

③②でのマッチング件数が0の場合、マス未受験者とする。

④②でのマッチング件数が2件以上ある場合、登録情報を精査の上、住所等でマス受検者であることを特定する。

⑤登録情報で「マス受検あり」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

以下のセンター、学会、行政データに基づき、死亡例の把握を正確に行う。

NB登録センター

小児外科学会

小児がん学会

小児慢性特定疾患の追跡

死亡個票（利用許可取得済）

6) 疫学検査の倫理指針、個人情報保護法への対応

①上述のデータは、原則として、登録時に代諾者のインフォームドコンセントを得て登録する。

②氏名、性別、生年月日等の個人情報に関しては、マス受診の有無を判定するために必要であることを、マス受診時に全例インフォームドコンセントを得ておく。その際、もし発見された際には、治療介入することの同意を得ることが望ましい。

③インフォームドコンセントの実施方法は、個々の自治体で適切に行うこととする。

9. MS の検査実施方法

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。

10. MS未実施群へのインフォームドコンセント

学会ホームページなどで小児神経芽細胞腫の説明ページを用意するなどして、マス実施群と同程度の知識を持ってもらうように配慮する。

11. 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）

専門医制度とのリンク、小児慢性特定疾患データとの照合などにより、効率のよい全数登録システムをめざす。

関連学会などを通して、小児慢性特定疾患治療研究事業への申請を推奨する作業にて効率の良い登録

システムを推進する。

12. 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

② INSS基準でのステージ分類

③ N-myc増幅、DNA ploidy、1pの欠失、カテコラミン代謝

④治療プロトコールに基づく生物学的データ

13. 統計学的な解析

1) 10万人対標準化死亡率比

2) 10万人対標準化罹患率比

II. 小児神経芽細胞腫マスキリーニングの費用対効果解析

本邦における代表的なマスキリーニング検査としては新生児マスキリーニング検査があり、現在、先天性代謝疾患4疾患、内分泌疾患2疾患の合計6疾患が対象となっている。これら6疾患以外にも多数の先天性代謝疾患や内分泌疾患があり、それらの中にはスクリーニング検査方法が確立しているものもある。しかしながら、マスキリーニングに費やすことができる資源は有限であり、検査方法が確立している先天性代謝疾患の全てをマスキリーニングに加えることは不可能である。したがって、マスキリーニングの導入に際しては、ある疾患にマスキリーニング検査を導入した場合に費やされる資源と、導入によって得られる利益のバランスを考慮し、投入した費用に対する効果（効率）が大きな疾患を優先しなければならない。新生児マスキリーニングにおいてはすでにこのような医療経済的な効率の評価（費用対効果分析）が行われ、現行のマスキリーニング対象疾患の中では、先天性甲状腺機能低下症とフェニルケトン尿症の効率が良いことが明らかにされている（久繁ら、1994）。また今後、新たにある疾患にマスキリーニングを適用しようとする場合においても、費用－便益分析や費用－効用分析に基づいて導入を検討する試みが行われている（久繁ら、2000）。

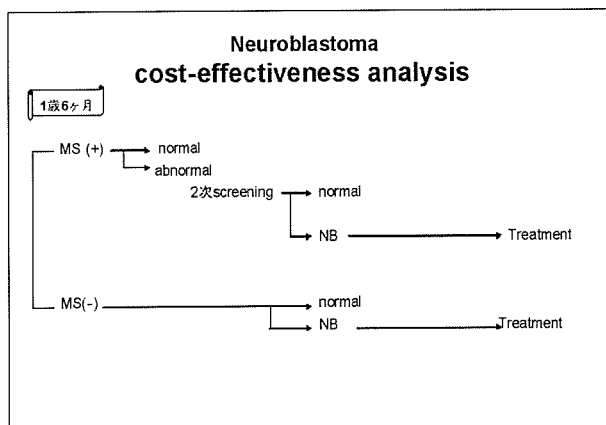
1985年から全国規模で神経芽細胞腫マスキリーニングにおいても、このような費用－便益分析が行われた。当初は肯定的な結論が多く、Sawadaら（1984）も日本でのマスキリーニングが経済的

に有用であると報告している。Scriverら（1987）はカナダでの導入により28万ドルの治療費削減が可能であるとし、Bertholdら（1991）はドイツにおいてマスキング施行により年間180万ドルの治療費削減が可能であるとしている。その後は経済的効率に関する報告はほとんど行われていない。大植ら（1997）は、マスキング発見例がすべて進行すると仮定して経済的意義を認めているが、その一方で、自然退縮例の存在を考慮すると意義が認められなくなる可能性があるとも述べている。その後、欧米そして日本での神経芽細胞腫マスキングの中止により、欧米も含めて本疾患におけるマスキングの費用対効果分析の報告はほとんどみられなくなった。

本研究では、MSの実施時期を1歳6ヶ月にしたときの費用対効果分析の解析計画を立案したので以下で説明する。

1. NBのマス受検から治療までのプロセスと費用の推定

1) マスキングから治療までの診療プロセス



2) 費用の推定

- ・ MS検査1件当たりの費用：約800円
- ・ NB患者1人を発見するのに要する費用：約300万円
- ・ 運用費用 (MS検査試薬代、専任技師の人件費、事務経費など)：年間約4,000万円

3) 6ヶ月 MSにおける NB症例重症度

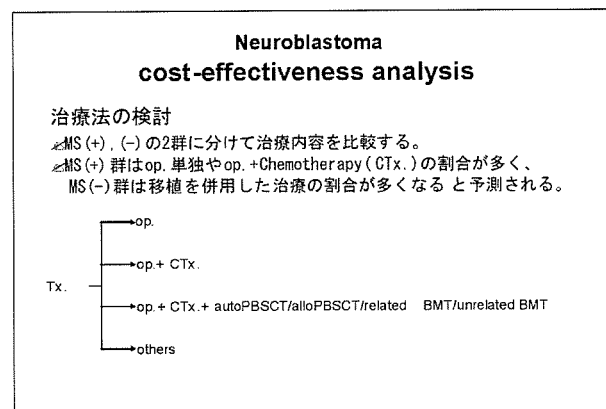
1992～95年に大阪府立母子保健総合医療センターを受診したNB患者41人の内訳

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{MS (+)} \quad 35人 \\ \text{MS (-)} \quad 3人 \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} \text{normal} \quad 5人 \\ \text{abnormal} \quad 30人 \end{array} \right.$$
 6ヶ月未満発症3人

これらの症例の病期は Stage I 9例、Stage II 12例、Stage III 8例、Stage IV A 7例、Stage IV B 4例、Stage IV S 1例で、Stage IIIの1/8例、Stage IV Aの6/7例、Stage IV B 4/4例と進行期のほとんどはMS (-)例であった。

早期例に比して進行例の治療費が高額であること、MS (+) 症例に早期例が多いことから、これらの症例を放置すれば前例進行癌になると仮定すれば、MSは医療費の大幅な軽減につながる。

2. NB症例の治療費に関する推定



平均治療費と平均入院期間

- 手術のみ：約130万円、約1ヶ月
- A 1などの化学療法：約520万円、約5ヶ月
- A 1などの化学療法 + autoBMT：約2,000万円、約9ヶ月
- 無治療経過観察：年間約50万円

MS発見例の治療費の平均は約300万円、進行例の治療費の平均は約1,000万円となり、より高度な治療をするに従って入院期間も長くなり医療費も高騰する。

そこで、MS発見例の治療費を300万円、その症例が放置されて後に進行癌になった時の治療費を1,000万円と仮定すると、症例1例にかかる経費の期待値は計600万円 (=NB1名を発見するのに要するコスト300万円 + その治療費300万円) になる。

しかし自然退縮を考慮するとその割合が40%のときに経費の期待値が600万円と同じになり、それ以

上だと MS を施行する方がむしろ経費がかかることになる（大阪府立母子保健総合医療センター小児外科 大植ら）。

MS の時期を6ヶ月から1歳6ヶ月に変更することにより、自然退縮する Stage IV S 症例を考慮することなく、全症例を適切な治療の対象とすることが可能となるが、その1年間の差の間に発症例の拾い落としがないように留意しなければならない。

Neuroblastoma (NB) cost-effectiveness analysis worksheet 記入項目 (案)

