

厚生労働科学研究費補助金

(子ども家庭総合研究事業)

登録症例に基づく 神経芽細胞腫マスキニングの 効果判定と医療体制の確立

平成18年度 総括・分担研究報告書 (1 / 2冊)

主任研究者 檜山 英三

平成19 (2007) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

登録症例に基づく神経芽細胞腫マスキリーニングの
効果判定と医療体制の確立
平成18年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 班員名簿

II. 総括研究報告

登録症例に基づく神経芽細胞腫マスキリーニングの効果判定と医療体制の確立…………… 3
主任研究者 檜山 英三

III. 平成18年度経過報告 …………… 29

IV. 分担研究報告

後向き研究

神経芽腫患者の予後に関する統計解析…………… 55
分担研究者 大瀧 慈

神経芽腫の組織学的、生物学的特性と年齢分布、および予後との関連性…………… 63
－多施設、多数例についての後向き研究－
分担研究者 浜崎 豊

マスキリーニング施行世代における1歳代神経芽腫の特徴 …………… 71
－本邦登録症例と欧米との比較検討－
分担研究者 福澤 正洋 他

前向き研究

大阪府における1歳半神経芽腫スクリーニング …………… 79
分担研究者 中山 雅弘 他

京都における生後18ヶ月幼児神経芽細胞腫マスキリーニングの最終報告 …………… 87
分担研究者 澤田 淳 他

宮城県における神経芽腫18ヶ月二次マスキリーニングの報告 …………… 91
分担研究者 林 富

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計画の具体的検討…………… 97
分担研究者 赤澤 宏平

腫瘍特性解析	
日本における神経芽腫リスク分類の提案－全国登録症例の解析より－	109
	分担研究者 杉本 徹 他
6ヶ月乳児マススクリーニングで発見された神経芽腫の生物学的特徴	115
	分担研究者 金子 安比古
神経芽腫における分子標的治療マーカーの免疫組織化学的検討	123
	分担研究者 林 富
神経芽腫マススクリーニング発見症例の生物学的特性と予後に関する研究	137
	分担研究者 中川原 章
SNPアレイによる神経芽細胞腫の網羅的ゲノム異常解析	141
	主任研究者 檜山 英三 他
予後不良神経芽腫の特異的腫瘍マーカーの検索－プロテオーム解析から	149
	分担研究者 升島 努
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	171
VI. 研究成果の刊行物・別刷	

I. 班員名簿

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

神経芽細胞腫マスキリーニング研究班

班員名簿（平成19年3月31日現在）

	氏名	所属	肩書	住所	備考
主任研究者	檜山 英三	広島大学 自然科学研究支援開発センター	教授	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 TEL 082-257-5951 FAX 082-257-5416 eiso@hiroshima-u.ac.jp	
分担研究者	澤田 淳	京都市子ども保健医療相談・事故防止センター（京-みやこ-あんしん子ども館）	センター長	〒604-0091 京都市中京区釜座通丸太町上る梅屋町174-3 TEL 075-231-8005 FAX 075-231-8003 tsawada@jupiter.ocn.ne.jp	
〃	杉本 徹	京都府立医科大学大学院 医学研究科小児発達医学	教授	〒602-8566 京都府京都市上京区河原町通広小路上る梶井町465 TEL 075-251-5569 FAX 075-252-1399 tosugimo@koto.kpu-m.ac.jp	
〃	中山 雅弘	地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター検査科	主任部長	〒594-1101 大阪府和泉市室堂町840 TEL 0725-56-1220 FAX 0725-56-1858 nkymmsshr@mch.pref.osaka.jp	
〃	福澤 正洋	大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座小児成育外科学	教授	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-1 TEL 06-6879-3753 FAX 06-6879-3759 fukuzawa@ped surg.med.osaka-u.ac.jp	
〃	林 富	東北大学大学院医学系研究科 発生・発達医学講座小児外科学分野	教授	〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1 TEL 022-717-7235 FAX 022-717-7240 yhayashi@ped-surg.med.tohoku.ac.jp	
〃	赤澤 宏平	新潟大学医歯学総合病院医療情報部	教授	〒951-8520 新潟県新潟市旭町通1-754 TEL 025-227-2471 FAX 025-227-0850 akazawa@med.niigata-u.ac.jp	
〃	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	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 TEL 082-257-5852 FAX 082-256-7106 ohtaki@hiroshima-u.ac.jp	
〃	中川原 章	千葉県がんセンター研究局	局長	〒260-8717 千葉県千葉市中央区仁戸名町666-2 TEL 043-264-5431 FAX 043-265-4459 akiranak@chiba-cc.jp	
〃	金子安比古	埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所	所長	〒362-0806 埼玉県北足立郡伊奈町大字小室818 TEL 048-722-1111 FAX 048-723-5197 kaneko@cancer-c.pref.saitama.jp	
〃	升島 努	広島大学大学院医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座 分子治療・デバイス研究室	教授	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 TEL 082-257-5300 FAX 082-257-5304 tsutomu@hiroshima-u.ac.jp	
〃	浜崎 豊	静岡県立子ども病院臨床病理科	医長	〒420-8660 静岡県静岡市葵区漆山860 TEL 054-247-6251 FAX 054-247-6259 mhamasan@sch.pref.shizuoka.jp	
研究協力者	秦 順一	国立成育医療センター	総長	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1 TEL 03-5494-8265 FAX 03-3416-0336 jhata@nch.go.jp	
〃	成瀬 浩	財団法人日本公衆衛生協会 スクリーニング精度管理センター	施設長	〒355-0002 埼玉県東松山市東平656-1 TEL 0493-22-5639 FAX 0493-21-3732 hi_naruse@hkg.odn.ne.jp	
〃	田中 丈夫	独立行政法人国立病院機構 呉医療センター中国地方がんセンター・内科系診療部長 小児科科長	統括診療部長	〒737-0023 広島県呉市青山町3-1 TEL 0823-22-3111 FAX 0823-21-0478 ttanaka@kure-nh.go.jp	
〃	檜山 桂子	広島大学原爆放射線医科学研究所	助教授	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 TEL 082-257-5841 FAX 082-256-7105 khiyama@hiroshima-u.ac.jp	
〃	嵩原 裕夫	徳島大学病院 小児外科・小児内視鏡外科	科長	〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町2-50-1 TEL 088-633-7138 FAX 088-631-9698 takehara@clin.med.tokushima-u.ac.jp	
〃	佐々木文章	北海道大学小児外科	教授	〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目 TEL 011-706-7381 FAX 011-706-7384 sskfmk@med.hokudai.ac.jp	
〃	杉山 正彦	東京大学医学部附属病院小児外科	助手	〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1 TEL 03-5800-8671 FAX 03-5800-5104 SUGIYAMA-PSU@h.u-tokyo.ac.jp	
〃	近藤 知史	名古屋市立大学大学院医学研究科 病態外科学講座腫瘍・免疫外科学分野	講師	〒467-8601 愛知県名古屋瑞穂区瑞穂町川澄1番地 TEL 052-853-8231 FAX 052-853-6440 s.kondo@med.nagoya-cu.ac.jp	

