 2 つのアレルが機能不全になっ
ていた場合の初診時年齢分布

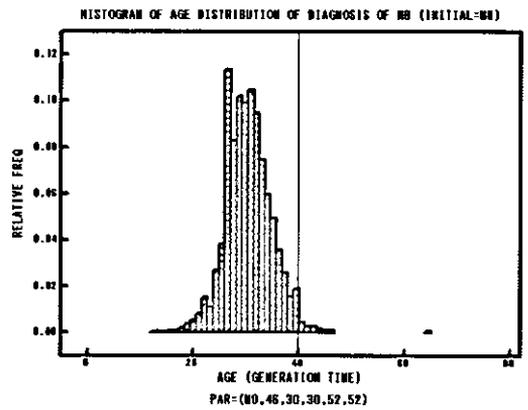


図 18. 受精卵の癌遺伝子が発現し、癌抑制遺伝子の機能は正常
である場合 (M0) の初診時年齢分布

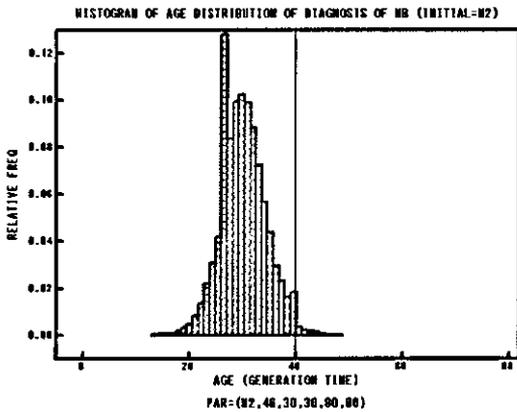


図 19. 受精卵の癌遺伝子が発現し、2 個の癌抑制遺伝子とも機能不全である場合 (M2) の初診時年齢分布

受精卵の段階で癌遺伝子が既に発現していた場合には、40 世代時間未満の時点でその個体は神経芽細胞腫になり、結果的に出生不能であること、また、受精卵において抑制遺伝子の 2 つのアレル何れにも異常が無い場合には、確率的にその個体は神経芽細胞腫に至らないことが判明した。そして、神経芽細胞腫の初診時の年齢分布に関して、20 世代時間～39 世代時間、40 世代時間～60 世代時間、70 世代時間～100 世代時間および 170 世代時間前後の計 4 群に類別可能であることが分かった。これらの群のうち、40 世代時間～60 世代時間の群に属する症例はそのほとんどが単に分化制御遺伝子における異常による細胞数の一時的増大によるもので、予後は良性であり自然退宿性を持つものであること、その後に見れる 2 個の群は何れも悪性でありそれに属する患者のおける致死性も高いことが分かった。

E. 結論

本研究により、受精卵の段階で異常が無い場合には（遺伝的に問題がない場合）には、神経芽細胞腫は発生し得ないこと、またいわゆる良性腫瘍は単に分化制御遺伝子の機能不全が起こっているだけのものであることが示唆され、悪性度別の初診時の年齢分布についてその概要を定性的に説明することができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Arcana I. M, and Ohtaki M: Multi-target models and their application to data analysis of cellular mortality due to radiation exposure. Hiroshima Journal of

Medical Sciences,54,9-21,2005.

- 2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案特許
なし
- 3. その他
なし