- ・患者 I D
- ・性別
- ・生年月日
- ・診断時住所
- ・診断時月齢
- ・マスキリーニング (あり, なし)
- ・2次マスキリーニング (あり, なし)
- ・画像検査 (CT, MR, RI, X-p, US)
- ・骨髄穿刺 / 生検 (あり, なし)
- ・INSS 分類 (stage1, 2A, 2B, 3, 4)
- ・組織分類 {
 - 神経芽腫(花冠細線維型, 円形細胞型)
 - 神経節腫(高分化型, 混合型, 低分化型)
 - 神経節芽腫
 - 不明
- ・INPC 所見 {
 - Favorable Histology
 - Unfavorable Histology
 - 不明
- ・Ha-ras 発現 (低い, 高い, 不明)
- ・trk A 発現 (低い, 高い, 不明)
- ・N-myc 増幅 {
 - なし
 - あり (FISH 法か PCR 定量法 のコピー数)
 - 不明
- ・カテコラミン代謝 {
 - スクリーニング時 (尿中 VMA/Cr, 尿中 HVA/Cr, 尿中 VMA/HVA 定量) 経時的受診時 (尿中 VMA/Cr, 尿中 HVA/Cr, 尿中 VMA/HVA 定量)
- ・フェリチン値
- ・NSE 値
- ・原発巣 (臓器名, 不明)
- ・治療 (あり, なし)
- ・治療開始年月日
- ・術前化学療法 {
 - なし
 - あり (レジメン, 施行コース数)

- ・手術 {
 - なし
 - 生検のみ
 - 原発腫瘍亜全摘術
 - 原発腫瘍全摘術
 - 全摘+センチネルリンパ節生検
 - 全摘+系統的リンパ節生検, その他)
- ・2回以上の手術 {あり (術式), なし}
- ・手術後再発 {あり (年齢), なし}
- ・化学療法 {
 - あり (レジメン, 施行コース数)
 - なし
- ・放射線照射療法 {
 - なし
 - あり (照射部位, 合計照射量)
- ・移植 {
 - なし
 - auto-PBSCT (施行回数)
 - allo-PBSCT (施行回数)
 - Related BMT (施行回数)
 - Unrelated BMT (施行回数)
 - その他 (名称, 施行回数)
- ・予後 生存
死亡 (死因, 死亡年月日)

Ⅲ. 小児神経芽腫データの多変量解析によるリスク因子の同定

1. 解析の目的

Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析を行い、小児神経芽腫症例の生存時間に影響を与える因子の同定を行う。

2. 解析の方法

1) 逐次変数増減法 (Stepwise法) による Cox 解析を行う。モデルへの変数の投入は、尤度比検定で p 値 < 0.05 のとき行われる。また、p 値 > 0.06 のとき、その変数はモデルから除去される。

2) 候補因子は以下のように処理する。

- ① 2値変数はそのまま候補因子とする。
- ② 順序変数もしくは多値名目尺度変数はダミー変数を作成し候補因子とする。
- ③ 連続変数は折れ線関数を作成し候補因子とする。折れ線関数を候補因子とすることにより、非線形的に変化するハザードの大きさを適切に評価できる。

(折れ線関数の例) 治療開始月齢が18ヶ月未満と18ヶ月以上とで生存予後に大きな違いがあるときに以下の折れ線関数をモデルに入れるとハザードの大きさを正しく推定で

きる。

$$\text{Age18} = \{(\text{治療開始月齢} - 18) + |\text{治療開始月齢} - 18|\} / 2$$

治療開始月齢の場合、12ヶ月、13ヶ月、…。

20ヶ月までのカットオフ点で折れ線関数を作成した。

- 3) 1,800例以上ある項目を候補因子とした。初発症状、国際組織分類、Shimada分類、フェリチン、DNAploidity、TRK-A、腫瘍最大

径は例数が足りないため、別解析で処理した。

- 4) 上述により以下の33項目を候補因子とした。

- ・性別
- ・治療開始月齢
- ・治療開始月齢の折れ線関数 (Age12, Age13, Age14, Age15, Age16, Age17, Age18, Age19, Age20)
- ・発見経路
- ・局所進展度
- ・マス結果
- ・リンパ節転移

カテゴリ変数のコーディング b, c, d, e, f

	度数	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
発見経路 a	1	693	0	0	0		
	2	16	1	0	0		
	3	18	0	1	0		
	4	215	0	0	1		
原発部位 a	1	542	0	0	0	0	0
	2	240	1	0	0	0	0
	3	27	0	1	0	0	0
	4	6	0	0	1	0	0
	5	126	0	0	0	1	0
	6	1	0	0	0	0	1
原発左右 a	1	395	0	0	0		
	2	476	1	0	0		
	3	62	0	1	0		
	4	9	0	0	1		
本邦病期分類 a	1	369	0	0	0	0	0
	2	213	1	0	0	0	0
	3	112	0	1	0	0	0
	4	134	0	0	1	0	0
	5	37	0	0	0	1	0
	6	77	0	0	0	0	1
INSS 病期 a	0	1	0	0	0	0	0
	1	429	1	0	0	0	0
	2	62	0	1	0	0	0
	3	140	0	0	1	0	0
	4	59	0	0	0	1	0
	5	171	0	0	0	0	1
	6	80	0	0	0	0	0

a. 指標パラメータ コーディング

b. カテゴリ変数: 発見経路 (1: VMAマス, 2: 健診, 3: 出生前診断, 4: 医療機関)

c. カテゴリ変数: 原発部位 (1: 副腎, 2: 後腹膜, 3: 骨盤, 4: 腹部, 5: 胸部, 6: 頸部)

d. カテゴリ変数: 原発左右 (1: 右, 2: 左, 3: 正中, 4: 両側)

e. カテゴリ変数: 本邦病期分類 (1: 本邦病期分類 I, 2: II, 3: III, 4: I VA, 5: I VB, 6: I VS)

f. カテゴリ変数: INSS病期 (1: INSS分類1, 2: 2A, 3: 2B, 4: 3, 5: 4, 6: 4S)

- ・ 本邦組織分類 ・ 骨転移
- ・ 本邦組織分類2 ・ 眼窩転移
- ・ 原発部位 ・ 骨髄転移
- ・ 原発左右 ・ 肝転移
- ・ 亜鈴型 ・ 皮膚転移
- ・ VMA ・ 他臓器転移
- ・ HVA ・ 本邦病期分類
- ・ NSE ・ INSS 病期
- ・ LDH
- ・ N-myc 増幅

5) 順序変数ならびに名目尺度変数のダミー変数への変換は以下のとおりである。

3. 解析の結果

生存予後に有意な影響を与えるリスク因子として、以下の因子が選択された。

リスク因子（参照群）	相 対 リ スク	相対リスクの 95%信頼区間
本邦病期分類(病期分類 I)		
病期分類 II	3.29	(0.55, 19.86)
病期分類 III	14.08	(3.16, 62.72)
病期分類 IVA	10.93	(2.40, 49.87)
病期分類 IVB	5.32	(0.99, 28.51)
病期分類 IVS	4.91	(0.85, 28.46)
N-myc 増幅（増幅なし）		
増幅あり	3.35	(2.18, 5.16)
発見経路（VMAマス）		
健診	2.86	(0.34, 24.28)
出生前診断	8.20	(2.58, 26.13)
医療機関	7.72	(3.17, 18.81)
骨髄転移（転移なし）		
転移あり	2.28	(1.32, 3.94)
治療開始月齢（1ヶ月分）	1.01	(1.002, 1.015)

<解 釈>

本邦病期分類、N-myc増幅、発見経路、骨髄転移、治療開始月齢の5因子が、生存予後に有意な影響を与えるリスク因子として選択された。

治療開始月齢については、12ヶ月から20ヶ月までの折れ線関数はどれも選択されず、オリジナルの治療開始月齢が選択された。このことは、12ヶ月から20ヶ月までの間にハザード（瞬間死亡率）が大きく変化する月はないこと、即ち、この期間ハザードは直線的に増加することが示唆された。

本邦病期分類は、Kaplan-Meier法による生存率曲線の推定では、IVA、IVB、IIIの順番で予後不良であったが、Cox解析の結果、相対リスクが高いのはIII、IVA、IVBの順であり、かつ、IVBはI群と有意差がないことが示唆された。逐次変数増減法の解析結果を詳細に分析すると、骨髄転移の有無と本邦病期分類には何らかの交絡があることが示唆された。