	氏名	所属	肩書	住所	備考
研究協力者	田尻 達郎	九州大学大学院医学研究院 小児外科	助 教 授	〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出3-1-1 TEL 092-642-5573 FAX 092-642-5580 taji@pedsurg.med.kyushu-u.ac.jp	
〃	山岡 裕明	広島大学病院小児外科	講 師	〒734-8551 広島県広島市南区霞1-2-3 TEL 082-257-5216 FAX 082-257-5219 yama2@hiroshima-u.ac.jp	
〃	西 基	北海道医療大学生命基礎科学講座	教 授	〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757 TEL 0133-23-1211 FAX 0133-23-1669 motoi@hoku-iryo-u.ac.jp	
〃	藤田 晃三	札幌市衛生研究所	所 長	〒003-8505 北海道札幌市白石区菊水9条1丁目 TEL 011-841-2341 FAX 011-841-7073 koso.fujita@city.sapporo.jp	
〃	浅見 直	新潟青陵大学看護学科	教 授	〒951-8121 新潟県新潟市水道町1-5939 TEL 025-266-0127 FAX 025-267-0053 tasami@n-seiryu.ac.jp	
〃	小田辺なお子	財団法人新潟県保健衛生センター	課長補佐	〒951-8680 新潟県新潟市川岸町2-11-11 TEL 025-267-6326 FAX 025-231-1051 kensa@nhsc.or.jp	
〃	三間屋純一	静岡県立こども病院 血液腫瘍科	副院長兼 医療安全室長	〒420-8660 静岡県静岡市葵区漆山860 TEL 054-247-6251 FAX 054-247-6243 jmimaya@poppy.ocn.ne.jp	
〃	石山 洋	静岡県予防医学協会代謝異常等検査課	代謝異常等 検査課長	〒421-1292 静岡県静岡市葵区建穂1-3-43 TEL 054-277-3412 FAX 054-278-7717 ishiyama@shsa.net	
〃	沼田 公介	大阪血清微生物研究所奈良支社検査室	室 長	〒634-0813 奈良県橿原市四条町556-6 TEL 0744-24-0530 FAX 0744-24-3507 numata.kosuke@osaka-kessei.co.jp	
〃	中田幸之介	聖マリアンナ医科大学小児外科	理 事	〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1 TEL 044-977-8111 FAX 044-976-5964 k2nakada@marianna-u.ac.jp	
〃	鈴木恵美子	財団法人日本公衆衛生協会 スクリーニング精度管理センター	主 任 技 術 者	〒355-0002 埼玉県東松山市東平656-1 TEL 0493-22-5639 FAX 0493-21-3732 nscq-center@angel.odn.ne.jp	
〃	福士 勝	札幌市衛生研究所保健科学課	課 長	〒003-8505 北海道札幌市白石区菊水9条1丁目 TEL 011-841-2341 FAX 011-841-7073 masaru.fukushi@city.sapporo.jp	
〃	花井 潤師	札幌市保健福祉局 健康衛生部生活環境課	精度管理 担当係長	〒060-8611 札幌市中央区北1条西2丁目 TEL 011-211-2862 FAX 011-218-5102 junji.hanai@city.sapporo.jp	
〃	原田 正平	国立成育医療センター 成育政策科学研究部 成育医療政策科学研究室	室 長	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1 TEL 03-3416-0181 FAX 03-3417-2694 harasho@nch.go.jp	
〃	田崎 隆二	財団法人化学及血清療法研究所 品質管理部臨床検査センター	検査係長	〒860-8568 熊本市大窪1丁目6番1号 TEL 096-344-2106 FAX 096-344-6623 tasaki-ry@kaketsuken.or.jp	
〃	佐野 秀樹	福島県立医科大学小児科	助 手	〒960-1295 福島県福島市光が丘1 TEL 024-547-1295 FAX 024-548-6578 s-hideki@fmu.ac.jp	
〃	米田 光宏	大阪大学大学院医学系 研究科外科学講座小児成育外科学	助 手	〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2 TEL 06-6879-3753 FAX 06-6879-3759 yoneda@pedsurg.med.osaka-u.ac.jp	
〃	石田也寸志	愛媛大学大学院医学系研究科 医学専攻病態制御部門 臓器機能統御医学小児医学	助 教 授	〒791-0295 愛媛県東温市志津川 TEL 089-960-5320 FAX 089-960-5941 ishida@m.ehime-u.ac.jp	
〃	小阪 嘉之	兵庫県立こども病院血液腫瘍科	部 長	〒654-0081 神戸市須磨区高倉台1-1-1 TEL 078-732-6961 FAX 078-735-0910 kosaka_kch@hp.pref.hyogo.jp	

Ⅱ. 総括研究報告

－平成18年度研究－

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業） H16-子ども -012

統括研究報告書

登録症例に基づく神経芽細胞腫マスキリーニングの 効果判定と医療体制の確立

主任研究者 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

神経芽腫マスキリーニング（以下マス）事業は、治療不要な腫瘍の過剰診断と死亡率の低下に関する一定の見解が得られていないことから休止が決定した。この事業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示された。そこで、本研究は、これらの課題に対応し、神経芽細胞腫のマスの効果判定および有効なマス事業の開発とこの腫瘍の臨床診断と治療成績向上を目的として平成16年度から開始した。①については、2000年までに発症し、5年後の予後・合併症の調査が終了した日本小児外科学会、日本小児がん学会の登録例さらに、乳児神経芽腫スタディグループ、中央病理診断結果、人口動態調査死亡票による死亡確認データを照合した4,016例（マス発見例2,255例）のデータベースを中心に後向き研究を施行した。これらの解析から、6ヶ月マスの結果、乳児期に予後良好な腫瘍が数多く発見され過剰診断症例が存在することとともに、HPLCが導入された1990年以降に受診した群では2才以降の年長児症例が半減していた。さらに、MYCN増幅例も、2才以降の症例が北米の報告に比べ有意に少なく、進行例を早期発見に寄与していたことが明らかになった。②に対して、後向き研究などから前向き研究の実施時期は昨年生後18ヶ月と決定したが、実際に18ヶ月マスを継続、継続検討中の自治体での発見症例10例は、過剰診断例はなく全例生存していた。さらに、1990-2002年にかけて施行された宮城と京都の18ヶ月二次マス対象となった217,795人のコホートでは、二次マス受診例には4才までの発症例はなく、二次マス受診群と非受診群の18ヶ月以後の神経芽腫死亡は10万対2.25、7.11人で、18ヶ月マスの施行の有効性が示唆された。そこで、18ヶ月児を対象とした前向き研究の実施プロトコルを作成し、各自治体に配布し、啓発活動を開始してその準備段階にきている。③に対して、腫瘍特性解析としての網羅的ゲノム解析から、神経芽腫のゲノム異常は大きく4群に分類されることが判明し、これらの結果から予後不良な腫瘍の新たな腫瘍特性の探索をめざしている。予後不良例の新規マーカー検索、特にカテコラミン代謝系を中心としたLC/MS解析法を用いた一斉解析法が確立され、LC/MS/MS解析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候補マーカーが見出され、診断・治療効果の判定や、今後の新たな形のスクリーニングへ導入する予定である。さら、研究の推進と実施体制の確立のために、主要施設で保存されているマス施行中の切除標本をバーチャルな形のバンキングとし、多くの研究に利用できるシステムを構築した。

Summary

In 2003, Japanese Neuroblastoma Mass-Screening (MS) Project was paused due to the over diagnosis of the favorable tumors which spontaneously regress or mature and no obvious evidences for decrease of mortality rate. As this MS program was paused, the following three issues were set to be promptly solved: ① accurate estimation of the incidence and mortality rates of neuroblastoma ② Evaluation of proposal of a new MS program with changed timing and new method of MS ③ Promotion and establishment of studies for clinical diagnosis and treatment aiming to reduce the mortality rate of neuroblastoma. To solve these three issues promptly, this study group was launched on 2006. For the first issue, retrospective study was performed using database consisting of more than 5,000 cases including MS-detecting cases registered in Japanese Societies for Pediatric Surgery and Pediatric Oncology or Japanese study group for infant neuroblastoma. This database has been brushed up using death registration data in Population Survey Report and Japanese program for childhood chronic diseases supporting system.