逐次変数増減法による Cox 解析の結果

方程式中の変数

		B	標準誤差	Wald	自由度	有意確率	Exp(B)	Exp(B) の95.0 % CI	
								下限	上限
ステップ1	本邦病期分類			126.094	5	.000			
	本邦病期分類(1)	1.043	.913	1.306	1	.253	2.838	.474	16.986
	本邦病期分類(2)	3.246	.753	18.589	1	.000	25.677	5.872	112.284
	本邦病期分類(3)	4.833	.717	45.480	1	.000	125.640	30.836	511.908
	本邦病期分類(4)	3.529	.802	19.369	1	.000	34.084	7.080	164.085
	本邦病期分類(5)	2.282	.866	6.945	1	.008	9.799	1.795	53.498
ステップ2	N-myc 増幅	-1.289	.211	37.408	1	.000	.276	.182	.416
	本邦病期分類			83.431	5	.000			
	本邦病期分類(1)	1.025	.913	1.261	1	.262	2.787	.466	16.682
	本邦病期分類(2)	3.182	.753	17.864	1	.000	24.107	5.511	105.456
	本邦病期分類(3)	4.362	.724	36.297	1	.000	78.419	18.973	324.127
	本邦病期分類(4)	3.324	.803	17.123	1	.000	27.782	5.753	134.156
	本邦病期分類(5)	2.190	.866	6.391	1	.011	8.936	1.636	48.821
ステップ3	発見経路			31.577	3	.000			
	発見経路(1)	1.160	1.085	1.142	1	.285	3.191	.380	26.784
	発見経路(2)	2.656	.557	22.711	1	.000	14.235	4.776	42.434
	発見経路(3)	2.356	.433	29.599	1	.000	10.551	4.515	24.658
	N-myc 増幅	-1.000	.208	22.989	1	.000	.368	.245	.554
	本邦病期分類			29.638	5	.000			
	本邦病期分類(1)	1.117	.915	1.491	1	.222	3.056	.509	18.367
	本邦病期分類(2)	2.603	.761	11.684	1	.001	13.502	3.036	60.059
	本邦病期分類(3)	3.043	.741	16.887	1	.000	20.974	4.912	89.547
	本邦病期分類(4)	2.198	.819	7.200	1	.007	9.009	1.809	44.875
	本邦病期分類(5)	1.786	.873	4.188	1	.041	5.968	1.078	33.033
ステップ4	発見経路			28.867	3	.000			
	発見経路(1)	1.095	1.089	1.012	1	.314	2.990	.354	25.274
	発見経路(2)	2.497	.565	19.563	1	.000	12.145	4.017	36.720
	発見経路(3)	2.303	.439	27.574	1	.000	10.001	4.234	23.620
	N-myc 増幅	-1.047	.209	25.123	1	.000	.351	.233	.529
	骨髄転移	.846	.284	8.896	1	.003	2.330	1.336	4.061
	本邦病期分類			21.900	5	.001			
	本邦病期分類(1)	1.097	.915	1.439	1	.230	2.996	.499	17.993
	本邦病期分類(2)	2.587	.762	11.525	1	.001	13.295	2.985	59.214
	本邦病期分類(3)	2.406	.778	9.556	1	.002	11.095	2.413	51.025
	本邦病期分類(4)	1.538	.855	3.233	1	.072	4.655	.871	24.889
	本邦病期分類(5)	1.361	.891	2.335	1	.126	3.900	.681	22.345

Shimada 分類, フェリチン, DNAploidy を加えて Cox 回帰分析

処理したケースの要約

		N	パーセント
分析で使用されたケース	事 象 a	5	.1%
	打 ち 切 り	172	4.9%
	全 体	177	5.0%
除外されたケース	欠損値のあるケース	3,334	95.0%
	負の時間のあるケース	0	.0%
	ストラータ内で一番早い段階のイベントの前に打ち切られたケース	0	.0%
	全 体	3,334	95.0%
全 体		3,511	100.0%

a. 従属変数：生存期間

モデル係数のオムニバス検定 b,c

ステップ	-2数尤度	全体（得点）			前のステップからの変更			前のブロックからの変更		
		カイ2乗	自由度	有意確率	カイ2乗	自由度	有意確率	カイ2乗	自由度	有意確率
1a	29.665	25.888	1	.000	13.739	1	.000	13.739	1	.000

- a. ステップ番号 1：Shimada 分類で変数が入力されました。
- b. 開始ブロック番号 0, 初期対数尤度関数：-2 対数尤度：43.404
- c. 開始ブロック番号 1, 方法 = 変数増加法ステップワイズ（尤度比）

方程式の変数

ステップ	Shimada 分類	B	標準誤差	Wald	自由度	有意確率	Exp (B)	Exp (B) の95.0% CI	
								下限	上限
ステップ1	Shimada 分類	3,673	1,132	10,525	1	.001	39,363	4,280	362,048

・さらに国際組織分類を加えると11症例のみとなり、解析不能になった。

<解 釈>

症例数、特に死亡例数が極端に少ないので、解析の信頼性が低く公表できる結果は得られなかった。

A. 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 unfavourable 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.
6. 久繁哲徳. マスキングシステムのテクノロジー・アセスメントに関する研究. 厚生省心身障害研究. マスキングシステムの評価方法に関する研究. 平成5年度研究報告, pp63-67, 1994.
7. 久繁哲徳. 【マスキング】新生児スクリーニングの利益と危険,費用判断の分かち合い(解説/特集). *小児科診療*, 63 (9) : 1377-1382, 2000.
8. Sawada T, Todo S, Fujita K, Iino S, Imashuku S, Kusunoki T. Mass screening of neuroblastoma in infancy. *Am J Dis Child*, 136(8) : 710-712, 1982.
9. Scriver CR, Gregory D, Bernstein M, Clow CL, Weisdorf T, Dougherty GE, Auray-Blais C, Giguere R, Lemieux B, Laberge C. Feasibility of chemical screening of urine for neuroblastoma case finding in infancy in Quebec. *CMAJ*, 136(9) : 952-956,1987.
10. Berthold F, Hunneman DH, Kaser H, Harms D, Bertram U, Erttmann R, Schilling FH, Treuner

J, Zieschang J. Neuroblastoma screening: arguments from retrospective analysis of three German neuroblastoma trials. *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 13(1): 8-13,1991.

11. 大植孝治, 井村賢治, 八木 誠, 米田光宏, 井上雅美, 八木啓子, 河 敬世, 入江明美, 竹島清美, 中山雅弘. Cost benefit からみた神経芽腫マスキングの意義. *小児がん*, 34 (2) : 180-184, 1997.

B. 研究発表

1. 論文発表

- 1)鳥谷部真一, 小林久里子, 酒井伸也, 赤澤宏平. DPC関連情報と地理情報システム (GIS) を活用した逆紹介状況の解析. *医療情報学*, 26(1) : 41-46, 2006.
- 2)檜山英三, 家原知子, 米田光宏, 鬼武美幸, 山岡裕明, 澤田 淳, 中山雅弘, 杉本 徹, 林 富, 福澤正洋, 升島 努, 赤澤宏平, 大瀧 慈. 神経芽細胞腫マスキングで得られたエビデンスと今後. *日本マス・スクリーニング学会誌*, 16 (1) : 39-47, 2006.
- 3)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.
- 4)Toyabe SI, Cao P, Abe T, Uchiyama M, Akazawa K. Impact of sociocultural factors on hospital length of stay in children with nephrotic syndrome in Japan. *Health Policy*, 76(3) : 259-265, 2006.

C. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

分担研究報告書

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－

分担研究者 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

家原 知子¹ 赤澤 宏平² 檜山 英三³

¹京都府立医科大学小児科

²新潟大学医歯学総合病院 医療情報部

³広島大学自然科学研究支援開発センター

研究要旨

目的：マスキングの休止後、臨床的に予後良好群の減少及び予後不良例の増加が予測され、これらの症例に対する適切な治療指針とリスク分類の確立が急務となっている。日本の現状にあったリスク分類の確立のため、過去の症例を対象とし、リスクの検討を行った。

対象：86年～98年に檜山班で収集した登録症例、総数3,649症例で解析変数に欠損・矛盾のない症例1,397～1,288例を利用した（分類案により変動あり）。

方法：Overall survival (OS) 診断日を開始日とし、全死亡を最終日とする。さらに Event free survival (EFS) により予想リスクが妥当であるかを検討する。リスクは低、中、高の三群とし、それぞれの5年 EFS を90-100%, 89.9-70%, 69.9%-0%を目標とする。リスク分けの因子としては、年齢18ヶ月、INSS、MYCN増幅の有無、骨転移の有無、病理 INPC を用いた。

結果：MYCN増幅症例では、INSS1は年齢に関らず5年 EFS92.3%と低リスク、INSS 4s は5年 EFS80%と中間リスク、INSS2A/2B, 3, 4は5年 EFS57.1%, 50.3%, 25.4%と高リスクであった。MYCN非増幅症例では、18ヶ月未満の INSS 4s が5年 EFS98.5%と低リスクであり、INSS 4は18ヶ月未満と18ヶ月以上がそれぞれ5年 EFS 91.3%, 39.5%と低リスク、高リスクに分類された。MYCN非増幅の INSS2A/2B, 3については、18ヶ月未満が99%で低リスク、18ヶ月以上は Favorable が100%で低リスク、Unfavorable が25%で高リスクに分類された。これらのリスク分類で症例数を検討すると、低、中、高リスクはそれぞれ86%、0.3%、13.7%であった。

考察：中間リスク群が少ないことはマスキングの影響が考えられ、日本の特徴を示すものと思われた。日本の現状に即したリスク分類に沿った臨床試験が行われることが望まれる。

Summary

The purpose: It is forecast that the number of prognosis good cases decreases and the number of prognosis poor cases increases after stopping the mass screening. The establishment of an appropriate therapeutic guideline and the risk classification for these cases is needed. The prognosis was examined for the past cases for the establishment of the Japanese risk classification. The object: The collect 1,397-1,288 cases were used for an analytical variable, of 3,649 cases that had be diagnosed in 1998 in 1986 and collected in the Hiyama group. The method: For Overall survival rates (OS), the diagnosis day is assumed to be a beginning day, and the final day is all deaths. In addition, whether the expectation risk is appropriate is examined by Event free survival rates (EFS). We divided into three groups (height, intermediate, low), and EFS of each groups were

assumed to 69.9% -0% , 89.9-70% and 90-100% respectively. The age 18 months, INSS, MYCN amplification, presence of the bone metastasis, and INPC were used as a factor for the risk classification. The result: The patients of all ages in stage 1 MYCN amplified were classified into low risk (EFS 92.3%), and the patients of MYCN amplified stage 4s were classified intermediate group (EFS 80%). The MYCN amplified cases of INSS2A/2B, 3, and 4 were classified into high risk group (EFS 57.1% , 50.3% and 25.4% , respectively). Of the MYCN non-amplified cases, INSS 4s and 4 of less than 18 months were classified into low risk group (EFS 98.5% and 91.3%), and INSS 4 of 18 months or more were classified into high risk group (EFS 39.5%). Of the MYCN non-amplified cases, INSS2A/2B, 3 of less than 18 months were classified into low risk group (EFS 99%). A high risk, intermediate risk and low risk was 13.7% , 0.3% and 86% respectively. Consideration: It seemed as the influence of the mass-screening enforcement that the middle risk group was few. It seemed that this showed a special feature of the cases of the neuroblastoma of Japan. It is hoped that the clinical trial is done along the risk classification that matched with the current state of Japan.

A. 研究目的

現在国際的に神経芽腫のリスク分類を統一したものと、International Neuroblastoma Risk Group (INRG) が作成されつつある。INRGは標準化を目指したものではあるが、各国の治療法や検査体制など実情を十分満たすものではない。一方で、我が国ではマス・スクリーニングの休止後、臨床的に今までとは異なる臨床例の分布が予測され、これらの神経芽腫症例に対して、各リスクに沿った適切な治療法の導入を行おうという臨床体制が整い始めている。これらの状況から日本の現状に即した、リスク分類の検討を行った。

B. 対象と方法

86年～98年に日本小児外科学会悪性腫瘍登録、乳児神経芽腫プロトコル、小児がん学会マス・スクリーニング登録に登録された、総数3,649症例で解析変数に欠損・矛盾のない症例1,397～1,288例を利用した（分類案により変動あり）。Overall survival (OS) 診断日を開始日とし、全死亡を最終日とする。さらに Event free survival (EFS) により予想リスクが妥当であるかを検討する。リスクは低、中、高の三群とし、それぞれの5年EFSを90-100%、89.9-70%、69.9%-0%を目標とする。リスク分けの因子としては、年齢

18ヶ月、INSS、MYCN増幅の有無、骨転移の有無、病理INPCを用いた。なお、マス・スクリーニング発見例の影響を除外するために、総数での解析と同時に、マス・スクリーニング発見例を除いた臨床例のみでの解析も行った。まず、COG (Children's Oncology Group) のリスク分類を用いて、日本の登録症例を解析した。さらに、日本独自のリスク分類を創案した。

C. 結果

COGリスク分類に従って日本の登録症例を解析した結果とCOGリスクとの比較では、1歳未満のMYCN非増幅症例でINSS3が5年EFS94.4%と中間から低へ、INSS4が91.1%と中間から低へとリスクダウンが必要であった。MYCN増幅症例ではINSS1が92.3%と高から低へ、1歳未満のINSS4s

表1 COG分類で日本の症例の検討結果

Stage	診断時年齢	MYCN増幅	嶋田病理分類	DNA ploidy	リスク分類	5y-EFS	N
1		-			低	98.9	613
		+			高→低	92.3	15
2A・2B		-			低	96.7	271
		+			高	57.1	7
3	1才未満	-			中等度→低	94.4	55
		+			高	33.3	3
	1才以上	-	favorable		中等度		1
		-	unfavorable		高	54.1	14
4	1才未満	-			中等度→低	91.1	97
		+			高	43.9	26
	1才以上	any			高	21.4	604
4S	1才未満	-	favorable	hyper diploid	低	100	7
			unfavorable	diploid	中等度	87.1	26
		+			高→中	80	5

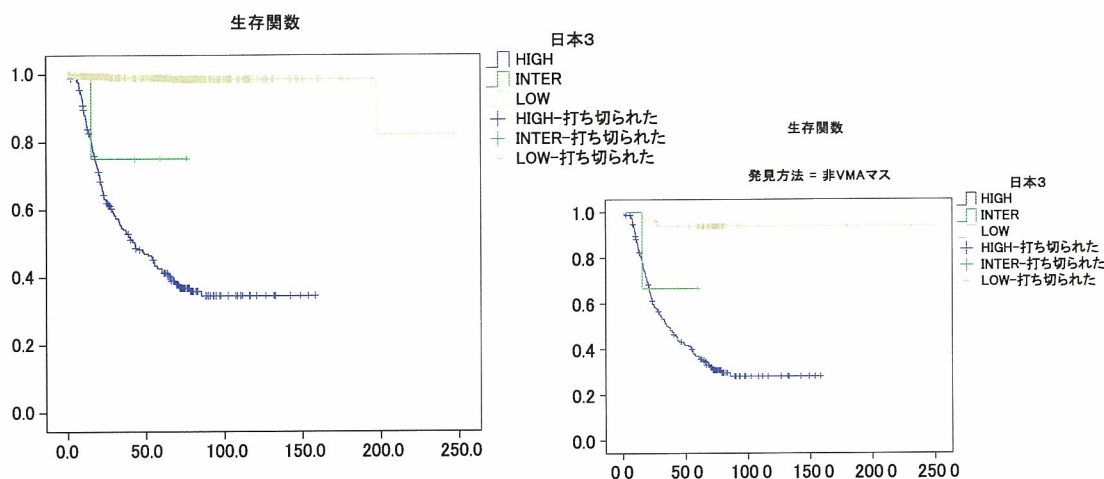
表2 日本リスク案結果

Age	INSS	MYCN	INPC	5EFS	Risk	予測Risk	症例数	死亡数
any	1	any		98.2	Low	Low	1022	20
any	2A,2B,3	+		52.8	High	High	20	3
any	4	+		25.1	High	High	100	73
any	4s	+		80	Inter	High	5	1
<18	2A,2B,3	-	F	98.6	Low	Inter A	211	3
<18	2A,2B,3	-	UF	100	Low	Inter A	7	0
>=18	2A,2B,3	-	F	100	Low	Inter A	3	0
>=18	2A,2B,3	-	UF	25	High	Inter B	8	6
<18	4	-		91.3	Low	Inter A	99	9
>=18	4	-		40	High	High	110	66
<18	4s	-		98.4	Low	Low	130	3

が80%と高から中間へとダウンリスクが必要であった。(表1)

MYCN増幅症例では、INSS1は年齢に関らず5年EFS 92.3%と低リスク、INSS4sは5年EFS80%と

中間リスク、INSS2A/2B, 3,4は5年EFS57.1%, 50.3%, 25.4%と高リスクであった。MYCN非増幅症例では、18ヶ月未満のINSS4sが5年EFS98.5%と低リスクであり、INSS4は18ヶ月未満と18ヶ月



ケース処理要約

日本3	合計 N	事象の数	調査済み	
			N	パーセント
HIGH	263	157	106	40.3%
INTER	4	1	3	75.0%
LOW	1021	13	1008	98.7%
すべて	1288	171	1117	86.7%