In this year, we summarized 4,049 cases including 2,288 MS-detecting cases, who had been diagnosed until 2000 and followed for 5 years and analyzed pathological and biological findings. Infant tumors detected by MS-program contained a lot of favorable tumors, consequently considered as over-diagnosis. While the case numbers more than 2 years were reduced after 1990 when HPLC method was nationally induced as MS method, and *MYCN* amplified tumors were also reduced with the comparison of the North American cohort. These findings indicated that Japanese MS program for 6-months old infants was effective to reduce the elder advanced patients especially more than 2 years old. To solve the second issue, we reached a consensus that 18 months old is the appropriate timing for MS last year. The evidences by the retrospective study also supported this age. We analyzed 10 cases detected 18-months MS in Osaka, Kyoto, and Sapporo. All 10 cases are alive and there were no cases considered as over-diagnosis. In the analysis of the 217,795 cohort in second MS project for 18 months-old children received first 6-months MS in Miyagi and Kyoto, the mortality rates of second MS received and non-received cases were 2.25 and 7.11 per 100,000, respectively. And no one in the received group was diagnosed neuroblastoma until 4 years olds. These findings also suggest the efficacy of 18-months MS. Now, we are proposing the protocol of the prospective study Project. As biological characteristics in tumors, genomic alteration analysis using SNP array revealed four different groups, indicating the new biological feature of unfavorable tumors. To identify new tumor markers specialized for unfavourable tumors, new analytical method using LC/MS for exhausting detection of catecholamine metabolites have been established. And the mass-mapping procedure using LC/MS/MS procedure for serum samples revealed several candidates of unfavorable tumor specific tumor markers, which would be applicable for diagnosis, therapeutic targets as well as the marker of screening. To establish the advance of research in this tumor, we established the new virtual banking system in which many researches would be used in the world.

＜分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名＞		
澤田 淳	(京都市子ども保健医療相談・事故防止センター長)	
中山 雅弘	(大阪府立母子保健総合医療センター検査科主任部長)	
杉本 徹	(京都府立医科大学大学院医学研究科小児発達医学教授)	
林 富	(東北大学大学院医学系研究科発生活・発達医学講座小児外科学分野教授)	
福澤 正洋	(大阪大学大学院医学系研究科外科学講座小児成育外科学教授)	
金子安比古	(埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所所長)	
中川原 章	(千葉県がんセンター研究局局長)	
升島 努	(広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座分子治療・デバイス学研究室教授)	
赤澤 宏平	(新潟大学医歯学総合病院医療情報部教授)	
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)	
浜崎 豊	(静岡県立こども病院臨床病理科医長)	

A. 研究目的

生後6ヶ月の全ての乳児を対象とした尿による神経芽細胞腫のマスキリーニング（以下マス）を行う事業（神経芽細胞腫検査事業）は、1970年代に開始され、1985年以降、全国的に施行され、その受診率は80%を越えて継続されてきた。しかし、マス施行後、全体の罹患率が2倍以上に増加し、マスで発見される腫瘍のほとんどが予後良好であることから、治療不要な腫瘍の過剰診断による不利益が問題となり、死亡率の低下に関する一定の見解が得られていないこともあって平成15年に休止が決定した（神経芽細胞腫マスキリーニング検査のあり方に関する検討会報告書、平成15年7月30日）。その時点で、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示された。そこで、本研究は、これらの課題に対応し、神経芽細胞腫マスの効果判定および有効なマス事業の開発とこの腫瘍の臨床診断と治療成績向上を目的として開始した。①については、日本小児外科学会と日本小児がん学会さらに、その他の本邦で集積されているいくつかのデータベースを用いて、本邦の神経芽腫症例を網羅するデータベースを作成し、長年継続してきたマスの効果およびその影響を後向きに解析する。②については、1才以降を対象とした新たなマス事業についての前向き研究の立案を行うとともに、既に自治体レベルでの生後18ヶ月で施行されたマスの成果を検討する。③については、全国的なマス事業の基で得られた悪性度の異なるグループの腫瘍特性の解析結果から、それぞれの腫瘍グループの発生と経過を解明する。また、全国に凍結保存されている腫瘍サンプルおよび今後の検体をバンク化し、研究の基盤整備をおこなう。さらに、解析された多くの予後関連因子に重み付けをして治療の層別化に向けたリスク分類のガイドラインを作成する。さらに、利用可能な検体を用いゲノム解析や、血清や尿中の新たな腫瘍マーカーの探索を行ない、神経芽細胞腫の診断技術・治療成績向上に寄与することを目的として検討した。

現在、臨床因子、腫瘍特性から、神経芽腫の特性を3分類し、国際的に議論されている。自然退縮するI型、予後不良な2型で、特に悪性度から2A型と高悪性度の2B型に分類されている（BrodeurGM：Nature Reviews Cancer 2003）。元来、マスの目的は2型を早期発見し、これらの治療成績を向上させることであり、こうした観点からの解析も行った。

B. 研究方法

① 後向きコホート解析：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）を対象に、病理所見や腫瘍特性を再評価後、発生頻度、治療法と予後の推移を再検討することとした。本年は、5年後の追跡調査が終了した1981年から2000年までの発症例4,016例（マス発見例2,255例）を解析した。昨年度までの多標的仮説に基づいた罹患過程の数理モデル化・罹患年齢に関するモンテカルロ数値実験に

よる検討に加え、再度年代を追って診断時年齢別に神経芽腫の登録数の変化を検討した（図1）。さらに、これらの症例数を診断時年齢別にマス施行前の1971 - 1980年と、HPLCによるマスが全国的に施行されるようになった1990年以降出生児を比較検討した。それらの結果を、図1に示す。さらに、年代によるバイアスを検討するために、同年代の北米（Children's Oncology Group: COG）、ドイツの報告データと比較検討を行った（London WB, et al: Cancer Lett, 2005）。さらに、これらのデータの中で、生物学的因子解析を行い、予後不良例の動向について検討を加えた。