図1. 日本リスク案に対する解析結果

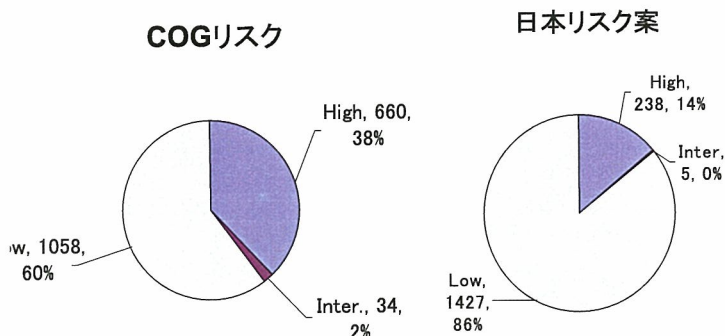


図2. 各リスク群の割合

以上がそれぞれ5年EFS 91.3%, 39.5%と低リスク、高リスクに分類された。MYCN非増幅のINSS2A/2B, 3については、18ヶ月未満が99%で低リスク、18ヶ月以上はFavorableが100%で低リスク、Unfavorableが25%で高リスクに分類された(表2)。以上の高、中間、低リスクの分布はマス・スクリーニング例を除いた臨床発見例のみでも、有意であった(図1)。これらのリスク分類で症例数を検討す

ると、低、中、高リスクはそれぞれ86%、0.3%、13.7%であった（図2）。

D. 考 察

COGリスクでの解析では、一部の群で日本の治療成績が良好でありその結果、COGリスク分類を用いる場合には乳児例の一部とMYCN増幅例の一部でリスクダウンが必要であった。以上の結果から、過去の日本の治療成績に即した、臨床的に有効かつ簡便なリスク分類が必要である。

なお、我が国では18ヶ月以上のINSS1, 2A/2B, 3などの限局性腫瘍が少なくなっておりその結果、中間リスク群が0.3%と少なくなっている。このことは、マス・スクリーニング施行によって、これらの中間リスク群に適合した症例が早期診断され、低リスク群として発見された影響と考えられた。

E. 結 論

登録症例の解析から作成した、神経芽腫リスク分類案は臨床的に簡便かつ日本の現状に即した有効なものと考えられた。

F. 参考文献

1. 家原知子, 杉本 徹, 水田祥代, 澤田 淳. 乳児神経芽腫における治療の軽減. 小児外科, 33(11), 2001.
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. Br J Cancer, 94(10): 1510-5, 2006.
3. Sawada T, Nishi M, Takeda T, Iehara T. Mass Screening for Neuroblastoma in Japan. Medical and Pediatric Oncology, 31: 429-434, 1998.
4. 浜崎 豊, 家原知子, 澤田 淳, 八反田洋一. マスキリーニング発見神経芽腫（乳児神経芽腫）の病理学 Pathology of the infantile neuroblastoma, mostly detected by VMA/HVA mass screening, 小児がん, 38(1): 26-30, 2001.

5. Tanaka T, Matsumura T, Iehara T, Sawada T and Japanese Infantile Neuroblastoma Cooperative Study. Risk of Unfavorable Character Among Neuroblastomas Detected Through Mass Screening. Medical and Pediatric Oncology, 35:705-707, 2000.
6. 田中丈夫, 家原知子, 細井 創, 杉本 徹, 水田祥代, 澤田 淳. 生物学的指標によるマス・スクリーニング発見神経芽腫の腫瘍進展リスクの評価. 小児がん, 41(1): 76-80, 2004.
7. 細井 創, 家原知子, 松本良文, 杉本 徹, 澤田淳. 神経芽細胞腫マスキリーニングの成果と問題点, マス休止にあたり, 文献的考察. 日本がん検診・診断学会誌, 11: 68-73, 2004.
8. 家原知子. 乳児神経芽腫統一治療プロトコルのこれまでと今後. 小児がん, 41(1): 35-38, 2004.
9. 杉本 徹, 家原知子, 細井 創, 澤田 淳. 神経芽腫の早期発見・治療と子どものQOL: 休止となった神経芽腫マスキリーニングの成果と問題点. 京母衛誌, 12: 9-12, 2004.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. Br J Cancer, 94(10): 1510-5, 2006.
- 2) 桑原康通, 杉本 徹. EGFR阻害剤 (gefitinib/イレッサ) の小児固形腫瘍における臨床応用への可能性, 京都府立医科大学雑誌. (0023-6012) 115(10): 739-748, 2006.
- 3) 杉本 徹, 家原知子, 細井 創. 神経芽腫. よく理解できる子どものがん, 別所文雄, 横森欣司編, 永井書店, 東京, 243-257, 2006.

2. 学会発表

- 1) Sugimoto T, Gotoh T, Iehara T, et al. Serum level of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA by real-time quantitative

PCR, 2nd Congress of Asian Society for Pediatric Research, Yokohama, Japan, 12. 8-10, 2006.

- 2) Sugimoto T, Gotoh T, Tamura S, et al. MYCN-amplified Neuroblastoma Cell line Established from a Patient with Long-term-survival and Serum Levels of MYCN DNA during the Clinical Course, ANR, USA, 5. 17-20, 2006.
- 3) Iehara T, Sugimoto T, Sawada T, et al. Comparison of clinical feature between neuroblastoma in infants detected through mass screening and non-mass screening, ANR, USA, 5. 17-20, 2006.
- 4) Iehara T, Sugimoto T, Sawada T, et al. Relapsed neuroblastoma in infants registered in the Japanese Infantile Neuroblastoma Cooperative Study, SIOP, Switzerland, 9. 19-21, 2006.
- 5) 家原知子, 杉本 徹, 澤田 淳, 他. 京都府における18ヶ月マススクリーニング10年間の最終報告. 小児がん学会, 大阪, 11. 24-25, 2006.
- 6) 家原知子, 杉本 徹, 檜山英三, 他. 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－, 小児がん学会, 大阪, 11. 24-25, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む.)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者 金子 安比古 埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所 所長

研究要旨

神経芽腫を早期に発見するために、尿中のカテコールアミン代謝産物を測定するマススクリーニング(マス)が6ヶ月乳児を対象にして日本とカナダ、ドイツで行われた。その死亡率減少効果については相反する結果が報告されている。神経芽腫患者を年齢と発見方法により3群に分類し、それぞれの生物学的特徴を分析することにより、マススクリーニングの恩恵を受けている患者の頻度を予想した。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をFISH法で分析した。また、MYCNがん遺伝子のコピー数をサザン法で分析した。その結果から、神経芽腫を予後良好なtype1腫瘍、予後不良なtype3腫瘍、両者の中間の予後を示すtype2腫瘍に分類した。type1、type2、type3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($P<0.001$)。年齢と発見方法で分類した3群におけるtype1、type2、type3腫瘍の頻度は、それぞれのマス発見腫瘍の良好な、または臨床発見年長児腫瘍の不良な予後と密接に関係していた。マス発見type2腫瘍の病期は早期であり、予後は良好であるが、臨床発見乳児および年長児type2腫瘍の病期は進行期であり、予後は不良であった。従って、マスのターゲットとなる腫瘍はtype2腫瘍であり、これはマス発見腫瘍の10%を占める。Type1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10-15%がマスの恩恵を受けていると推測された。

血清NM23H1蛋白質は悪性リンパ腫や白血病では予後予測因子として確立している。血清NM23H1蛋白質を測定することにより、神経芽腫の予後が予測可能かどうか検討した。対象は217例の神経芽腫患者で、マススクリーニング発見例が131例、臨床的発見例が86例である。ELISA法で血清NM23H1蛋白質を測定し、予後因子や転帰との関係を解析した。血清NM23H1蛋白質濃度は対象小児と比較して神経芽腫患者で高かった($P<0.0001$)。MYCN増幅患者の血清NM23H1蛋白質濃度はMYCNシングルコピー患者と比較して高かった($P=0.0006$)。臨床的に発見された86例を対象にして予後を分析したところ、血清NM23H1蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者と比較して短かった($P=0.034$)。同様の関係はMYCNシングルコピー患者($P=0.04$)、1歳未満の患者($P=0.03$)、第3病期の患者($P<0.0001$)に限定しても確認された。血清NM23H1蛋白質濃度の測定は容易に実施でき、神経芽腫患者の予後予測に役立つので、臨床応用が期待される。しかしながら、前述のtype2腫瘍では血清NM23H1蛋白質濃度は高くならず、尿検査でマス陽性とされた腫瘍の2次的精密検査に用いることは難しいと考えられた。

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、それぞれをマス発見例の54%、3%、3%、臨床発見例の56%、28%、22%に認めた。マス発見例ではRASSF1A単独のメチル化腫瘍が51%、2または3遺伝子が同時にメチル化している腫瘍が3%であるのに対し、臨床発見例ではRASSF1A単独のメチル化腫瘍が23%、2または3遺伝子が同時にメチル化している腫瘍が33%にみられた。臨床発見例の中で、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。マス発見神経芽腫では、臨床的発見腫瘍と異なり、RASSF1A遺伝子のメチル化は病期とは無関係に第1病期から過半数の腫瘍でみられ、予後とも無関係であった。マス発見神経芽腫にRASSF1Aのメチル化例が多いという所見は、神経前駆細胞にRASSF1Aのメチル化が生じており、この現象を反映していると考えられた。

Summary

Mass screening (MS) of neuroblastoma has been carried out by measuring the urinary catecholamine metabolites in infants at the age of 6 months in Japan. We assessed the incidence of neuroblastoma that may be a target for MS by studying tumor biology. FISH on chromosome 1 and *MYCN* analysis was performed on 453 patients that were classified into 3 clinical groups (287 infants found by MS, 51 infants < 12 months diagnosed clinically, and 115 children > 12 months diagnosed clinically). The relationship between the biological types of tumors and the clinical outcome was examined. Type 1 (trisomy 1 and normal *MYCN*), type 2 (disomy 1/tetrasomy 1 and normal *MYCN*) and type 3 (disomy 1/tetrasomy 1 and amplified *MYCN*) tumors were found in 88.2%, 10.5% and 1.4% of infants found by MS, in 68.0%, 24.0% and 8.0% of infants diagnosed clinically, and in 23.4%, 42.3% and 34.2% of children diagnosed clinically ($P < 0.001$). Type 1 infants found by MS or diagnosed clinically had earlier stages of the disease ($P < 0.0001$ and $P = 0.0005$) and better overall survival ($P < 0.001$ and $P = 0.005$) than type 1 children diagnosed clinically. Type 2 infants found by MS had earlier stages ($P = 0.06$ and $P < 0.0001$) and better overall survival ($P = 0.014$ and $P < 0.001$) than type 2 infants or children diagnosed clinically. Type 3 patients in all 3 clinical groups had advanced stages and dismal prognoses. All type 2 and a small proportion of type 1 tumors detected by MS would have progressed to more malignant tumors if undetected by MS, and early treatment of these tumors might have reduced the mortality of the patients.

Prognostic factors in neuroblastoma have been thoroughly investigated and include *MYCN* copy number, TRKA expression level, chromosomal ploidy, 1p loss, and 17q gain in the tumor cells. Laborious and time-consuming work is required to examine these biological factors. We have reported that NM23 genes were overexpressed in various hematological malignancies and that serum NM23-H1 protein levels were useful to predict a patient's outcome. In this study we assessed the clinical implications of serum NM23 protein on neuroblastoma. We examined serum NM23-H1 protein levels in 217 patients with neuroblastoma including 131 found by mass-screening and 86 found clinically by an enzyme-linked immunosorbent assay, and determined the association between this protein level and known prognostic factors or the clinical outcome. The serum NM23-H1 protein level was higher in neuroblastoma patients than in control children ($P < 0.0001$). Patients with *MYCN* amplification had the higher serum NM23-H1 level than those with a single copy of *MYCN*. Overall survival was assessed in the 86 patients, and worse in patients with the higher serum NM23-H1 level (> 250 ng/mL) than in those with the lower level (< 250 ng/mL) ($P = 0.034$). The higher level of NM23-H1 was correlated with a worse outcome in patients with a single *MYCN* copy, or in those with less than 12 months of age, but not in patients with *MYCN* amplification, or in those older than 12 months. Serum NM23-H1 protein levels that are easily measurable predict the clinical outcome of patients with neuroblastoma. However, patients with type 2 tumor mentioned above had not an increased level of serum NM23-H1 protein. Therefore, it may be difficult to use the measurement of serum NM23-H1 protein as the secondary test of patients who were found by the urinary mass screening of neuroblastoma.

RASSF1A, Caspase 8 (CASP8) and DCR2 genes are candidate tumor suppressor and apoptosis-related genes, and the methylation of their promoter or some other regions leads to the inactivation of the 3 genes. We evaluated the methylation status of the 3 genes in 270 neuroblastomas (123 tumors in infants found by mass screening, and 147 tumors in infants or children diagnosed clinically) by methylation-specific PCR. RASSF1A, CASP8 and DCR2 methylations were found in 54%, 3% and 3% of tumors found by mass

screening, respectively, and in 56%, 28% and 22% of tumors found clinically, respectively. Methylation of RASSF1A only and that of the 2 or 3 genes were found in 51% and 3% of the mass screening-positive tumors, respectively, and in 23% and 33% of the tumors found clinically, respectively. While correlation of RASSF1A methylation with the advanced stage and poor outcome was present in the tumors found clinically, such correlation was not present in the tumors found by mass screening. We speculate that RASSF1A might be methylated in neuroblastoma precursor cells, and might be demethylated when the precursor cells progress and form clinically detectable tumors.

A. 研究目的

神経芽腫はもっとも頻度の高い小児固形腫瘍である。乳児期に発見される神経芽腫の予後は良好であるが、年長児になって発見される進行期腫瘍の治癒は困難であるので、予後の改善をめざして日欧で尿によるマススクリーニング（マス）が実施された。欧米の疫学的研究はマスによる死亡率減少効果を否定したが、日本の研究はわずかであるが、死亡率減少効果があると報告した。マスの効果は疫学的に決定されるべきであるが、マスで発見された腫瘍や臨床的に発見された腫瘍の生物学的研究は疫学的研究データの背景やマスのターゲットになる腫瘍の頻度を推定するのに役立つ。私たちは、マスで発見された腫瘍と臨床的に発見された腫瘍のMYCN増幅、1p欠失、染色体 ploidy を分析することにより、その生物学的性格を明らかにし、マスにより恩恵を受けている腫瘍の頻度を推定した。

神経芽腫の予後因子として、腫瘍細胞のMYCN増幅、1p欠失、11q欠失、17q増加、染色体 ploidy などが知られており、プロトコール治療の層別化に用いられている。しかし、これらを診断するには生検や手術により検体を侵襲的に採取する必要がある。1985年より全国で行われた神経芽腫のマスは、2004年3月に中止された。その理由として腫瘍が自然退縮するかもしれない患者に対して、生検や手術など侵襲的な処置を行うという問題点が指摘されたからである。尿検査陽性患者を対象にして、血清中の蛋白質を調べることにより予後不良と予測される神経芽腫患者を選択できれば、侵襲性の少ない検査なので、乳児期マスの問題点を解決できる。NM23H1高発現は神経芽腫、急性骨髄性白血病、悪性リンパ腫の予後不良因子である。また、血清 NM23H1蛋白質高濃度を示す急性骨髄性白血病および悪性リンパ腫患者の予後は不良であると報告されている。そこで、神経芽腫患者の予後が血清

NM23H1蛋白質濃度の測定により、予測可能かどうか検討した。

受精時から胚盤胞形成期にかけて、個体のゲノムに大きなメチル化状態の変化が生じる。神経芽腫は胎児性腫瘍のひとつなので、腫瘍の発生過程にメチル化異常が関与していると予測される。ところで、マスで発見された腫瘍の過半数は、マスで発見されなければ自然退縮していたと考えられる。腫瘍の自然退縮に腫瘍関連遺伝子のメチル化が関与していると仮定し、研究を実施した。

B. 研究方法

1. 453例の神経芽腫を対象にMYCN増幅、1p欠失、染色体 ploidy を分析した。患者は1985年から1998年に手術または生検を受けた乳児（12ヶ月未満）または年長児（12ヶ月以上）である。453例を患者の年齢と発見方法により、MS発見乳児腫瘍287例、臨床的発見乳児腫瘍51例、臨床的発見年長児腫瘍115例の3群に分類した。患者の病期はINSS病期分類により決定した。第1、2病期の乳児、年長児と第3病期の乳児は手術のみか、vincristine と cyclophosphamide による化学療法により、第3、4病期の年長児と第4病期の乳児は日本神経芽腫研究グループのプロトコールにより治療を受けた。