昨年度は、施設レベルで1才代の神経芽腫の検討を行ったが、本年度はデータベースの症例をもちいてHPLCによるマスが施行され、かつMYCN遺伝子増幅検査が多くの施設で可能となった1990年以降に出生した症例で、このうち1歳代に臨床発見された104例を対象とした。これらの臨床的特徴を検討し、欧米のデータ（Cancer Lett, 2005）と比較検討を行った。

さらに、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例から各年度、各地域の登録率を算出し、全体数を推計後、統計学的にマスによる死亡数の減少効果の算定を予定して、厚生労働省統計情報部に申請した、平成18年10月末に承認され、これらを使用して解析した。今回用いたデータベースは、主に主治医が学会や、グループスタディへの参加症例を登録したものを倫理委員会の許可を得て第三者利用したものであり、どの程度の登録率であるかが大きな問題である。そこで、一つは人口動態調査死亡票とデータベースの死亡例を照合し、その結果から登録率を類推する作業を行った。実際には、死亡時年齢20歳未満の者のうち、原死因符号が以下の者について照合を行った。

心臓、縦隔及び胸膜の境界部病巣の悪性新生物
C38.1, C38.2, C38.8

末梢神経及び自律神経系の悪性新生物 C47.0,
C47.1, C47.2, C47.3, C47.4, C47.5, C47.6,
C47.8, C47.9

後腹膜及び腹膜の悪性新生物 C48.0, C48.1,
C48.2, C48.8

副腎の悪性新生物 C74.1, C74.9

その他及び部位不明の悪性新生物 C76.0,

C76.1, C76.2, C76.3, C76.4, C76.5, C76.7,
C76.8

更に、平成6年以前はICD9であるため、以下のコードを使用した。

158.0 後腹膜および腹膜の悪性新生物 後腹膜
164.3 胸腺、心および縦隔の悪性新生物 後縦隔

192.8, 192.9 その他の部位および部位不明の神経系の悪性新生物 その他 部位不明

194.0 その他の内分泌腺および関連組織の悪性新生物 副腎

194.6 その他の内分泌腺および関連組織の悪性新生物 大動脈体およびその他の傍神経節<パラガングリア>

199.0, 199.1 部位の明示されない悪性新生物 播種性 その他

また、平成10年度から電子化されている小児慢性特定疾患のデータのうち、平成10年から12年までのコードC74.9の新規症例を診断年齢別に症例数を検討し、当方にて作成したデータベースとの相関を検討し、登録率を推計した。これらのデータは、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）から提供して頂いた。

② 前向き研究：昨年度までに過剰診断と考えられる自然退縮あるいは分化例がほとんど検出されなくなる年齢で、かつ悪性度の高い腫瘍が早期に検出可能である年齢を検討する目的で、予後不良例の増加時期とVMA・HVAの増加してくる時期、予後良好例のVMA・HVAの減少時期などを検討し、適切なマス施行時期として生後18ヶ月が適切であるとの合意を得た。そこで、本年度は実質上のプロトコル作成と、18ヶ月マスの有効性を示すエビデンスの集積を主な作業内容とした。プロトコル作成としては、対象年齢を18ヶ月とし、マス事業を継続或いは継続予定の京都、大阪、新潟、札幌、静岡、川崎などのマス施行群と、神経芽細胞腫の発生率が同等で、全数登録可能なマスを施行しない自治体を対照群とした前向き研究について、サンプル数と観察期間、マス施行時期、方法と精度管理、受診例および非受診例の追跡調査方法などの具体的プロトコルを作成した（添付資料1）。今後、綿密に自治体

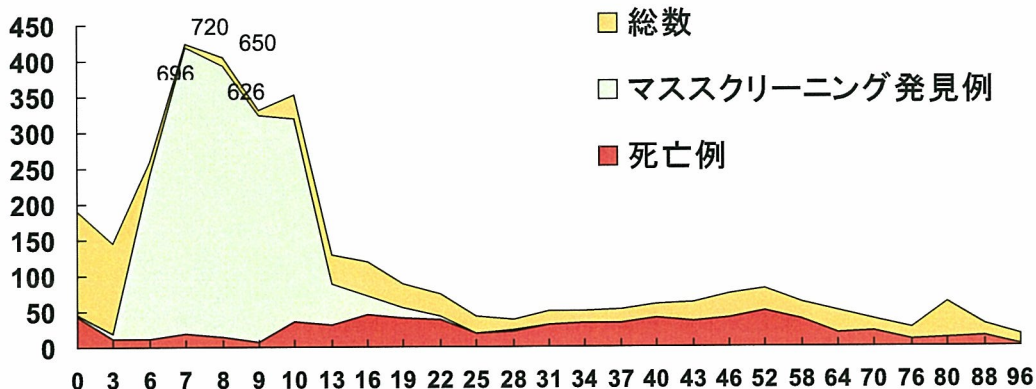


図1：神経芽細胞腫の診断時年齢とその分布

と連携、協議し、前向き研究を開始する方向で検討した。

さらに、すでに18ヶ月マスの施行してきた大阪府、京都府、札幌市などの現状を分析し、これらの発見例について解析して、有効性を検討する。また、1990 - 2000年、1992 - 2002年に京都、宮城で施行された6ヶ月マス受診対象群に対する、生後18ヶ月児へのマス(以下二次マスと称す)の結果を集積し、18ヶ月マスへの有効性検証へのエビデンスを解析した。

③腫瘍特性解析：マス事業の継続下に得られた腫瘍検体(マス発見例、臨床発見例)のうち、凍結保存あるいは病理標本として保存されている症例および分子生物学的な腫瘍特性データを全国から集積し、新たな研究の支援体制を確立し、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ための基盤整備を行った。この際、後向き研究で追跡調査が終了した検体については連結不可能匿名化し、腫瘍バンク化して、腫瘍特性を再検討、あるいは新たな研究の支援とし、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ための基盤整備を行う。さらに、腫瘍組織の特性をマイクロアレイ、DNAチップ(single nucleotide polymorphism array: SNPアレイ)等の新しい解析法で、解析し再検討した。

さらに、臨床データと腫瘍特性を解析し、本邦の神経芽細胞腫での腫瘍特性のリスク分類の本邦案を改案した(表1)。

また、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検討を行った。

表1：神経芽細胞腫のリスク分類〔案〕平成18年12月
*：日本のデータから提唱する新たな分類項目

年齢	病期 (INSS)	MYCN 増幅	骨・骨髄 転移	病理 (INPC)	リスク
any	1	+	-	any	Low
	2A, 2B, 3, 4	+		any	High
	4S	+		any	Intermediate
≥18	3, 4	-	any	any	High
	1, 2A, 2B	-	-	any	Low
< 18	4	-	any	any	Intermediate *
	any	-	-	F	Low

INSS: international neuroblastoma staging system, INPC: international neuroblastoma pathological classification, 病理分類：UF: unfavorable, F: favorable

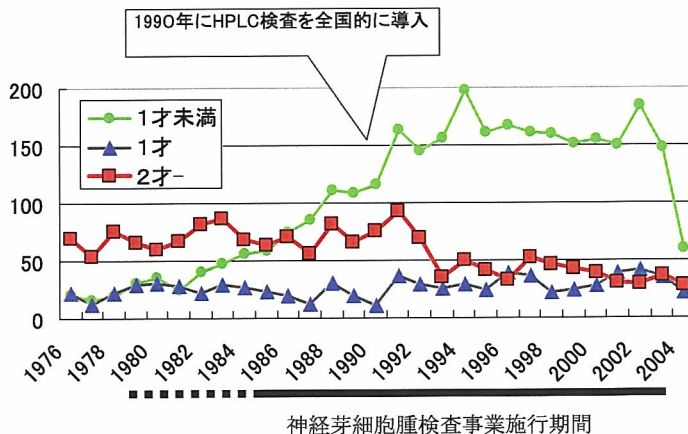


図2：診断時年齢毎の神経芽腫登録数の年次別変化

C. 研究結果

①後向きコホート解析：いくつかのデータベースの登録症例を照合して得られた症例のうち、1981から2000年までの治療開始例で5年後の予後が追跡しえた4,016例（マス発見例2,255例）のデータベースを解析した。図1は、昨年度の解析にさらに症例数を追加し、死亡については、死亡票との照合にてさらに確実なものを死亡として検討した結果である。一昨年から行なってきた多標的仮説に基づいた罹患過程の数理モデル化および罹患年齢に関するモンテカルロ数値実験による検討により、現実に近い4群に分けられ、1つは胎生期に発症する群で、実際には残りの3群が生後に発症するモデルが得られていた。昨年の集計とほぼ同様で、本年度、症例を追加した結果でも同様に（図1）、マスキリーニング発見例が大多数の1才未満の症例の群が予後良好であったのに対し、1才以降に2つのピークを認め、ほぼ数理モデルを示唆する結果であった。一昨年度から継続した病理学的検討でも、神経芽細胞腫の発症分布は3グループに分類され、これらのモンテカルロ数理解析と一致した結果となった。疫学解析と病理所見の両面から、明らかに腫瘍の悪性度が異なるグループが分類され、これらの自然歴がある程度明らかになり、また、予後良好な腫瘍は生後18ヶ月頃までに発症することが示され、前向き研究に対して大きなエビデンスとなった。

6ヶ月スクリーニングによる予後良好な腫瘍の増加は、過剰診断例が含まれていることは明らかであるが、予後不良腫瘍をどの程度見いだしている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2）。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少率はそれを上回る減少率であった。そこで、これらの症例数の割合を、1980年以前の症例、さらにドイツ、北米（COG）とで比較検討を行なった（表2）。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3）。その結果、マスが全国の実施される以前の日本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、本邦でマスを施行されていた次期には約10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ヶ月マスでは、予後良好な神経芽腫を数多く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要因になっていることが示唆された（平成15年度、厚生労働科学研究（難知性疾患克服研究事業）マスキリ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：神経芽腫マスキリーニング・プログラムの疫学評価（分担研究

表2：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)	ドイツ (1990-1994)	COG (1990-1994)
<6	132	271	160	245
6 ≤ <12	791**	199	104	170
12 ≤ <18	41	185	49	107
18 ≤ <24	65	141	62	138
24 ≤ <60	130	478**	224	406

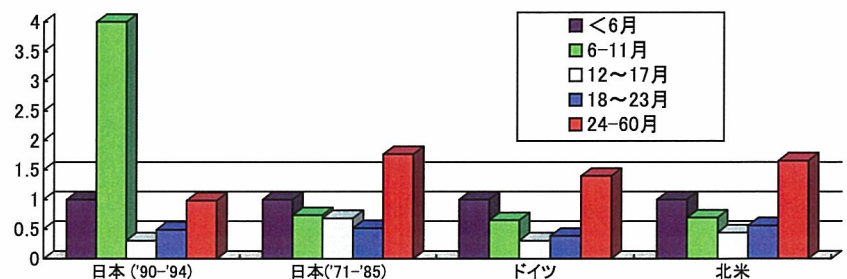


図3：生後6ヶ月未満症例を1とした時の各年代別発症比率

表 3：小児慢性特定疾患のデータとの照合結果 小児慢性特定疾患のデータとの照合結果

発病月齢	0～5	6～11	12～17	18～23	24～35	61-	不明	計
小児慢性特定疾患*	124	459	39	34	137	82	24	929
当研究班データベース	83	414	52	28	97	56	-	740

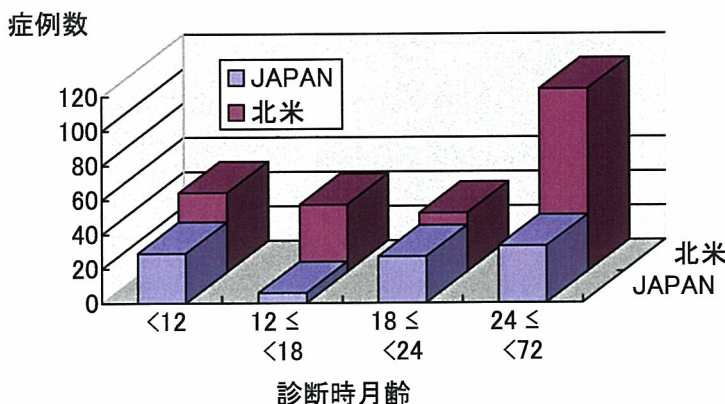


図 4：日本と北米症例の MYCN 遺伝子増幅症例数の診断時年齢別分布

者：林邦彦) 参照)。さらに、予後不良な 2B 型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 4)。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。

本邦では、小児がん登録は義務化されたものではなく、人口ベースでのデータベースが存在しない。そこで、可能なデータとして、人口動態調査死亡票との照合作業を行った。最も大きな問題は、死亡票に神経芽腫の項目がなく、原発部位と悪性の両面、さらに年齢から絞り込み、手術・解剖所見で確定する作業が必要である。実際には、死亡例の 9 割は、副腎原発腫瘍であり、逆に死亡票の副腎原発腫瘍で 10 才未満死亡は数例を除き神経芽腫であった事実から、今回は副腎の悪性新生物 C74.9、平成 6 年以前は 194.0 その他の内分泌腺および関連組織の悪性新生物 副腎のコードの死亡例と、当研究班のデータベースで副腎原発の死亡例を照合した。その結果の 1990 年 1 月から 2000 年 12 月までに出生し、5 才

までに死亡した症例 171 例のうち、このデータベースに登録された症例は 125 例 (73%) であった。

また、平成 10 年度から電子化されている小児慢性特定疾患のデータのうち、当方のデータベースと重複する平成 10 年から 12 年までの ICD コードが C74.9 の新規症例数を検討した(表 4)。副腎の神経芽細胞腫においては、診断年齢別に症例数を検討し、当方にて作成したデータベースとの相関を検討し、登録率を推計した。これらのデータは、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)から提供して頂いた。この結果から、この事業に登録された症例数の 79.6% がわれわれのデータベースに登録されていると考えられた。

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 ヶ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 I V B 期が有意な予後因子となる可能性も考えられた。

②前向き研究：昨年度から、施行時期を変えてマスを継続、継続検討中の自治体関係者等を交えて、実施時期と方法について論議した。昨年度までに、そ

の結果を踏まえて、従来の生後12ヶ月、14ヶ月、18ヶ月マスのパイロットスタディでは、14ヶ月までには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、①の後向き研究の結果も踏まえて、生後18ヶ月で施行することに再度確認した。更に、実際のプロトコルとして施行するため、統計学的に判定可能なサンプル数と観察期間、方法・精度管理、追跡調査方法などについて実施案（添付資料：「生後18ヶ月幼児に対する神経芽細胞腫マスキリーニングの実施要綱」）を作成した。その内容は、3年間で約60万の地域を施行対象地域とし、後向き研究と死亡票の使用から発生率が同等で、全数登録可能なマスを施行しない自治体を対照群として選定した。中央病理診断と凍結組織を用いた腫瘍特性解析を行う体制、さらにデータセンター（発症例登録とその経過観察）と治療について現在、日本小児がん学会の小児がん全数登録システムと連携し、さらにJNB SG（日本神経芽細胞腫スタディグループ）と連携することとした。インフォームドコンセントについては、大阪、京都、札幌で実際の運用が開始されている形式を踏襲し、各地域、地区で運用しやすい形で運用することとした。インフォームドコンセントの内容は、神経芽細胞腫の早期発見のために検査を受けること、検査で陽性であった時は指定病院にて精査を受けることの同意とし、治療に関しては全例治療介入となることまでを明記し、実際の治療に関しては、発症後にその同意は各担当医師のもとで再度施行することとした。

この前向き研究の施行を開始するにあたり、その有効性に対する理解を得る目的で、現在までに大阪府、京都府、札幌市で行なわれてきた生後18ヶ月児を対象としたマス発見例の検討、さらに1990－2000年に施行された京都府の18ヶ月二次マス、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も検討した。それぞれのスタディの結果は、分担研究者報告に詳細に報告されているが、6ヶ月マスを施行し、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人のコホートとなり、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例が発見されている。臨床発見例は、

19例で、6ヶ月前に1例、6－18ヶ月の間に6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ヶ月マス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才までの発症とさらに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ヶ月マス受診群が2.25人、非受診群は7.10人となった。統計解析法については、問題があるところであるが、マス受診群の死亡率が低いことが明らかになった。

また、6ヶ月マスが休止となった以降に、現在進行中の、大阪（2004.5～2006.10）、京都（2004.12～2006.8）、札幌（2006.4～2006.10）の18ヶ月マスの状況についてまとめてみると、集計63,908人受診し、10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6,391出生に対して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、11,116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、妥当な値であると考えられた。さらにこれらの症例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となった。

③腫瘍特性解析：神経芽腫が単一の疾患ではなく、生物学的特性が異なった集団であることが先の後向き研究からも明らかで、生物学特性の検討を行ってきたいくつかのグループからも予後良好で自然退縮あるいは分化する1型、と予後不良な2群2A、2B型に分類することが提唱されている（Nature Review Cancer 2003）。まず、病理解析として、小

児医療7施設及び乳児神経芽腫登録症例計997例の症例について、INPC国際分類(International Neuroblastoma Pathology Classification)による組織型と年齢分布、予後との関連性を検討した結果、生後18ヶ月を境として、種々の組織型の比率は一定化する傾向があり、組織学的に予後不良群に分類される神経芽腫の比率が年齢的には18ヶ月前後から高くなる。18ヶ月以降の神経芽腫では予後不良群の比率およびMYCN増幅を示す症例の比率が高く、神経芽腫の組織型とともにMYCN増幅の有無が予後に関連する因子であることが確かめられた。また、予後不良群の組織型ではDNA倍数体、年齢にかかわらず予後不良であった。2A型神経芽腫と考えられる症例は、予後良好の1型と予後不良の2B型の中間に位置し、多様な組織型、臨床像を示し、その早期発見は予後改善に有用であることが示唆されるとともに、早期例では1型として判別されている可能性が示唆された。マス陰性症例におけるマス受診時期は平均7ヶ月であるが、腫瘍発見時の病期は大半の症例が4期で、予後不良群が71%を占める。マス陰性の場合、神経節腫のように腫瘍特性としてマーカー陰性を示す例もあるが、マス受診後、多くの例は18ヶ月から36ヶ月経過してから発見されている。以上のように、神経芽腫群腫瘍の多数例の臨床病理組織学的検討、生物学的検索から、マス発見例を主とする乳児神経芽腫例と非マスで臨床発見の神経芽腫例の年齢分布をみると、生後18ヶ月が両者の頻度の交差する時期であること、組織型やDNA倍数体解析、MYCN増幅との関連からみても、18ヶ月が予後良好群から予後不良群への転換年齢であることが示唆された。これらの病理検討結果は今後、18ヶ月前後など、1歳代におけるマス導入時期の検討や、今後の神経芽腫リスク分類、治療プロトコル検討などの前向き研究に有用なデータになったと考えられた。

予後不良因子としての分子生物学的検討を目的に、全国主要12施設での腫瘍の保存状況を調査し、約1,100例の腫瘍特性の分子生物学的データの集計を行った。測定法、判定基準の差異から、集計困難な因子も少なくなく、まずはこれらの腫瘍のバンキングを行うべく、バンキングに向けた規約づくりを行い、10月25日に第一回バンキング設立委員会を立ち上げた(添付資料2)。さらに、凍結組織を用

いた腫瘍特性解析において少量の腫瘍DNAを用いた検査で、感度、精度からも同一判定基準でこれらが一度に解析できる方法として、DNAチップ(SNPアレイ)法やアレイCGHにて検討し、この腫瘍は大きく4つのゲノム異常のパターンに分類できることが判明した。この中で、染色体全体の増減を主としてゲノム異常の症例(全染色体異常型 whole chromosomal gains/loss型)は、極めて予後良好であるのに対し、MYCN増幅を認める症例は予後不良であり、のこりの2群(大きな異常を認めない群 silent型と、染色体の部分的な増減を認める群 partial chromosomal gains/losses型)は、中間的な群で予後良好例と不良例がほぼ半数であった。よって、染色体全体が増減した全染色体異常型は、自然退縮或いは分化する腫瘍であり、その他の腫瘍が高リスク、中間リスク腫瘍となることが明らかになった。この手法を用いて後向きに保存されている腫瘍約200例の特性を再評価し、報告した。その結果、ゲノム解析から腫瘍特性とその症例の将来像が予測可能となった。

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。

染色体異常を検討する目的で、453例の神経芽腫を対象にして、1番染色体の数と1番染色体短腕欠失の有無(FISH法)、MYCN遺伝子コピー数(サザン法)の検討から、Type 1, 2A, 2B腫瘍の頻度は(1)マス発見腫瘍の88.2%、10.5%、1.4%にみられ、また、(2)臨床発見乳児腫瘍の68.0%、24.0%、8.0%、(3)臨床発見年長児腫瘍の23.4%、42.3%、34.2%にみられた($P < 0.001$)。Type 2A腫瘍は、マス発見例は早期で予後は良好であるが、臨床発見乳児および年長児 type 2腫瘍の病期は進行期であり、予後不良で、6ヶ月マスのターゲットと考えられ、これはマス発見腫瘍の10%を占めていた。また、Type 1腫瘍のごく一部はマスで発見されなければ進行期腫瘍

として年長児に発見されると予想される。両者を合わせるとマス発見腫瘍の10-20%が6ヶ月マスの恩恵を受けていると推測された。

血清 NM23H1蛋白質について、神経芽腫患者217例(6ヶ月マス発見例131例、臨床的発見例86例)にて、ELISA法で測定され、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。

さらに、メチル化検索として、癌抑制遺伝子 RASSF1A とアポトーシス関連遺伝子 CASPASE8 および DCR2のメチル化を methylation-specific PCR法で分析し、臨床発見例では、メチル化例の予後は非メチル化例に比して不良であった。マス発見例では、RASSF1A遺伝子のメチル化は病期、予後とは無関係に過半数の腫瘍でみられ、神経前駆細胞に RASSF1Aメチル化の現象を反映していると考えられた。

さらに、悪性度の高い腫瘍に特異的な新規マーカー検索、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、カテコールアミンの中間代謝物も対象とし、タンデムマスを用いた尿中・血中カテコールアミン代謝物の一斉分析法の確立により、9種のカテコールアミンを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キューニングにより、低分子を標的とした新しいマーカーの検索も行い、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。

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、休止となり、社会的な反響も大きなものがあつたが、一方で、これらから得られたエビデンスを神経芽細胞腫の診断と治療成績向上に確実に結びつけることが我々の研究班の使命である。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、①後向き研究、②前向き研究、③腫瘍特性解析、の3分野に分けて検討した。

本年は後向き研究の総括として、1981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。人口動態死亡票の使用許可、さらに小児慢性特定疾患データベースの使用が許可され、当研究班のデータはかなり内容が充実し、推計登録率は80%程度と考えられ、人口ベースの検討に近似するデータを得ることができた。

奇しくも、北米あるいはドイツ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。その結果、昨年度の数理モデルから神経芽細胞腫は3つのグループの結果を支持する結果が得られ、この腫瘍の発生原因とその特性解析に関して意義深い。

後向き研究で得られた大きな成果は、6ヶ月のマスキューニングで乳児症例の過剰診断は確かにあるが、それと同時に2才以降の年長児症例が半減していることが明らかになった。これは、従来その効果判定を行うときに定性法での検討であったこと、1才代の神経芽腫の早期発見に主眼をおいたこと、さらにHPLCを導入後の長期解析がなされていなかったことなどが考えられる。この結果は、既に平成15年の黒田班の研究成果である生後6ヶ月児の神経芽腫マスキューニングの前向きコホート研究での死亡率の低下と一致する結果である。この結果は、神経芽腫のマスキューニングは受診することで、過剰診断を受けるリスクは伴うが明らかに腫瘍死するリスクは半減することが示された。となると、過剰診断を最小限にできれば極めて有効なマスキューニングが施行できる可能性が考えられる。さらに、MYCN増幅のマスキューニング症例は、MYCN増幅の臨床発見例よりも予後良好であることを既に報告したが、マス施行時期の本邦では、北米に比べ2歳以降のMYCN増幅例の有意の減少を認めた。これは、MYCN増幅例の早期発見効果では説明困難で、おそらく、本腫瘍ではMYCN増幅は腫瘍が進展する間に生じる late event であり、マスによってMYCN増幅する前の腫瘍を診断し治療してきたためと考える

と理解できる。予後別の腫瘍分布に基づいた先の数理モデルでもがん遺伝子活性化は late event であることを示していたが、これと一致するエビデンスであり、本腫瘍の進展と MYCN 増幅の関係解明に有効である。そして、MYCN 増幅が腫瘍の進行とともに生じてくるとなると、スクリーニングの意味がさらに重要となってくる。以上の結果から、当研究班では、神経芽腫の3つのサブタイプの実際の発生动向を図5の如く類推するに至った。

そこで、これらの後向き研究の成果を基に、前向き研究グループでは、施行時期の検討を第一に行った。6ヶ月マスで見出された症例で無治療経過観察を行われた経緯から、いわゆる Type 1 の症例が自然退縮、分化する経緯での尿中 VMA、HVA 値の変化をみると、ほぼ生後18ヶ月では全例正常域に達していることから、生後18ヶ月を提唱した。今回の検討でも、生後2才以上の症例の減少効果が明らかなることから18ヶ月は妥当であると考えられた。

しかし、6ヶ月マス施行下での1歳代の神経芽腫の検討では、本来1歳代に発見されるべき中間リスク症例が、マスによって乳児期に早期発見、早期治療を受けていた「刈取り効果」が存在し、このため、1歳代、特に18ヶ月未満例において予後不良なハイリスク症例の頻度が相対的に高頻度となったと考えられ、これらは18ヶ月マスを遂行する上で念頭に置くべき結果であり、今後マス休止した地域も含め、1歳代神経芽腫の動向を観察する必要が示唆された。

そこで、生後18ヶ月スクリーニングでどのような症例が発見しうるかを、以前二次マスキングとして生後18ヶ月で施行された京都府（1990 - 2000）と宮城県（1992 - 2002）の結果について検討した。その結果、18ヶ月マスを受診した症例は2才 - 4才の神経芽腫の発症がなく、宮城では陰性例が4才以降に4例診断されていたが、一方非受診例は18ヶ月 - 48ヶ月に7例発症し6例が腫瘍死していた。これは、有意性はともかく、18ヶ月マスを指示するエビデンスと考えられた。更に、6ヶ月マスが休止になった以降に、大阪、京都、札幌で施行されている生後18ヶ月の神経芽腫スクリーニングの発見例に関して検討した。その結果は、現時点で10症例が発見され、6,391出生に対して1の割合で

あり、これらのうち明ら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、本年に入り、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。また、MALDI-TOF 質量分析法による高分子タンパク質検出法の確立により高分子タンパク質複合体の検出の可能性も示しており、将来はプロテインチップや組織マッピングへの利用が可能である。さらに、高分子タンパク質の一斉解析が可能となれば、病態解析や人工ワクチンのためのプロファイリング技術などへの応用が考えられる。

また、この腫瘍の生物学的特性の鍵を握るゲノム異常について、本研究班では集中的に検討を重ねて、SNP チップやアレイ CGH の検討から、whole chromosomal gain/loss, partial chromosomal gain/loss, silent の型に分別され、さらに MYCN 増幅を加えた4型が認められた。whole chromosomal gain/loss 型は自然退縮或いは分化するもので、6ヶ月マスでの過剰診断例はこの型を示したことから、今後過剰診断のマーカーとなると考えられた。一方、partial chromosomal gain/loss, silent の型は予後が様々で、詳細な検討は、その遺伝子異常やそれに伴う遺伝子発現に左右されるため、これらの探索が必要となる。

こうした腫瘍特性の鍵を握る遺伝子変化の解明と悪性度の高い腫瘍に特異的なマーカーの検出は、腫瘍の個性であるしそれぞれの悪性度から治療法を選択する個別化医療につながり、神経芽細胞腫の新たな

な治療戦略が構築される。

本邦で20年近く行われたこの事業を通じて得たこのかけがえのない貴重な症例の積み重ねとそれらから得られた腫瘍検体は、この腫瘍に関する多くの知見を我々に与えてつづけてくれている。これらは、世界に類のない唯一無二の財産であり、これらのデータを集積して解析することで、この腫瘍を構成する特性の異なる各グループの発生と自然歴が解明可能である。そのために、腫瘍検体のバンク化と腫瘍特性解析法の標準化が必須であり、それらから学術的・社会的に得られる成果は計り知れない。そこで、本年度は腫瘍バンクにおける腫瘍の登録と使用規定を作成した（添付資料2）。臨床経過が明らかで匿名化の後バンキングされた腫瘍検体を平等に多くの研究者が使用できるバンクを提供することで、この腫瘍の研究は飛躍的に進歩すると考えられ、将来は国外にその門戸を広げるべく進行している。実際、自然に分化・退縮するグループから予後不良なグループまでの症例が数多く登録され、1,000を超える腫瘍検体が保存された。これらを詳細に解析することで、この腫瘍の自然歴や新たな特性が詳細に解明されうると考えられ、予後予測可能なリスク分類が作成され、それに従った治療ガイドラインは、治療法の選別と予後向き上につながる。また、多くの研究者に利用可能な腫瘍バンクであれば、本邦から世界に向け多くの知見が発信され得る。こうしたデータを基に、腫瘍特性から治療が必要な悪性度の高い腫瘍のみを正しく分別し、それらの早期発見をめざした新たなマスキューニング事業を展開し、また、新たな治療法を開発することは、神経芽細胞腫全体としての治療成績の向上につながる。従来のマス事業の反省とともに、この事業で得られたエビデンスを正しく評価することで、初めて国民に納得が得られる成果が示し、この腫瘍の治療成績向上に寄与できる。

現在、世界的にも神経芽細胞腫のリスク分類を行うべくワーキングが活発に行われており、本事業はこれらへの大きな科学的根拠を与えうる研究事業であることに間違いはない。特性の異なる三つのグループそれぞれ正確に評価し、それぞれのグループのリスク分類が可能となれば治療法選択への指針となり、臨床上きわめて有意義である。そこで、現有のデータでリスク分類の本邦案を提示してきた（表

1）。

そこで、本研究班の解析データを基に、本邦の神経芽細胞腫のリスク分類案を提唱した（表1）。国際分類と異なって、病理因子、骨転移、骨髄転移を導入した。さらに、病理所見だけでなく、腫瘍特性の解析が進行すればよりクリアなリスク分類ができるものと考えられ、有用なリスク分類をもとに、新たな治療のガイドラインを策定することで治療成績の向上につながることを期待される。

E. 結 論

①後向きコホート解析：2000年までに発症し、予後・合併症の調査が終了した4,016例（マス発見例2,255例）は、人口動態調査死亡票或いは小児慢性特定疾患データベースから全数のほぼ80%を占めると推定され、ほぼ満足いく登録数と考えられ、これを用いて解析した。その結果、6ヶ月マスは、過剰診断だけでなく、2歳以上の症例の減少による死亡率の低下をもたらしており、この腫瘍の発生と進展におおきなエビデンスを与え、これらから、退縮或いは分化する1型腫瘍を診断することなく、2A、2B型腫瘍を早期に発見できる時期として、生後18ヶ月頃が最適と考えられた。さらに、腫瘍特性の検討から、MYCN増幅は必ずしも腫瘍発生時から生じていないことが示され、予後良好な腫瘍からこうした不良因子を伴ってくる経路の存在も明らかになった。

さらに重要な課題は、これらの多くの解析結果から、神経芽細胞腫のリスク分類を作成することである。本邦の神経芽細胞腫の治療のガイドラインを作成するためにも、コンセンサスを得たりリスク分類を行うことが不可欠であり、その原案を提出した。

②前向き研究：施行時期を変えたマス事業の継続、継続予定の自治体を対象に、過剰診断防止、有意な死亡率減少とコストベネフィットからの効果判定を行うべく、一昨年からの施行時期の検討に引き続き、実施方法などプロトコルを提案した（添付資料1）。有意な結果を出すために施行対象人口を増やすために、施行する地域の拡大と、マスを行わない対象地域の選定も行い、さらに、新たに予後不良腫瘍に特化した腫瘍マーカーを導入することで、新しい前向き研究をして発足をめざしている。さらに、マス施行やマス発見例のインフォームドコンセント

の取得法、治療法の統一化などの問題もほぼ解決され、症例を登録するデータセンターなどは、JNB SG（日本神経芽細胞腫スタディグループ）に協力を依頼し、今後、マスキリーニング再開に対する国民や関係各位のご理解を得るべく、結果の公表、公開講座などを積極的に行うことが必要と考えている。

さらに現在、各症例の悪性度・予後と腫瘍特性データとの関連に加えて、医療費、合併症、QOLを含めたコストベネフィットの面からの解析も行い、その有効性を示した。

③腫瘍特性解析：マスによる予後良好例の発見状況、予後不良例早期発見への効果判定のため、全国各施設での腫瘍特性解析データの集計に伴い、1,000例を超えるデータを得ることができた。しかし、それぞれの施設が独自の手法と判定基準を用いていることから、これらをまずバンキングすることで、有効かつ有意義な研究促進の基盤を作成した。本邦ならではのこの腫瘍バンクの規定を作成し、実際に使用可能とした。さらにゲノム異常を網羅的に解析するSNPsアレイ解析法、アレイCGHにて本腫瘍を幾つかのサブグループに分類し、これらが腫瘍特性と綿密に関わっており、予後良好な型と不良型を分類する最も有効な方法であることを示した。

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、予後向き上に寄与していた。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 E, Yamaoka H, Kamimatsuse A, Onitake Y, Hiyama K, Nishiyama M, Sueda T. Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients. *Journal of Pediatric Surgery*, 41(12) : 2032-2036, 2006.
- 2) Iehara T, Hosoi H, Akazawa K, Matsumoto Y, Yamamoto K, Suita S, Tajiri T, Kusafuka T, Hiyama E, Kaneko M, Sasaki F, Sugimoto T, Sawada T. MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma detected by mass screening. *British Journal of Cancer*, 94(10) : 1510-1515, 2006.
- 3) Hasegawa T, Hiyama E, Wada K, Masujima T. Pre-treatment and one-shot separating analysis of whole catecholamine metabolites in plasma by using LC/MS. *Analytical and Bio-analytical Chemistry*, 385(5) : 814-820, 2006.
- 4) Masujima T, Tsumura N, Hasegawa T. Videovisualization of dynamic cell responses and its molecular analysis for nanomedicine. *Nanomedicine*, 1(3) : 331-343, 2006.
- 5) Sangkhathat S, Nara K, Kusafuka T, Yoneda A, Fukuzawa M. Artificially accumulated β -catenin inhibits proliferation and induces neurite extension of neuroblastoma cell line NB-1 via up-regulation of trkA. *Oncology Reports*, 16(6) : 1197-1203, 2006.
- 6) Niizuma H, Nakamura Y, Ozaki T, Nakanishi H, Ohira M, Isogai E, Kageyama H, Imaizumi M, Nakagawara A. Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene*, 25(36) : 5046-5055, 2006.
- 7) Kikuchi H, Ozaki T, Furuya K, Hanamoto T,