腫瘍細胞の1番染色体の数と1番染色体短腕欠失（1p-）の有無を調べるために、1番染色体テロメア端とセントロメア近傍のプロンプを用いて、腫瘍細胞の間期核を2色FISH法で分析した。また、サザン法によりMYCNがん遺伝子のコピー数を調べた。腫瘍を1番染色体の数とMYCNのコピー数により、生物学的に3群に分類した。すなわち、type 1 (trisomy 1/MYCNコピー数正常)、type 2 (disomy 1/MYCNコピー数正常)、type 3 (disomy 1/MYCNコピー数増幅) である。臨床

的に分類した3群（マス発見乳児腫瘍、臨床的発見乳児腫瘍、臨床的発見年長児腫瘍）と生物学的に分類した3群（type1、type2、type3）の生存曲線をKaplan-Meier法で求め、各群の予後を比較した。

2. 血清 NM23H1蛋白質の分析対象は217例の神経芽腫で、2000年から2002年に手術または生検を受けた乳児（12ヶ月未満）または年長児（12ヶ月以上）である。217例を患者を発見方法により、MS発見腫瘍131例、臨床的発見腫瘍86例に分類した。86例中1歳未満の乳児は29例であった。血清 NM23H1蛋白質をELISA法により、MYCNコピー数をサザン法により、TRKA発現をノーザン法により、ploidyをフローサイトメトリーにより、それぞれ分析した。既知の予後因子や血清 NM23H1蛋白質濃度で分類した患者の生存曲線をKaplan-Meier法で求め、各群の生存率をLog-rank法で比較した。

3. 腫瘍 DNA のメチル化分析対象はマスで発見された腫瘍123例と、臨床的に発見された腫瘍147例である。腫瘍抑制遺伝子 RASSF1A のプロモーター領域、ふたつのアポトーシス関連遺伝子（CASPASE8とDCR2）の発現と関係する CpG island のメチル化状態をmethylation-specific PCR法で分析し、3遺伝子のメチル化状態と臨床像との関係を検討した。

（倫理面への配慮）

検体を研究に用いることについて家族よりインフォームドコンセントを取得した。また、研究内容について、埼玉県立がんセンター倫理審査委員会に提出し、承認を得た。患者のプライバシーを厳守して研究を実施している。

C. 研究結果

1. FISHによる1番染色体の数と1番染色体短腕欠失（1p-）の有無により、453例の腫瘍を4群に分類した（disomy 1/1p正常群56例、disomy 1/1p-群79例、trisomy 1/1p正常群283例、trisomy 1/1p-群35例）。MYCN増幅はdisomy 1/1p正常群にはみられず、disomy 1/1p-群には高頻度（46/79）であり、

trisomy 1/1p正常群とtrisomy 1/1p-群ではまれであった（4/283と1/35）。

trisomy 1/1p正常群とtrisomy 1/1p-群の生存率を臨床的に分類された3群で調べると予後に差はなかったため、両群を一緒にして予後を分析した。disomy 1/1p-群の生存率はdisomy 1/1p正常群に比べて、臨床的分類3群のいずれにおいても不良であった。disomy 1/1p-群でMYCN増幅例の予後はdisomy 1/1p-群でMYCN正常例に比べてMS発見乳児例では不良であったが、臨床的発見乳児群と臨床的発見年長児群では予後に差がなかった。disomy 1/1p正常群とdisomy 1/1p-群でMYCN正常群の予後は分類された3群のいずれにおいても差がなかった。以上の結果から、453例をtype1（trisomy 1/MYCNコピー数正常）313例、type2（disomy 1/MYCNコピー数正常）89例、type3（disomy 1/MYCNコピー数増幅）46例に分類した。

マス発見乳児と臨床的発見乳児type1腫瘍の病期は臨床的発見年長児type1腫瘍より早期であった（ $P<0.0001$ と $P=0.0007$ ）。マス発見乳児type2腫瘍の病期は臨床的発見乳児type2腫瘍や臨床的発見年長児type2腫瘍より早期であった（ $P=0.06$ と $P<0.0001$ ）。type3腫瘍の病期は、どの臨床群においても進行期であった。マス発見乳児と臨床的発見乳児type1腫瘍の予後は臨床的発見年長児type1腫瘍より良好であった（ $P<0.0001$ と $P=0.005$ ）。マス発見乳児type2腫瘍の予後は臨床的発見乳児type2腫瘍や臨床的発見年長児type2腫瘍より良好であった（ $P=0.014$ と $P<0.001$ ）。type3腫瘍の予後は、どの臨床群においても不良であった。

2. 血清 NM23H1蛋白質の測定を、神経芽腫患者217例と対象小児23例について行った。神経芽腫患者の濃度は $176 \pm 280\text{ng/mL}$ であり、対象小児の濃度 $27 \pm 41\text{ng/mL}$ に比べて有意に高かった（ $P<0.0001$ ）。臨床的所見との関係について分析すると、臨床的に発見された患者の血清 NM23H1蛋白質濃度はマスキリーニングで発見された患者に比べて高い傾向を示した（ $P=0.0595$ ）。MYCN増幅患者の血清 NM23H1蛋白質濃度はMYCNシングルコピー患者に比較

して高かった ($P=0.0006$)。血清 NM23H1 蛋白質濃度は年齢、病期、TRKA 発現、ploidy とは関係していなかった。

マススクリーニング発見例は全例、生存していたので、予後解析を実施しなかった。臨床的に発見された86例を対象にして予後を分析したところ、血清 NM23H1 蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者に比較して短かった ($P=0.034$)。さらに、1歳未満の患者 ($P=0.03$) や、第3病期の患者 ($P<0.001$) や、MYCN シングルコピー患者 ($P=0.04$) に限定しても、血清 NM23H1 蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者に比較して短かった。年齢が12ヶ月以上の患者は12ヶ月未満の患者に比べて、第3、4病期の患者は第1、2、4S期の患者に比べて、また、MYCN 増幅患者は非増幅患者に比べて、それぞれ不良な予後を示した。これらの結果は血清 NM23H1 蛋白質濃度が既知の予後因子と同様に神経芽腫患者の予後予測に有用であることを示している。86例を対象に血清 NM23H1 蛋白質濃度、患者年齢、病期、MYCN 増幅の4因子を用いて多変量解析を実施したところ、4因子とも独立した予後因子ではなかった。マススクリーニング発見例を加えた217例を対象にした多変量解析では、病期、年齢、MYCN 増幅の相対危険度が7.3 ($P=0.006$)、3.9 ($P=0.01$)、2.3 ($P=0.04$) であり、独立した予後因子であったが、血清 NM23H1 蛋白質濃度の相対危険度は1.7 ($P=0.16$) であり、予後に対する影響は小さかった。

マスの恩恵を受けるのは前述のように、MYCN はシングルコピーで diploidy を示す type2 腫瘍と考えられる。MYCN 増幅腫瘍患者の血清 NM23H1 蛋白質濃度は非増幅腫瘍患者よりも高く、また、diploid 腫瘍患者と triploid 腫瘍患者間に血清 NM23H1 蛋白質濃度の有意差はみられなかったため、type2 腫瘍患者を血清 NM23H1 蛋白質濃度により選別するのは困難であることが分かった。

3. RASSF1A、CASPASE8、DCR2 のメチル化をそれぞれマス発見例の54%、3%、3%、臨床発見例の56%、28%、22%に認めた。マス発見例では RASSF1A 単独のメチル化腫瘍が51%、2ま

たは3遺伝子の同時メチル化腫瘍が3%なのに対し、臨床発見例では RASSF1A 単独のメチル化腫瘍が23%、2または3遺伝子の同時メチル化腫瘍が33%にみられた。臨床発見例の中で、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。RASSF1A メチル化と病期との関係では、臨床発見例では病期の進行と共にメチル化腫瘍の頻度が高くなったが、マス発見例では第1病期であっても過半数にメチル化が生じていた。

D. 考 察

近年、カナダ、ドイツ、日本から神経芽腫マススクリーニングの死亡率減少効果に関する疫学的研究結果が報告された。3つの研究ともマスにより乳児神経芽腫の発生頻度は高くなることを報告しており、マスは自然退縮腫瘍を多数、発見したことを示唆した。一方、カナダとドイツの研究は死亡率減少効果を否定したが、日本の研究は、わずかであるが死亡率は減少していると報告した。マスの効果は疫学的に決定されるべきであるが、マスで発見された腫瘍や臨床的に発見された腫瘍の生物学的研究は疫学的研究データの背景やマスの恩恵を受けている腫瘍の頻度を推定するのに役立つ。私たちの研究は1番染色体の数と MYCN 増幅の有無から、神経芽腫を予後良好な type1 腫瘍、予後不良な type3 腫瘍、両者の中間の予後を示す type2 腫瘍に分類した。type1、type2、type3 腫瘍の頻度はマス発見腫瘍の88.2%、10.5%、1.4%、臨床的発見乳児腫瘍の68.0%、24.0%、8.0%、臨床的発見年長児腫瘍の23.4%、42.3%、34.2%を占めた ($P<0.001$)。3つの臨床群における type1、type2、type3 腫瘍の頻度は、マス発見腫瘍の良好な、または年長児腫瘍の不良な予後と密接に関係している。マス発見 type1 腫瘍の予後は極めて良好であり、その頻度は高い。一方、臨床的発見年長児 type1 腫瘍の予後は中間であり、頻度は低く、その進行期腫瘍には $1p-$ が高頻度にみられた。以上の所見から、マス発見腫瘍のごく一部は、マスにより発見されなければ、進行期年長児腫瘍として発見されることが推測される。マス発見 type2 腫瘍の病期は早期であり、予後は良好である。一方、臨床的発見乳児および年長児 type2 腫瘍の病期は進行期であり、予後は不良である。この所見から、マスのターゲットとなる腫瘍は type2 で

あることが予想される。これに対して、type3腫瘍はどの年齢でも、どの発見方法でも進行期であり、予後は不良であるので、マスのターゲットにはならないと考えられる。type2はマス発見腫瘍の10%を占め、これにマスで発見されなければ進展すると推測されるごく一部のtype1腫瘍を加えると、マス発見腫瘍の10-15%がマスの恩恵を受けていると考えられる。マスの死亡率減少効果について、日欧で異なる疫学的研究結果が出た背景には、マスで恩恵を受ける患者の頻度が低いので多数例の分析により初めて有意な差を示す結果が得られたと考えられる。

神経芽腫患者217例を対象にしてELISA法で血清NM23H1蛋白質を測定したところ、血清NM23H1蛋白質濃度は対象小児と比較して神経芽腫患者で高かった。MYCN増幅患者の血清NM23H1蛋白質濃度はMYCNシングルコピー患者と比較して高かった。臨床的に発見された86例を対象にして予後を分析したところ、血清NM23H1蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者と比較して短かった。さらに、1歳未満の患者や、第3病期の患者や、MYCNシングルコピー患者に限定しても、血清NM23H1蛋白質濃度が高い患者の生存期間は低い患者と比較して短かった。反対に、1歳以上の患者や、第4病期の患者や、MYCN増幅患者においては、血清NM23H1蛋白質濃度は予後因子ではなかった。これらの所見は、血清NM23H1蛋白質濃度測定による予後診断は、神経芽腫の低リスク群、および中リスク群に適応できることを示している。

多変量解析では血清NM23H1蛋白質濃度は有意な予後因子には成らなかったが、その理由として、観察期間が短いこと、MYCN増幅例と血清NM23H1蛋白質濃度高値例が重なっているためと考えられた。NM23H1はMYCNシグナル伝達系の下流に位置することが知られている。MYCN非増幅例で血清NM23H1蛋白質高値例では、NM23H1遺伝子の変異か増幅が生じている可能性がある。

組織と異なり、血液は容易に患者から採取できる。血清NM23H1蛋白質濃度は神経芽腫の予後因子であると証明されたので、その測定による予後予測は、臨床的に用いられるものと期待される。しかしながら、前述したマス陽性腫瘍の10%を占め、予後改善効果の期待できるtype2腫瘍の血清

NM23H1蛋白質濃度は必ずしも高くないので、この検査をマス陽性例の二次検査として用いることは難しいと考えられる。

神経芽腫と同じ胎児性腫瘍であるウイルムス腫瘍では、H19 differentially methylated regionの高メチル化により、増殖因子であるIGF2が過剰発現している。また、胚細胞腫瘍でも様々な遺伝子のプロモーター領域が高メチル化し、発現消失が起きている。一方、Baylinは幹細胞や前駆細胞においては遺伝子のメチル化が生じていると仮説を立てている。今回の研究結果から、マス発見神経芽腫では、臨床的発見腫瘍とは異なり、病期に関係無く過半数の腫瘍に癌抑制遺伝子RASSF1Aのメチル化が生じていることが分かった。これより以下の仮説を考えた。神経芽腫前駆細胞ではRASSF1Aのメチル化が生じており、マスで発見例においても多数はメチル化状態を保つ。臨床的に発見される腫瘍に進展するとほぼ全ての腫瘍が脱メチル化状態になる。腫瘍がさらに進展し、進行期になると3遺伝子のメチル化が同時に生じる。今後、この仮説が正しいかどうか、多数の遺伝子のメチル化状態を調べ、結論を出したい。

E. 結 論

マスキリーニングの恩恵を受ける腫瘍はtype2腫瘍の全てとtype1腫瘍のごく一部であり、マス発見腫瘍の10-15%と推測された。

血清NM23H1蛋白質濃度は神経芽腫の予後因子である。血液は腫瘍に比べて容易に得られるので、血清NM23H1蛋白質濃度測定による予後予測は臨床的に有用な診断法である。

マス発見神経芽腫では、臨床的発見腫瘍と異なり、RASSF1A遺伝子のメチル化が病期とは無関係に過半数の腫瘍でみられた。神経前駆細胞がメチル化しており、マス発見神経芽腫はこの現象を反映していると考えられた。

F. 参考文献

1. Wood WG, Gao RN, Shuster JJ, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med*, 346: 1041-1046, 2002.
2. Schilling FH, Spix C, Berthold F, et al.

Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med*, 346: 1047-1053, 2002.

3. Yamamoto K, Ohta S, Ito E, et al. Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: cohort study in seven prefectures in Japan. *J Clin Oncol*, 20: 1209-1214, 2002.
4. Hayashi K, Fujita T, Katanoda K, et al. Effectiveness of mass-screening program on neuroblastoma mortality in 1995-2000 birth cohort of Japan: nationwide neuroblastoma mortality study. Presented at 11th conference on advances in neuroblastoma research, Genoa, Italy, June, in abstract p93. 2004; 16-9.
5. 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.
6. Kaneko Y, Kobayashi H, Maseki N, et al. Disomy 1 with terminal 1p deletion was frequent in mass screening-negative/late-presenting neuroblastomas in young children, but not in mass screening-positive neuroblastomas in infants. *Int. J. Cancer*, 80: 54-59, 1999.
7. Kerbl R, Urban CE, Ambros LM, et al. Neuroblastoma mass screening in late infancy: insights into the biology of neuroblastic tumors. *J Clin Oncol*, 21: 4228-4234, 2003.
8. Okabe-Kado J, Kauskabe T, Honma Y, Hanada R, Nakagawara A, Kaneko Y. Clinical significance of serum NM23H1 protein in neuroblastoma. *Cancer Sci*, 96: 653-660, 2005.
9. Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, et al. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood Cancer*, 46: 285-291, 2006.
10. Kaneko Y. Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in

Japan. *Pediatr Blood Cancer*, 48: 245-246, 2007.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaneko Y, Kobayashi H, Watanabe N, et al. Biology of neuroblastomas that were found by mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood Cancer*, 46: 285-291, 2006.
- 2) Kaneko Y. Neuroblastomas that might benefit from mass screening at 6 months of age in Japan. *Pediatr Blood Cancer*, 48: 245-246, 2007.

2. 学会発表

- 1) Kaneko Y, Watanabe N, Tomioka N, et al. Neuroblastoma that might benefit from mass screening. Presented at 11th conference on advances in neuroblastoma research, Genoa, Italy, June, in abstract p72. 2004; 250.1.
- 2) Kaneko Y, Haruta M, Ohira M, et al. Epigenetic alterations of the RASSF1A and caspase 8 genes in neuroblastoma found by mass screening. Advances in neuroblastoma research 12th Conference, Los Angeles, USA, May, in abstract p47, 2006.
- 3) 金子安比古, 春田雅之, 大平美紀, 他. マススクリーニングで発見された神経芽腫における RASSF1A, CASPASE8, DCR2 遺伝子のメチル化異常. 日本人類遺伝学会第51回大会, 米子, 10, 2006.
- 4) 福士大輔, 渡辺直樹, 金子安比古, 他. 神経芽腫の ploidy異常の発生に中心体異常は関与するのか? 第22回日本小児がん学会, 大阪, 11, 2006.
- 5) 春田雅之, 大平美紀, 金子安比古, 他. マススクリーニングで発見されたアポトーシス関連遺伝子のメチル化異常. 第22回日本小児がん学会, 大阪, 11, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし