

Table 1. Dimensionless β parameters obtained for equation 11^a

Equation β parameters		Std.dev. ^b (σ)
P_0	1.45351	0.0009
P_1	0.02064	0.006
P_2	0.49666	0.02
P_3	0.24903	0.07
P_4	-0.31775	0.09
P_5	-1.55653	0.2
P_6	0.08174	0.1
P_7	1.75208	0.3
P_8	0.06235	0.09
P_9	-0.70992	0.2

^aThe values were obtained by iterative minimization of the squared deviation.

^bStandard deviation of the parameter value.

variance coefficient (r^2) was 0.9988 with a confidence interval ± 0.0004 (confidence 99.0%); therefore, we can say that the hyperbolic model fits the SIMION electric potential data very well.

The parameters α and β are plotted in Figure 3, and we can clearly observe that α is best described by a quadratic function $\alpha = J_0 + J_1 [y/r_0 + J_2]^2$, eq 4, where $J_0 = 0.0490$, $J_1 = 0.1907$, and $J_2 = 1.230$. β is described with a polynomial function of the position

$$\beta = \sum_{n=0}^9 P_n \times (y/r_0)^n \quad (5)$$

y/r_0 , and the respective parameters are listed in table 1. The parameters of eq 5 were reported with 5 decimals because high-order polynomials are exponentially sensitive to small variations of the parameters significant digits that lead to considerable interpolation deviations. Using the parameters as indicated in Table 1, the sum of the squared deviations is 5×10^{-5} . But if we use the significant digits, indicated by the standard deviation of each parameter then the sum of the squared deviations of Figure 3b jumps to 1×10^{-3} . The high polynomial was reported because the correlation improved until ninth order, lower was not satisfactory. High order functions are common in analytical and numerical solutions of electric potential, for example, the Kingdon trap electric potential is represented with an infinite series of cosines [24]. Finally, the equations are rewritten in polar coordinates:

$$V_\eta(r, \theta) = V/V_{\text{elect}} = \alpha + 1 - \sqrt{1 + \frac{(r/r_0 \cos \theta)^2}{\beta^2}} \quad (6)$$

$$\alpha(r, \theta) = J_0 + J_1 [r/r_0 \sin \theta + J_2]^2 \quad (7)$$

$$\beta(r, \theta) = \sum_{n=0}^9 P_n \times (r/r_0 \sin \theta)^n \quad (8)$$

When the eqs 7 and 8 are used in eq 6, the solution of the normalized potential is precisely obtained for electrode "1".

By symmetry, the other two electrodes have the same normalized potential if the angle coordinate value is rotated 120° from electrode 1 to electrode 2 and -120° to electrode 3. Thus, $\Theta_1 = \theta$ for electrode "1", $\Theta_2 = \theta - 2\pi/3$ rad for electrode "2", and $\Theta_3 = \theta + 2\pi/3$ rad for electrode "3" where θ is the angle coordinate relative to electrode "1". The composite potential curve can be obtained by simple arithmetical addition of the contribution of all the electrodes (superposition principle) $V(r, \Theta) = V1(r, \Theta) + V2(r, \Theta) + V3(r, \Theta)$, eq 9. Placing eq 6, with the rotation transformations, in eq 9 leads to $V(r, \Theta) = [V1_{\text{elect}} \times V1_\eta(r, \Theta_1)] + [V2_{\text{elect}} \times V2_\eta(r, \Theta_2)] + [V3_{\text{elect}} \times V3_\eta(r, \Theta_3)]$ eq 10, where V_{elect} is the electrode time-dependent voltage and $V_{i,\eta}$ is the normalized potential. The negative gradient of eq 10 leads to the electric field components:

$$E_r = -[V_0 \sin(\omega t) \times \dot{V}1_{\eta r}] - [V_0 \sin(\omega t + \phi_2) \times \dot{V}2_{\eta r}] - [V_0 \sin(\omega t + \phi_3) \times \dot{V}3_{\eta r}] \quad (11)$$

where $\dot{V}i_{\eta r} = \frac{\partial V_{i,\eta}}{\partial r}$ for electrode "i".

$$E_\theta = -[V_0 \sin(\omega t) \times \dot{V}1_{\eta \theta}] - [V_0 \sin(\omega t + \phi_2) \times \dot{V}2_{\eta \theta}] - [V_0 \sin(\omega t + \phi_3) \times \dot{V}3_{\eta \theta}] \quad (12)$$

$$\dot{V}i_{\eta \theta} = \frac{1}{r} \frac{\partial V_{i,\eta}}{\partial \theta} \text{ for electrode "i."}$$

Using eqs 11 and 12, to solve the algebraic procedure $|E| = \sqrt{[(E_r)^2 + (E_\theta)^2]}$, we can write the total electric field as:

$$|E(r, \theta, t, \phi)| = V_0 \sqrt{[A \sin^2(\omega t) + B \sin(\omega t) \cos(\omega t) + C \cos^2(\omega t)]} \quad (13)$$

where

$$A(r, \theta, \phi) = \dot{V}1_{\eta r}^2 + \dot{V}1_{\eta \theta}^2 + 2 \cos(\phi_2) (\dot{V}1_{\eta r} \dot{V}2_{\eta r} + \dot{V}1_{\eta \theta} \dot{V}2_{\eta \theta}) + 2 \cos(\phi_3) (\dot{V}1_{\eta r} \dot{V}3_{\eta r} + \dot{V}1_{\eta \theta} \dot{V}3_{\eta \theta}) + 2 \cos(\phi_2) \cos(\phi_3) (\dot{V}2_{\eta r} \dot{V}3_{\eta r} + \dot{V}2_{\eta \theta} \dot{V}3_{\eta \theta}) + \cos^2(\phi_2) (\dot{V}2_{\eta r}^2 + \dot{V}2_{\eta \theta}^2) + \cos^2(\phi_3) (\dot{V}3_{\eta r}^2 + \dot{V}3_{\eta \theta}^2)$$

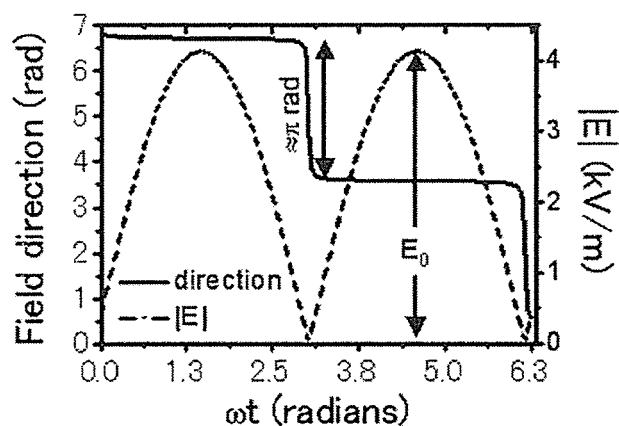


Figure 4. Typical tripole radial electric field showing a sinusoidal shape and its direction periodically becomes opposite. E_0 is the maximum field in the AC field period.

$$\begin{aligned}
 B(r, \Theta, \phi) = & 2\sin(\phi_2)(\dot{V}_{1\eta r}\dot{V}_{2\eta r} + \dot{V}_{1\eta\theta}\dot{V}_{2\eta\theta}) \\
 & + 2\sin(\phi_3)(\dot{V}_{1\eta r}\dot{V}_{3\eta r} + \dot{V}_{1\eta\theta}\dot{V}_{2\eta\theta}) \\
 & + 2\cos(\phi_2)\sin(\phi_2)(\dot{V}_{2\eta r}^2 + \dot{V}_{2\eta\theta}^2) + 2[\cos(\phi_2)\sin(\phi_3) \\
 & + \cos(\phi_3)\sin(\phi_2)](\dot{V}_{2\eta r}\dot{V}_{3\eta r} + \dot{V}_{2\eta\theta}\dot{V}_{3\eta\theta}) \\
 & + 2\cos(\phi_3)\sin(\phi_3)(\dot{V}_{3\eta r}^2 + \dot{V}_{3\eta\theta}^2)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 C(r, \Theta, \phi) = & 2\sin(\phi_2)\sin(\phi_3)(\dot{V}_{2\eta r}\dot{V}_{3\eta r} \\
 & + \dot{V}_{2\eta\theta}\dot{V}_{3\eta\theta}) + \sin^2(\phi_2)(\dot{V}_{2\eta r}^2 + \dot{V}_{2\eta\theta}^2) \\
 & + \sin^2(\phi_3)(\dot{V}_{3\eta r}^2 + \dot{V}_{3\eta\theta}^2)
 \end{aligned}$$

Calculation of the Tripole Pseudopotential

Figure 4 is the typical plot of the tripole time-dependent electric field at certain r, Θ position (eq 13), which consists of a phase shifted oscillating field with frequency “ ω ” and the direction of the field periodically shifts to opposite. As a consequence, the ion also oscillates in a combination of a fast micromotion and a slow macromotion shown in Figure 6. These observations allowed us to apply the pseudopotential theory. The field amplitude (E_0) was numerically calculated and placed in eq 1 to calculate the tripole pseudopotential $\Psi(r, \Theta)$ while for multipoles, eq 2 was placed in eq 1 and the results are shown in Figure 5.

We observed that the ions coming from the entrance plate and flying along the axis lost kinetic energy (KE) after entering in the tripole or, in the case of higher voltage, they were reflected back at the edge of the tripole entrance. We reasoned that the average effect of the axial field should not be zero. We could not develop a calculation for the axial pseudopotential, instead our calculation works for the axial position far from the entrance, where the axial field is zero. Figure 1 shows that the existence of the axial potential is not surprising because the AC voltage in any pole always becomes intermediate (marked with +) with the other two poles

(++) and (–). This AC voltage and the tripole symmetry never neutralize the electric field in the tripole center, while the conventional multipoles symmetry and polarized AC voltages neutralize the electric field in the center. This axial potential may cause difficulties injecting ions with low energies or energy spreads, in comparison with other multipoles; nevertheless, the axial potential should be good for ion focusing because it is easier to focus ions, the kinetic energies of which have been decreased by the axial potential.

The radial pseudopotential well depth for tripole is $9.5e-3$ V while for quadrupole is $2.4e-2$ V, hexapole $5.6e-2$ V, and octapole $1.0e-1$ V. The well depth of the multipoles compared with tripole is 2.5, 5.9, and 10 greater, respectively, so the confining capability is stronger in conventional multipoles than in tripole.

In brief, a fast and reliable method to calculate tripole radial electric field and pseudopotential was successfully developed. Tripole and quadrupole pseudopotential share some similarity in their radial distribution, density, and penetration. The pseudopotential field shows the tripole capacity to keep the ions inside the field space with stable oscillations.

Results and Discussion

Comparison Between the Ion Guiding of the Tripole and the Conventional Multipoles Without Background Gas

Using a tripole with $r_0 = 3$ mm, the r_e/r_0 ratio = 2.2 optimized the ion stable transmission. The ratio = 2.2 was not critical because different ratios slightly decreased the ion transmission. Wide ranges of AC voltages can be applied to the tripole to get stable ion trajectories (Figure 6a–c) for ion masses from 500 to 4000 Da, and we called these regions “AC-mass stability diagrams”, Figure 6a. The conventional multipoles have wider stability diagrams (blank area); however, the tripole shows a wide stability diagram useful for efficient ion guiding. The tripole stability boundaries changed with the field radius and beam conditions (data not shown). For this reason, it is not possible to state that tripole boundary will always be narrower or wider than the multipoles. This stability boundary dependence with the initial conditions shows that tripole ion guiding is very similar to the high order multipoles (hexapole and octapole), the stability diagrams of which are not defined because x and y motion are strongly coupled [15].

In brief, the tripole stability limits are diffuse but wide and useful for ion guiding. Thus, the tripole ion guiding performance is satisfactory for high and low masses. From an ion guiding point of view, tripole belongs to high order multipoles because of the undefined ion stability.

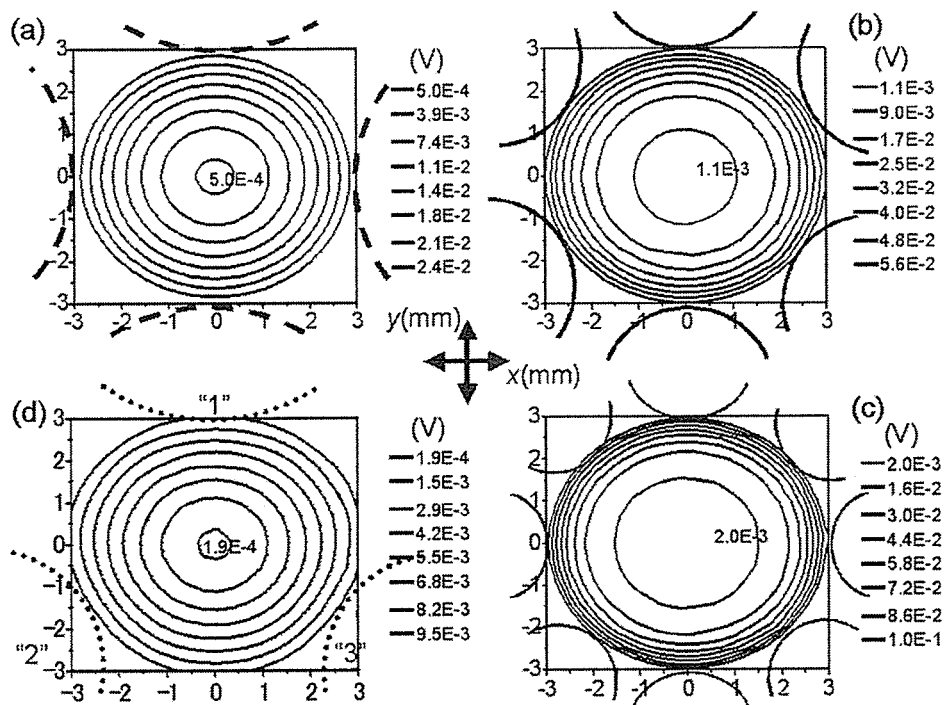


Figure 5. Radial pseudopotential contour in volts for the multipoles and tripole cross-section. All graphs show that the minimum point is in the center of each multipole and increases when it moves to the electrodes. Calculation conditions: $V_0 = 10$ V, $\Omega = 1$ MHz, $r_0 = 3$ mm, 1000 Da, ion charge = +1. (a) quadrupole; (b) hexapole; (c) octapole; (d) tripole.

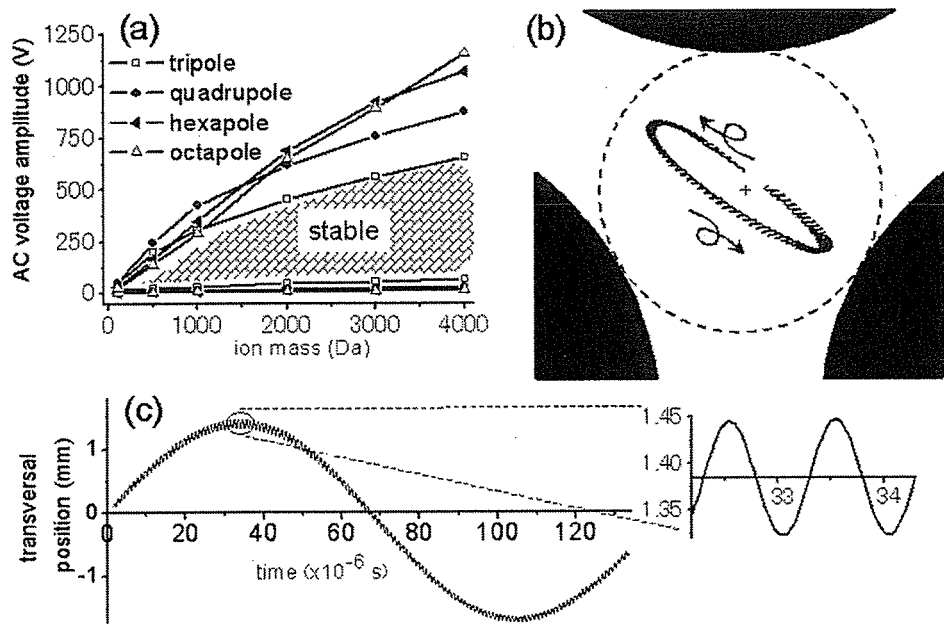


Figure 6. Ion guides AC voltage for stable ion guiding and tripole stable trajectory. 1 MHz, length 150 mm, $r_0 = 3$ mm. Beam initial conditions: kinetic energy 10 eV, expansion angle 3° , and initial radius = $0.5 \times r_0$. (a) AC-mass stability diagrams; (b) cross-section view; (c) transversal view of the ion stable movement inside of the tripole rotational electric field.

Comparison Between the Collisional Focusing of the Tripole and Conventional Multipoles

The focused beam radius was taken as the average of the distance from the central axis to each ion maximum oscillation, just before the device end. The tripole focused beam radius was much smaller than the hexapole and octapole and similar to the quadrupole when the initial momentum was equal to 2.30×10^{-21} kg m/s (Figure 7a and b). The AC voltages in Figure 7a and b were optimized for quadrupole and tripole as shown in Figure 7c, while hexapole and octapole focusing almost did not improve with the AC voltage due to the high initial kinetic energy, low gas pressure, and short multipole length. The range of mass between 1000 to 2000 Da was better focused with a certain voltage while the range between 3000 to 5000 Da focused well with a higher voltage. It was not possible to focus the whole mass range with a single high voltage because the AC field was too strong to keep stable low masses; also it is not recommendable to use high field because of the danger of collision over-heating for low masses.

The reason of tripole and quadrupole focusing superiority lies in their pseudopotential, which gradually falls to a minimum located in the center and contains the ions in regions of low radius, while not for hexapole and octapole, Figure 5. The quadrupole pseudopotential is steeper than that of the tripole, but the tripole compensates this with axial pseudopotential, which damps the ion kinetic energy and the beam becomes easier to guide and focus.

In brief, the quadrupole and tripole offer better collisional focusing than hexapoles and octapoles. The tripole or quadrupole are preferred for applications where the smallest possible focused beam diameter is required. Hexapoles and octapoles may be preferred where it is desirable to keep the electrical fields near the center as low as possible, to avoid AC heating. Quadrupole should have higher AC heating than tripole because quadrupole pseudopotential depth is higher.

Tripole Mass Selective Electric Field and DC-AC Stability Ranges

The mass selective electric field in the tripole could be accomplished when the AC phase shift of electrode "3" (Figure 1) was changed from the symmetrical 120° to the asymmetrical 20° and by adding DC voltage to electrode "1". Tripole presented voltages ranges of DC and AC voltages that transmit ion masses for the given initial conditions, analogous to the quadrupole theoretical stability diagram when it is defined in voltage terms [25]. The shape of the diagram was also triangular with the narrowest transmission at the top or apex and the peak of ion transmission versus AC amplitude extracted from the apex. The height of the peak was taken to 80% and its width was measured at 25% of the peak height, which is a stricter definition than the conventional full-width at half-maximum.

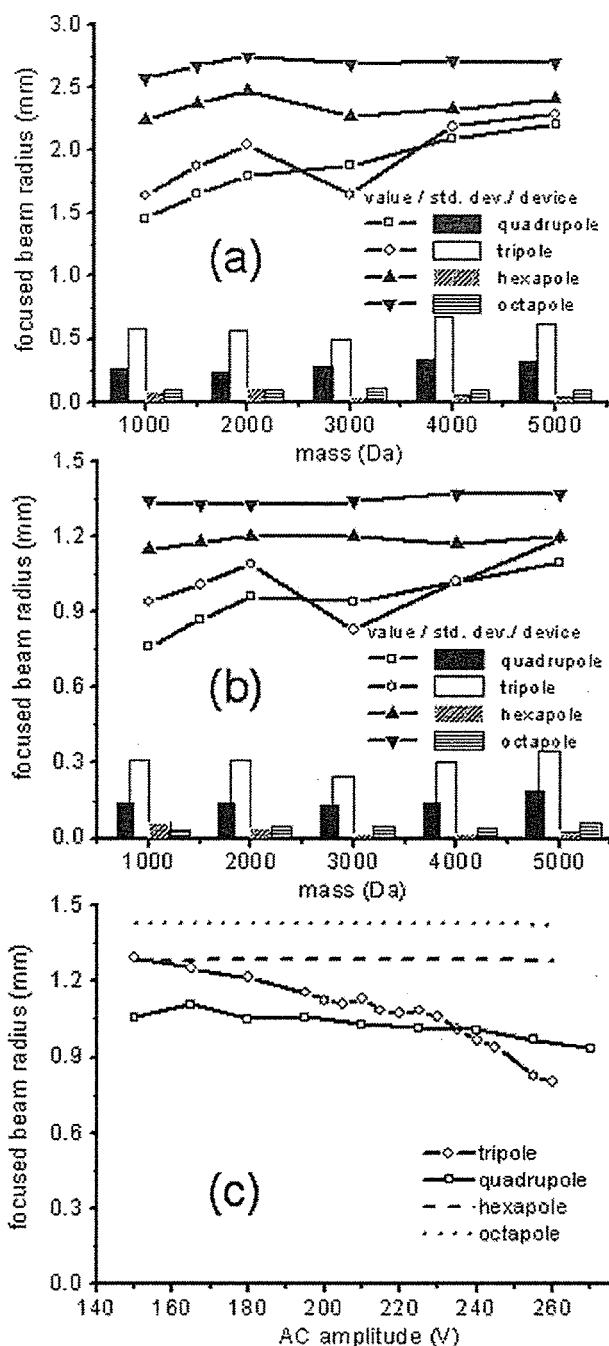


Figure 7. Focused beam radius. 3 mTorr N_2 gas, 1 MHz, multipole length 150 mm; initial conditions: groups of 100 ions, momentum = 2.30×10^{-21} kg m/s, beam radius = $0.5r_0$. (a) $r_0 = 6$ mm, $V_0 = 510$ V for masses 5000 to 3000 Da, $V_0 = 370$ V for masses 2000 to 1000 Da; (b) $r_0 = 3$ mm, $V_0 = 255$ V for masses 5000 to 3000 Da, $V_0 = 175$ V for masses 2000 to 1000 Da; (c) typical minimization of the beam radius by AC voltage in the case of $r_0 = 3$ mm and mass 3000 Da. Tripole and quadrupole presented more focused beam than the other multipoles.

The mass resolution was calculated as the ratio between the AC voltage amplitude divided by the peak width, in voltage ($R = \text{mass}/\Delta\text{mass} = V_0^{\text{apex}}/\Delta V_0$). The resolution in the tripole mass filter was not higher than 20 for the range of conditions: r_0 (3 to 6 mm), AC

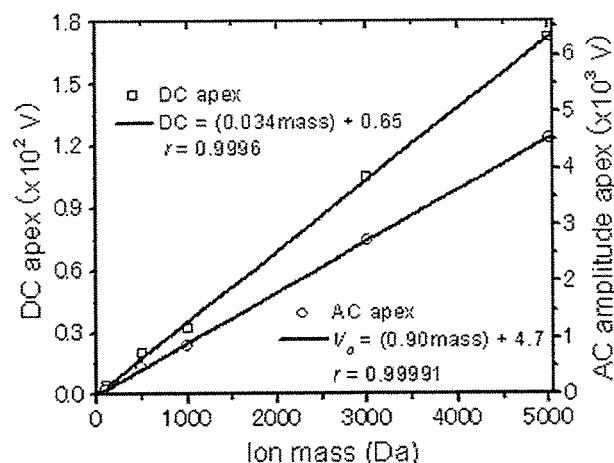


Figure 8. Linear relationship of the ion mass with the DC (U) and AC ($V_{o,p}$) amplitude voltages at the stability diagram apex. Mass selection and scanning can be done by controlling the electric conditions. $\varphi_1 = 240^\circ$, $\varphi_2 = 0^\circ$, and $\varphi_3 = 20^\circ$, $r_0 = 6$ mm, $\Omega = 1$ MHz, ion charge = +1.

frequency (700 to 1000 kHz), ion mass (500 to 3000 Da). The resolution of the quadrupole mass filter was much higher; nevertheless, the tripole presented clear mass filtering behavior. The ion stability in the tripole should have an ion positional dependence similar as in hexapoles and octapoles [26] affecting the AC field mass selection, and for this reason, every transmission peak presented tails. Further studies should be done to explain the presence of the tail at AC voltage higher than the peak center. Another important aspect of mass filtering is that the DC and AC voltages at the top of the stability diagram (mass selective voltages) must have a relationship with the mass, to precisely scan and select the ions. As seen in Figure 8, tripole fulfilled this need.

Tripole Mass Selective Pseudopotential and Filtering Mechanism

The Figure 9a shows the pseudopotential, calculated with the developed mathematical model (eq 13) when

tripole uses only AC voltage and the electrode "3" phase shift is 20° (asymmetric phase $\varphi_2 = 0$ rad, $\varphi_3 = 1/9\pi$ rad, $\varphi_1 = 4/3\pi$ rad). The model is not fulfilling boundaries conditions because some lines are orthogonal to the electrodes, and for this reason the pseudopotential is restringed to the field space. Thus, Figure 9a data is a more qualitative than an exact result.

The values of minimum pseudopotential are localized between electrodes "2" and "3," and the pseudopotential increases when it moves to electrode "1." When the phase shift between electrodes "2" and "3" is close (0° and 20°), their voltage difference is always low, while the phase shift of electrode "1" (240°) is well separated from the other two electrodes. This situation creates almost a dipole field with a very little rotational degree that, in overall effect, pushes the ions downward where the field is weak. If negative DC voltage is applied to the electrode "1," in the case of positive ions, a constant force attracts the ions toward electrode "1." The ion trajectory is stable depending on the ion mass, DC^{apex} and V_o^{apex} values. This is simply Newton's law, doubling the mass and doubling the force (or voltage) gives the same equation of motion and the same transmission.

Figure 9b illustrates the ion trajectories when the DC voltage is fixed at the apex and V_o is changed for the same mass. The holed-insulator, located at the end of the tripole, avoids the ions with unstable trajectories to continue to the next ion optic, similar to the function of a sector mass spectrometer exit slit. Even the insulator introduces a charging problem; it must remain inside of the tripole mass selecting field. Outside of the tripole system the deflecting field is weak and the metal exit plate focuses all the ions, independently of their masses.

Conclusions

The tripole shares some properties with the quadrupole and high order multipoles. The tripole pseudopotential contour was symmetrical when symmetrical phase shifts were applied. The tripole pseudopotential penetrates similarly as the quadrupole pseudopotential. The

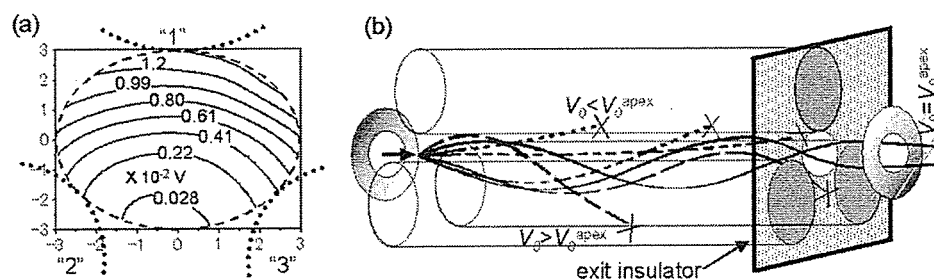


Figure 9. (a) Tripole mass filter pseudopotential contour in the field space. phase shift $\varphi_1 = 240^\circ$, $\varphi_2 = 0^\circ$, and $\varphi_3 = 20^\circ$, $r_0 = 3$ mm, 1000 Da, AC 1 MHz, $V_o = 10$ V. The region of minimum pseudopotential is below the center. (b) SIMION simulated trajectories for tripole ion filtering: (dotted line) the AC voltage is lower than the voltage at the apex of the stability diagram; (solid line) the AC voltage is equal to the voltage at the apex of the stability diagram; (broken line) the AC voltage is higher than the voltage at the apex of the stability diagram.

tripole AC voltage ranges were wide and useful for stably guiding high range of masses, comparable to other multipoles. Quadrupole and tripole offer better collisional focusing than high order multipoles (hexapole and octapole) because the pseudopotential can contain the ions near the center.

A mass selective electric field was created in the tripole by applying DC voltage to one electrode and changing the AC phase shift from the symmetrical 120° to the asymmetrical 20° . The ion mass selective mechanism consisted of a balance between the DC voltage with the pseudopotential (AC average effect) acting in contrary directions. The mass selective DC and AC voltages had linear relationship with the mass, thus mass scanning was possible. The resolution in the tripole mass filter was much lower than for the rod pole quadrupole mass filter; nevertheless the tripole presented clear mass filtering behavior and is useful for rough mass filtering. This work opens a new field for investigation: multipoles with $(2n + 1)$ odd numbers of rods and with the AC applied with phase shifts of $2\pi/(2n + 1)$.

Acknowledgments

This research was partially supported by the Japan Ministry of Education, Science, Sports, and Culture Grant-in-Aid for Scientific Research.

References

- Blaum, K.; Gepperta, C.; Muller, P.; Nortershauser, W.; Wendt, K.; Bushaw, B. A. Peak Shape for a Quadrupole Mass Spectrometer: Comparison of Computer Simulation and Experiment. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *202*, 81–89.
- Guilhaus, M.; Selby, D.; Mlynski, V. Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2000**, *19*, 65–107.
- Herbert, G.; Johnstone, R. *Mass Spectrometry Basics*. CRC Press LLC: Boca Raton, Florida, 2003; pp 371–382.
- Kapitsa, P. L.; *Zh. Eksperim. i Teor. Fiz.* **1951**, *21*, 588.
- Tolmachev, A.; Kim, T.; Udseth, H. Simulation-Based Optimization of the Electrodynamic Ion Funnel for High Sensitivity Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *203*, 31–47.
- Dehmelt, H. Yu. N. Paul-Straubel-Kingdon Trap for True Zero-Point Confinement of an Individual Ion and Reservoir. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 10031–10033.
- Armentrout, P. 2003; Theory and Ion Chemistry. Gross, M.; Caprioli R., Eds.; In *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*; pp 181–195. Elsevier: Amsterdam.
- Peik, E. Electrodynamic trap for neutral atoms. *Eur. Phys. J. D.* **1998**, *1*, 183.
- Douglas, D. J.; Frank, A. J.; Mao, D. Linear Ion Traps in Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 1–29.
- Tolmachev, A. V.; Udseth, H. R.; Smith, R. D. Modeling the Ion Density Distribution in Collisional Cooling RF Multipole Ion Guides. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *222*, 155–174.
- Dehmelt, H. G. Radiofrequency Spectroscopy of Stored Ions. I. Storage. *Adv. At. Mol. Phys.* **1967**, *3*, 53–72.
- Douglas, D. J.; French, J. B. Collisional Focusing Effects in Radio Frequency Quadrupoles. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 398–408.
- Chernushevich, I. V.; Thomson, B. A. Collisional Cooling of Large Ions in Electrospray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1754–1760.
- Lopez, M. F.; Mikulskis, A.; Kuzdzal, S.; Bennett, D. A.; Kelly, J.; Golenko, E.; Dicesare, J.; Denoyer, E.; Patton, W. F.; Ediger, R.; Sapp, L.; Ziegert, T.; Lynch, C.; Kramer, S.; Whiteley, G. R.; Wall, M. R.; Mannion, D. P.; Della Cioppa, G.; Rakitan, J. S.; Wolfe, G. M. High-Resolution Serum Proteomic Profiling of Alzheimer Disease Samples Reveals Disease-Specific, Carrier-Protein-Bound Mass Signatures. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 1946–1954.
- Gerlich, D. Applications of RF Fields and Collision Dynamics in Atomic Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 581–590.
- Tanner, S. D.; Baranov, V. I.; Bandura, D. R. Reaction Cells and Collision Cells for ICP-MS: A Tutorial review. *Spectrochim. Acta B* **2002**, *57*, 1361–1452.
- Dahl, D. A. SIMION for the Personal Computer in Reflection. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *200*, 3–25.
- Rao, R.; Bhutani, A. Electric Hexapoles and Octapoles with Optimized Circular Section Rods. *Int. J. Mass Spectrom.* **2000**, *202*, 31–36.
- Douglas, D. J.; Kononkov, N. V. Influence of the Sixth and Tenth Spatial Harmonics on the Peak Shape of a Quadrupole Mass Filter with Round Rods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1425–1431.
- Dahl, D. http://www.simion.com/examples/dahl_drag.prg.
- Quarby, S. T.; Yost, R. A. Fundamental Studies of Ion Injection and Trapping of Electrosprayed Ions on a Quadrupole Ion Trap. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *190/191*, 81–102.
- Valentine, S. J.; Counterman, A. E.; Clemmer, D. E. A Database of 660 Peptide Ion Cross Sections: Use of Intrinsic Size Parameters for Bona Fide Predictions of Cross Sections. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 1188–1211.
- Gillig, K. J.; Bluhm, B. K.; Russell, D. H. Ion Motion in a Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Wire Ion Guide Cell. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1996**, *157/158*, 129–147.
- Dawson, P. H. *Quadrupole Mass Spectrometry and Its Applications*; American Institute of Physics Press: Woodbury, New York, 1995.
- Hagg, C.; Szabo, I. New Ion-Optical Devices Utilizing Oscillatory Electric Fields. II. Stability of Ion Motion in a 2D Hexapole Field. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1986**, *73*, 237–275.

発がんの数理モデル

大瀧 慈

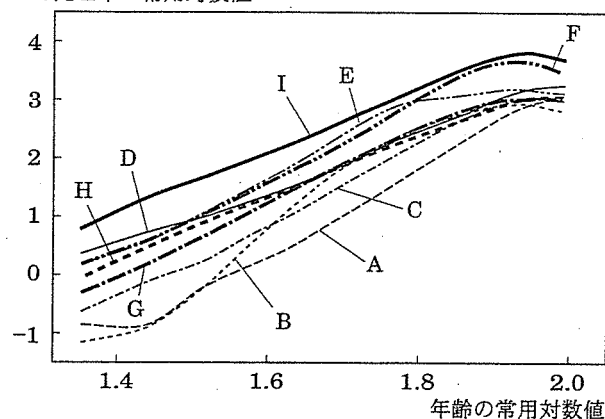
●広島大学原爆放射線医科学研究所

はじめに

ヒトの年齢別がん死亡率が、ほぼ年齢の5~6乗に比例するという事実は、すでに1950年ごろから多くの研究者によって注目されていた。図1は、横軸に年齢の常用対数値、縦軸に1975年から1994年までの20年間で全日本における主要部位別がん死亡率(ただし、乳がんや前立腺がんなど性ホルモンの影響が強いと思われる部位のがんは除外している)の常用対数値をプロットしたものである。この図より、各部位別の曲線が両対数グラフの中でほぼ直線状にプロットされることが見て取れる。すなわち、年齢 t でのがん死亡率を y_t とすると近似的に、
$$\log(y_t) = a + b \log(t),$$
が満たされており、がん死亡率 y_t が年齢 t の b 乗に比例して増大しているとみなされる。

このような観察事実に対して、「がんの前臨床的期間(腫瘍の生長期)の長さ、および診断時から死亡までの期間の長さは、出生からがん細胞の出現までの時間に較べて十分短く無視できること」を前提に当初2通りの数理モデルが提案され理論的説明が試みられた。その一つは、Multicell理論であり、「一つの組織の中の細胞ががん化するためには、 k 個($k=6\sim7$)の細胞において、それぞれ独立に変異が生じなければならない」という仮説に基づくものである。他の一つは、MullerやNordlingによるMultistage理論である。この理論は「1個の細胞のがん化は、その細胞においてある一定の非可逆的な複数の状態(以下、stageという)の変化を経ることにより初めて生ずる」という仮説に基づくものである。そして、これらの理論による上述の観測事実の説明に際して、「それぞれの変異を引き起こす曝露の強さは、出生から死に至るまでの生涯にわたって、

がん死亡率の常用対数値



がん死亡率の常用対数値

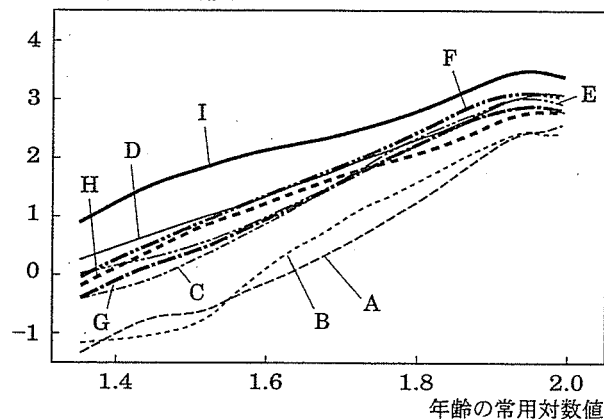


図1 日本における固型がんの部位別年齢別死亡率曲線(両対数グラフ、上図が男性、下図が女性)
A. 膀胱がん, B. 食道がん, C. 胆嚢がん, D. 大腸がん, E. 肝臓がん, F. 肺がん, G. 膵臓がん, H. 直腸がん, I. 胃がんについて、1975年~1994年の20年間で日本全国を対象とする人口動態統計データより算出されたものである。

ほぼ一定の水準にあること」が仮定された。その後、ArmitageとDollは、Multistage理論に基づいて、がん罹患危険度と年齢や曝露との関連性について数理的な説明を試みた[1]。以下、本稿ではMultistage理論に基づく発がん過程のモデル化について詳説し、がん罹患や死亡危険度に関するデータ解析

への応用や今後への課題について論ずる。

多段階発がん過程の Armitage-Dollモデル

いま、1個の正常な標的細胞(がん化しうる細胞で、ある条件を満たす幹細胞と考えられている)ががん化するまでには、 k 個の変異が必要であり、変異の個数は時刻とともに単調に増加するものとする。そして、正常細胞(変異を起こしていない細胞)の状態を0-stage, 最初の変異から2番目の変異の直前までの状態を1-stage, 以下、一般に*i*番目の変異の直後から*i*+1番目の変異の直前までの状態を*i*-stageという。なお、($k-1$)-stageまではがん細胞としての特徴を持たないが、 k -stageになると“がん化”して無限に増殖を繰り返すようになるものとする(図2参照)。

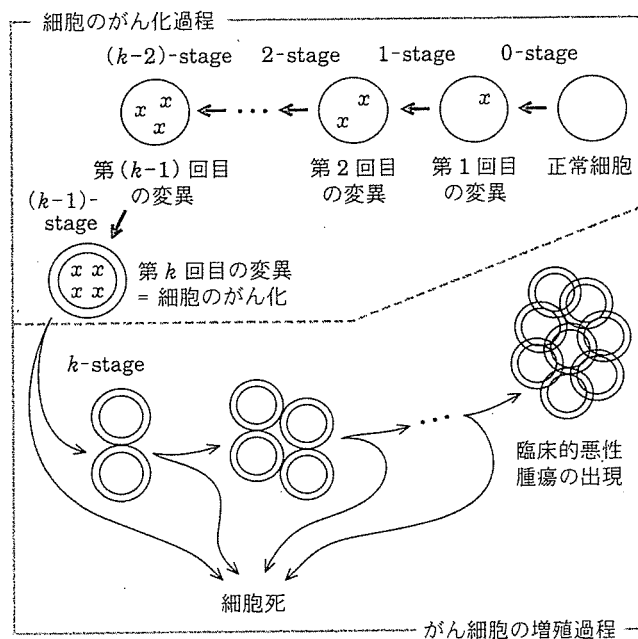


図2 発がんに関する多段階モデルの模式図(k -stageモデル)

0-stage から ($k-1$)-stage までの各 stage の期間の長さは互いに独立な確率変数であるとし、時刻0に出生したヒトの ($i-1$)-stage に位置する1個の細胞において、時刻 t のときに i -stage への変異が発生するという事象の瞬時発生率(stageの推移強度と表現することもある)は

$$\eta_i(t) = \lambda_i [1 + \beta_i c(t)], \quad i = 1, \dots, k \quad (1)$$

により記述できるものとする。ここで、 λ_i はヒトの

年齢や時刻には依存しない定数、 $c(t)$ は時刻 t における付加的な発がん関連因子への曝露強度を表す非負関数、 β_i は曝露による stage の推移強度への寄与の程度を表す係数(曝露影響係数と呼ばれ、母数として扱われる)である。ヒトは常時ある一定の水準の発がん関連因子に曝露されているが、原爆被爆、放射線事故、喫煙、アスベスト被曝などを通じて、付加的な曝露を受けるものと考えられる。もし、付加的曝露を無視できる状況であれば、 $c(t) = 0$ であるとみなされ、年齢 t での対象とする部位において最初のがん細胞が出現する危険度は、近似的に

$$\lambda_1 \lambda_2 \dots \lambda_k t^{k-1}$$

に比例するようになる。この数理モデルを含むがん罹患の年齢・曝露依存性に関する数理モデルを Armitage-Doll モデルと呼ぶ。したがって、付加的曝露が一定の状況下では、がんの前臨床期間の長さを w とすると、年齢 t におけるがん罹患危険度は $\lambda_1 \lambda_2 \dots \lambda_k (t-w)^{k-1}$ にほぼ比例する。そして、 w が十分に小さいとすると、がんの罹患危険度は年齢のほぼ $k-1$ 乗に比例することが導かれ、先述の疫学的経験則は、 $k = 6 \sim 7$ を想定することにより説明を与えることができることとされた。近年、多くの動物実験や分子生物学的知見が蓄積されるに伴い、ヒトの固型がんに対しては複数の遺伝子の機能異常や不全が関わっていることが実証され、多段階発がん仮説の信憑性が高いことが明らかにされてきている[13]。次節では多段階仮説に基づいた発がん過程の数理モデル化をポアソン過程の枠組みの中で行い、その結果得られるがん罹患危険度の年齢依存性や付加的曝露による用量(放射線量、以下、線量という)反応関係(用量と反応との関係)について考察する。

一般化 Armitage-Dollモデルの導出

付加的曝露がヒトの出生以降死亡時に至るまでほぼ一定とみなされる場合、がん罹患の年齢依存性は上記の Armitage-Doll モデルで説明できるが、曝露の寄与を検出することは難しい。一方、広島・長崎での原爆被爆者やチェルノブイリ原子力発電所事故の場合のように、曝露強度が時間やヒトの年齢

に大きく依存して変動する状況下では、がん罹患危険度における年齢変化や経年変動を通じて、さらに付加的曝露の線量情報が得られる場合には線量反応関係により、曝露と発がん危険度との関連性を定量的に評価できる可能性が出てくる。ただし、それを実現するにはより精緻な数理モデル化が必要である。その一つの方法が非定常ポアソン過程の適用によるモデル化である。式(1)において、曝露影響係数 β_i の値が stage(i) によらず一定 (β) であるとする、年齢 t での各 stage の推移強度は

$$\eta_i(t) = \lambda_i \{1 + \beta c(t)\} = \lambda_i \theta(t), \quad (2)$$

$$i = 1, \dots, k$$

と表記できる。すなわち、各推移強度関数はすべての stage に共通な年齢の関数 $\theta(t)$ と相対的な推移の起こりやすさを表すスカラーである λ_i の積で表されることになり、後述するように古典的なポアソン過程の自然な拡張が導かれる。このモデルは Armitage-Doll のモデルの特別な場合として導出されたのであるが、 k -stage への到達までの待ち時間の分布(次節)に関して、Chiang らの研究により密度関数や分布関数などが解析的に表記できることが知られており [3]、発がん危険度の年齢依存性や曝露との用量(線量)反応関係を詳細に解析するための有効な手がかりを与えてくれるものである。

ポアソン過程における待ち時間分布

本節では、前節の(2)により1個の正常細胞ががん細胞に変異するまでの過程を数理的に定式化して、その過程における待ち時間(腫瘍の生長時間と呼ばれる)の分布について考察する。まず、問題を明確にするために対象とする過程を非斉次ポアソン過程として定義することから始める。

定義1 細胞の発がん過程は、正常細胞から悪性がん細胞までの k 段階 S_0, \dots, S_k で構成されており、 $S_{i-1} \rightarrow S_i$, $i = 1, \dots, k$ の時刻 t での推移強度が $\lambda_i \theta(t)$ で表され、他の推移はないものとする。

定義1により定められた過程において、時刻0を起点とするときの最終段階 S_k へ到達するまでの待

ち時間 T_k の分布に関して、下記の命題1と命題2および命題3が導かれる。

命題1 もし $\lambda_1 = \lambda_2 = \dots = \lambda_k (= \mu > 0)$ であれば、ポアソン過程と呼ばれているものであり、待ち時間 T_k の分布は、下記のような密度関数と分布関数で表される。

$$f(t|\mu) = \frac{\mu^k}{(k-1)!} \theta(t) \Theta(t)^{k-1} e^{-\mu\theta(t)}, \quad (3)$$

$$F(t|\mu) = 1 - e^{-\mu\theta(t)} \sum_{i=0}^{k-1} \frac{\mu^i}{i!} \Theta(t)^i. \quad (4)$$

ただし、 $\Theta(t) = \int_0^t \theta(u) du$ である。

さらに一般的な内容の命題として、下記のような命題2が[3]により与えられている。

命題2 k 個の正值スカラー $\lambda_1, \dots, \lambda_k$ ($\lambda_i \neq \lambda_j$, $i \neq j$) が与えられているとき、待ち時間 T_k の分布は、下記のような密度関数と分布関数で表される。

$$g(t|\lambda) = \left(\prod_{j=1}^k \lambda_j \right) \theta(t) \sum_{i=1}^k e^{-\lambda_i \theta(t)} \prod_{j \in I_i^{(k)}} \frac{1}{\lambda_j - \lambda_i}, \quad (5)$$

$$G(t|\lambda) = 1 - \sum_{i=1}^k e^{-\lambda_i \theta(t)} \prod_{j \in I_i^{(k)}} \frac{\lambda_j}{\lambda_j - \lambda_i}, \quad (6)$$

ただし、 $I_i^{(k)} = \{j | j \neq i, j = 1, \dots, k\}$ である。

上記の命題1および2は下記の補題1および数学的帰納法を用いることで証明することができる。

補題1 k 個の正值スカラー $\lambda_1, \dots, \lambda_k$ ($\lambda_i \neq \lambda_j$, $i \neq j$) が与えられているとき、

$$\sum_{i=1}^k \prod_{j \in I_i^{(k)}} \frac{\lambda_j}{\lambda_j - \lambda_i} = 1, \quad (7)$$

$$\sum_{i=1}^k \prod_{j \in I_i^{(k)}} \frac{1}{\lambda_j - \lambda_i} = 0, \quad (8)$$

が成り立つ。

補題1の証明：正方行列 A_k を次式により定める。

$$A_k = \begin{pmatrix} 1 & 1 & \dots & 1 \\ \lambda_1 & \lambda_2 & \dots & \lambda_k \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \lambda_1^{k-1} & \lambda_2^{k-1} & \dots & \lambda_k^{k-1} \end{pmatrix}$$

いま、 A_k の行列式(Vandermondeの行列式と呼ば

れる)に関して, $|A_k| = \prod_{i=1}^{k-1} \prod_{j=i+1}^k (\lambda_j - \lambda_i)$ を得る. よって, A_k の $(1, i)$ 成分の余因子を C_i とすると,

$$C_i = (-1)^{i-1} \left(\prod_{j=1}^k \lambda_j \right) \prod_{j=1}^{k-1} \prod_{\substack{l=j+1 \\ l \neq i}}^k (\lambda_l - \lambda_j).$$

よって, $|A_k| = \sum_{i=1}^k C_i$ より, (7) が導かれる.

次に, 行列 A_k の第 k 行を $(1, \dots, 1)$ で入れ替えて得られる行列を B_k とすると, $|B_k| = 0$. このとき, B_k の第 (k, i) 要素の余因子を W_k とすると,

$$W_k = (-1)^{k-1} \prod_{j=1}^{k-1} \prod_{\substack{l=j+1 \\ l \neq i}}^k (\lambda_l - \lambda_j).$$

よって, $|B_k|/|A_k| = \sum_{i=1}^k W_i/|A_k|$ より (8) を得る.

命題2の証明: まず, $\theta(t) = 1$ の場合について, 数学的帰納法により証明する. $k=1$ のとき, $g_1(t|\lambda_1) = \lambda_1 e^{-\lambda_1 t}$ ($t \geq 0$) で (5) は満たされている. $k=m$ のとき, (5) が満たされているとする. このとき, T_{m+1} の密度関数は,

$$\begin{aligned} g_{m+1}(t|\lambda_1, \dots, \lambda_m, \lambda_{m+1}) &= \int_0^t g_m(t-z|\lambda_1, \dots, \lambda_m) g_1(z|\lambda_{m+1}) dz \\ &= \left(\prod_{i=1}^{m+1} \lambda_i \right) \left\{ \sum_{i=1}^{m+1} \frac{e^{-\lambda_i t}}{\prod_{j \in I_i^{(m+1)}} (\lambda_j - \lambda_i)} \right. \\ &\quad \left. - e^{-\lambda_{m+1} t} \sum_{i=1}^{m+1} \frac{1}{\prod_{j \in I_i^{(m+1)}} (\lambda_j - \lambda_i)} \right\}. \end{aligned}$$

よって, 補題1の(8)より, 第2項は0となるので, $k=m+1$ のとき(5)が満たされる. また,

$$\begin{aligned} G_k(t|\lambda_1, \dots, \lambda_k) &= \int_0^t g_k(z|\lambda_1, \dots, \lambda_k) dz \\ &= \sum_{i=1}^k \prod_{j \in I_i^{(k)}} \frac{\lambda_j}{\lambda_j - \lambda_i} - \sum_{i=1}^k e^{-\lambda_i t} \prod_{j \in I_i^{(k)}} \frac{\lambda_j}{\lambda_j - \lambda_i}, \end{aligned}$$

であるので, 補題1の(7)より(6)が導かれる.

同様にして, $\theta(t)$ が一般の非負関数の場合にも, dt を $d\theta(t) = \theta(t) dt$ で置き換えることで証明することができる.

命題3 いま, (f, F) および (g, G) をそれぞれ (3), (4), (5) および (6) により定められる密度関数と分布関数とする. k 個の正値スカラー $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_k$ ($\lambda_i \neq \lambda_j, i \neq j$) の幾何平均値を $\mu = (\lambda_1 \cdots \lambda_k)^{1/k}$ とするとき, T_k の密度関数と分布関数に関して下

記の不等式が得られる,

$$\begin{aligned} &\sup_{0 \leq \tau \leq t} \frac{|G(\tau|\lambda) - F(\tau|\mu)|}{F(\tau|\mu)} \\ &\leq \sup_{0 \leq \tau \leq t} \frac{|g(\tau|\lambda) - f(\tau|\mu)|}{f(\tau|\mu)} \\ &\leq \frac{1}{2} \left\{ e^{(\bar{\lambda} + \mu)\theta(t)} - e^{2\mu\theta(t)} + 1 - e^{-(\bar{\lambda} - \mu)\theta(t)} \right\}. \end{aligned} \tag{9}$$

ただし, $\bar{\lambda} = \max\{\lambda_1, \dots, \lambda_k\}$ である.

命題3の証明: 不等式(7)の前半部分については, 任意の正値の確率密度関数と分布関数の場合であることを用いて一般論として導くことができる. 不等式(9)の後半は, $g(\tau|\lambda)$ を級数展開し, 係数を評価することで得られる. その証明の詳細については, [7]を参照のこと.

一般化Armitage-Dollモデルでのがん罹患危険度

曝露強度関数 $c(t), t \geq 0$ が与えられ, かつ, 式(2)が成り立つものと仮定できる場合, 他疾患による死亡の発生と個々の細胞における発がんに関する変異の発生が独立であるとする, 時刻0のときに出生したヒトにおいて, 年齢 t の時点で1個のがん細胞が発生するという危険度関数は, 標的細胞の総数を N とすると, $\lambda_1, \dots, \lambda_k$ が0に近い正値スカラーと考えられるために, 既述の命題1, 2 および 3 より,

$$\begin{aligned} h_0(t) &\cong N \frac{f(t|\mu)}{1 - F(t|\mu)} \\ &\propto \{1 + \beta c(t)\} \left\{ t + \beta \int_0^t c(u) du \right\}^{k-1} \end{aligned}$$

で近似的に表現できる. さらに, このようながん細胞から一定の割合で増殖して腫瘍を形成するものが存在するものと仮定し, 臨床的に診断されるまでの待ち時間(腫瘍の生長時間)を w とすると, 年齢 t でのがん罹患の危険度は, $\zeta h_0(t-w)$ で表される. ここで, ζ はある正の定数である.

上記の議論では, 時刻と年齢の区別を行っていないが, 一般論としては, 数理モデルを疫学的データに当てはめる際にそれらを厳密に区別しておかねば

ならない。例えば、単純な状況として、曝露を異なる世代で共有する場合、時刻 y の時点で年齢 t のヒトにおけるがん罹患の危険度は、

$$h(t|y-t) \cong \zeta\{1+\beta c(y-w)\} \times \left\{y-w+\beta \int_{y-t}^{y-w} c(u) du\right\}^{k-1}$$

と表現できる。この特別な場合として、付加的曝露が時点 a における瞬間的なもののみである場合(この種の曝露は点曝露と呼ばれている)、付加的曝露量を D とすると曝露強度関数は Dirac の δ 関数を用いて、 $D\delta(y-a)$ により表されるので、時刻 y のとき年齢 t (ただし、 $y-t < a < y-w$) のヒトにおけるがん罹患の危険度は、

$$h(t|y-t, D) \cong \zeta(t-w+\beta D)^{k-1} \cong \zeta(t-w)^{k-1} \left\{1+(k-1)\frac{\beta}{t-w}D\right\}$$

と表される。よって、このときの曝露を受けていない群に対する曝露量 D の群での発がんの超過相対危険度(Excess Relative Risk)は、 $\beta D/(t-w)$ が十分小さいとき、近似的に

$$ERR(t, D) \cong (k-1)\frac{\beta}{t-w}D \quad (10)$$

で表される。すなわち、このモデルにより低曝露量の場合の用量反応関係はほぼ線形であり、その傾きは年齢の増加と共にほぼ年齢の逆数のオーダーで減少することが示唆される(図3参照のこと)。

原爆被爆者に対する経年的観察調査研究により得られた部位別がん罹患や死亡データに対して、式(10)の当てはめによる線量効果、被爆時年齢効果、(到達)年齢効果などの推定が行われ[10]、この理論式が大枠において適合することが確認されている。そのほかにも、ウラニウム鉱山労働者におけるラドン被曝および喫煙習慣と肺がん発生の関連についての解析などが行われ、モデルの有用性が示されている[9]。なお、Armitage-Doll モデルやその一般化モデルの範疇に入らないモデルとして、Moolgavkar らによる2事象モデルや中間細胞増殖モデルなども提案されている[6]。

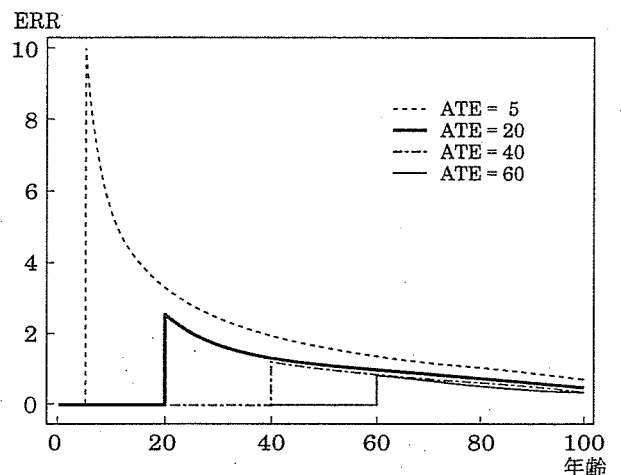
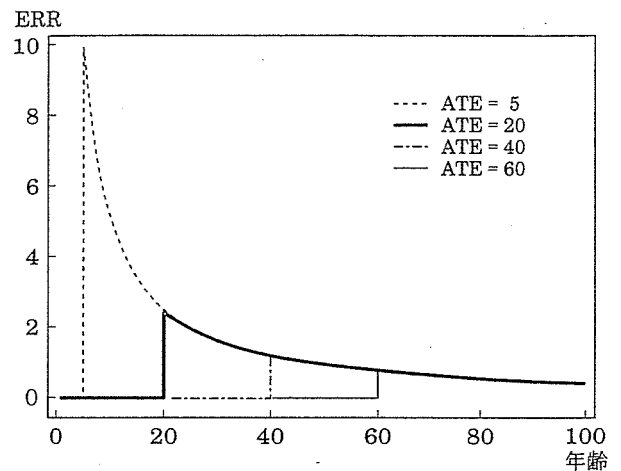


図3 点曝露の場合のがん罹患の超過相対危険度(ERR):原爆による放射線被曝を想定し、式(10)に基づいて算出したもの。腫瘍の生長期間の長さ(w)は5年としている。上図は、放射線による発がんへの感受性に年齢依存性がないものと仮定した場合であり、下図は若齢者でその感受性が指数関数的に高くなる状況を仮定して、被曝時年齢別(ATE=5歳、20歳、40歳、60歳)に求めたものを示している。

発がん数理モデルを扱う際に考慮すべき諸問題

◎—— 曝露感受性における年齢依存性や個体差

最新の研究によれば、ヒトが放射線や化学物質などの発がん因子に曝露された場合、若年齢での被曝の方が高齢者に比べて相対的に高い発がん感受性があるのではないかと考えられている。喫煙率や食習慣、生活様式、大気汚染や上水道の水質などの時代変化により、発がんに関する環境の曝露強度も時代変化をしているはずであるが、その時々への曝露に対してより若い世代が強く影響を受けていることが想定される。その結果、がん罹患やがん死亡の発生危

険度において、いわゆる出生コホート効果(生まれた年代ごとの世代に共通した効果)と呼ばれる世代間変動が生じうるものと考えられる。このように、曝露強度と発がん過程における stage の推移強度の関連性を式(1)や(2)のような単純な一次式で記述することは不十分であり、より一般には、時刻 y において曝露強度が $c(y)$ であるとき、年齢 t のヒトにおける同推移強度は、 $\{1+\omega(t)\}\beta c(y)$ のように記述されるべきであろう[8]。上述の若齢者で相対的に高い曝露感受性を持つ状況については、 $\omega(t)$ は t が小さい(0に近い)ときに大きな値をとり、加齢とともに単調減少し0に収束するような関数により表現されるものと考えられる。

一方、曝露の種類や強度には個体差がありその実態の把握は完全には行えないものと思われる。例えば、原爆被爆者の被爆線量においても個人ごとの線量の誤差の標準偏差は平均値の20%を超えている可能性が指摘されている。また、肺がん罹患の要因としてタバコの喫煙が知られているが、疫学的調査研究において、個人ごとの喫煙状況が経年的に観察されている例は皆無に近い。最近、さらに困難な問題も注目され始めている。同じ曝露を被曝しても発がん危険度に関して感受性に個体差が存在するというのである。例えば、P450と呼ばれる酵素活性を規定する因子に関わる遺伝子の型の違い(遺伝子多型と呼ばれている)が肺がんと密接に相関すること[2]、実際、遺伝子 CYP2A6 は煙草に含まれる発がん物質ニトロソアミンを活性化して肺がん罹患しやすくさせるらしく、同遺伝子を欠損するヒトは肺がん罹患の危険度が低いとの研究も報告されている。このようながん感受性の個体差の存在を考慮にいれたリスク解析を行うには、ランダム効果母数や潜在変数の導入によるモデルの拡張も重要と考えられる[5, 12]。

◎— 腫瘍の生長期間の長さ

既述の発がん数理モデルでは、正常細胞が発がん化するまでの過程を主に扱っており、がん化した細胞の出現から後のがんが臨床的に診断されるまでの期間(腫瘍の生長期間)の長さについては、十分短いことが前提とされている。実際の発がん過程を考察す

る際に、そのような前提を設定することに問題はなないのであろうか。以下、簡単に考察をする。

1個のがん細胞が部位中に出現した後、途中で死滅するか、分裂を繰り返して細胞数を増やしながら腫瘍を形成し臨床的診断に至るまでの過程(腫瘍の生長過程)については、定常性を仮定すると以下のような分岐過程で記述できる[4, 11]。いま、各がん細胞は1世代(細胞分裂直後から次の細胞分裂までを1世代という単位で表現している)を経るごとに細胞死を起こすか、そうでないならば2個に分裂して増殖するものとする(図4参照)。このとき、個々のがん細胞分裂が独立に発生すると仮定した場合あるがん細胞のクローン(1個のがん細胞を共通な祖先とする細胞の集合)における第 t 世代におけるがん細胞の個数を X_t 、1世代時間(細胞分裂直後から次の細胞分裂までの時間)当たりでの生存確率を p とすると、漸化式として、

$$X_1 = 1,$$

$$\Pr(X_t = y | X_{t-1} = x) = \binom{x}{y} p^{y/2} (1-p)^{x-y/2}$$

$$(y \in \{0, 2, 4, 6, \dots, 2x\}, x \in \{1, 2, 3, \dots\}),$$

が得られる($t = 2, 3, 4, \dots$)。

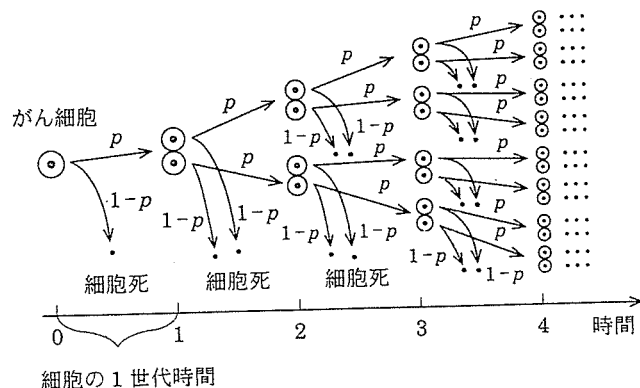


図4 がん細胞の増殖に関する分岐過程モデル

一つのクローンにおける細胞数の倍加時間(細胞数が倍増するのに要する時間)を Δ 世代時間とするとき定義より $(2p)^\Delta = 2$ が成り立つことに基づき、Collinsらによる実際のがん細胞の腫瘍の生長に対する観察結果へ当てはめると、多くの場合、腫瘍の容積の倍加時間は細胞の世代時間よりもかなり長く、生存確率 p の値として0.5~0.6辺りが推定される。この過程において1個のがん細胞が死滅することな

く腫瘍を形成し臨床的な診断に至る確率は、 $p > 0.5$ のとき $2-p^{-1}$ 、 $p \leq 0.5$ のとき 0 となることが理論的に得られる[4]。しかし、 $p = 0.5$ の場合、細胞数 X_i の変動における不確定性は顕著となり、 X_i がある閾値(例えば 10^6 個)を超過するまでの待ち時間は大きな分散をもつことが、モンテカルロ法により確かめられる。このことは、現実のがん細胞の腫瘍の生長期間の長さには大きな個体差が在りうること示唆しており、がんの罹患における年齢依存性などを解析する場合には考慮されるべきものであろう。

おわりに

以上、本稿では発がん過程に対する多段階仮説に基づいたモデル化について、主に数理的側面から論じた。このような比較的簡易な数理モデルからも、がん罹患や死亡の危険度は、年齢や時刻と共に変動する付加的曝露の影響を強く受けうること、曝露強度の変化の影響が罹患や死亡の危険度に現れるにはかなり長い時間を要することなどの仕組みを理解することができる。また、化学的な発がん物質や電離放射線、ウイルスなどの発がん関連曝露との用量(線量)反応関係を定量的に解析し、その結果として妥当な解釈のためには、数理モデル適用の意義は大きい。その一方で、実際の生物現象としての発がん過程には残念ながら既述のような単純な数理モデルでは記述できない機序や構造も含まれている。読者の方々には、その現実を踏まえた上で、数理モデル化を行うことにより初めて扱うことのできる発がん関連現象という深くて広い世界を散策していただければ、そして多様で進化した数理モデルを構築することについて関心を持っていただければ幸いである。

参考文献

- [1] Armitage, P. and Doll, R. (1954), *The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis*, British Journal of Cancer 8, 1-12.
- [2] Caporaso, N., DeBaun, M. R., and Rothman, N. (1995), *Lung cancer and CYP2D6 (the debrisoquine polymorphism): sources of heterogeneity in the proposed association*, Pharmacogenetics 5, S129-134.

- [3] Chiang, C. L. (1979), *Survival and stages of disease*, Mathematical Biosciences 43, 159-171.
- [4] Harris, T. E. (1963), *The Theory of Branching Process*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- [5] Izumi, S. and Ohtaki, M. (2004), *Aspects of the Armitage-Doll Gamma frailty model for cancer incidence data*, Environmetrics 15, 209-218.
- [6] Moolgavkar, S. H. and Venzon, D. J. (1979), *Two-event models for carcinogenesis: incidence curves for childhood and adult tumors*, Mathematical biosciences 47, 55-77.
- [7] Ohtaki, M. (1981), *An approximation of the left tail of a distribution for waiting-time in an irreversible point process*, Journal of the Japan Statistical Society 11, 111-118.
- [8] Ohtaki, M. and Niwa, O. (2001), *A mathematical model of radiation carcinogenesis with induction of genomic instability and cell death*, Radiation Research 156, 672-677.
- [9] Pierce, D. A. and Vaeth, M. (2003), *Age-time patterns of cancer to be anticipated from exposure to general mutagens*, Biostatistics 4, 231-248.
- [10] Preston, D. L., Shimizu, Y., Pierce, D. A., Suyama, A., Mabuchi, M. (2003), *Studies of mortality of atomic bomb survivors, LSS Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality 1950-1997*, Radiation Research 160, 381-407.
- [11] Steel, G. (1977), *Growth kinetics of tumors*, Clarendon Press, Oxford.
- [12] Vaupel, J. W., Manton, K. G., and Strallard, E. (1979), *The impact of heterogeneity in individual frailty on the dynamics of mortality*, Demography 16, 439-454.
- [13] Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., Bos J. L. (1988), *Genetic alterations during colorectal-tumor development*, New England Journal of Medicine 319, 525-532.

[おおたきめぐ]

神経芽腫の組織学的, 生物学的特性

—年齢的因子との関連—

Histological and biological characteristics of neuroblastoma, in relation to the age of onset

浜崎 豊¹⁾, 岸本 宏志²⁾, 田中 祐吉³⁾, 小林 庸次⁴⁾, 中山 雅弘⁵⁾

堀江 弘⁶⁾, 横山 繁昭⁷⁾, 秦 順一⁸⁾, 家原 知子⁹⁾, 杉本 徹⁹⁾

Minoru HAMAZAKI¹⁾, Hiroshi KISHIMOTO²⁾, Yukichi TANAKA³⁾

Yasutsugu KOBAYASHI⁴⁾, Masahiro NAKAYAMA⁵⁾, Hiroshi HORIE⁶⁾

Shigeaki YOKOYAMA⁷⁾, Jun-ichi HATA⁸⁾, Tomoko IEHARA⁹⁾, Toru SUGIMOTO⁹⁾

要 旨

神経芽腫群腫瘍の997例の組織型, 生物学的特性と予後との関連性を調査, 研究した. 乳児神経芽腫例は年齢的に12ヵ月を越えると症例数が減少する一方で, 非マススクリーニング症例は比較的, 一定の頻度で発見され, 18ヵ月前後で両者の割合は交差する. 1歳半以降, 年長児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ともに高く, 年齢的因子に加えて, 神経芽腫の組織型および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.

Key words: 神経芽腫, MYCN増幅, DNA倍数体, 予後

neuroblastoma, MYCN amplification, DNA ploidy, prognosis

1) 静岡県立こども病院臨床病理科, 2) 埼玉県立小児医療センター病理部, 3) 神奈川県立こども医療センター病理科, 4) 大阪市立総合医療センター病理部, 5) 大阪府立母子保健総合医療センター検査部, 6) 千葉県こども病院検査部, 7) 北海道立小児総合保健センター検査部, 8) 国立成育医療センター, 9) 京都府立医科大学小児科

1) Department of Pathology, Shizuoka Children's Hospital

2) Department of Pathology, Saitama Children's Medical Center

3) Department of Pathology, Kanagawa Children's Medical Center

4) Department of Pathology, Osaka City General Hospital

5) Department of Pathology and Laboratory Medicine, Osaka

Medical Center for Maternal and Child Health

6) Department of Pathology, Chiba Children's Hospital

7) Department of Pathology, Hokkaido Children's Hospital and

Medical Center

8) National Center for Child Health and Development

9) Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of

Medicine

I 目 的

多施設, 多数例の神経芽腫症例を調査研究対象とし, 腫瘍の組織学的特徴および生物学的特性と予後との関連性について検討し, 乳児から年長児まで広い範囲での神経芽腫についての基本的概念を理解し, 今後の治療の改善に役立てることを目的とした.

II 症例と方法

小児医療7施設, および乳児神経芽腫登録例の997例(小児医療7施設656例, 乳児神経芽腫登録341例)を対象として, International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC国際分

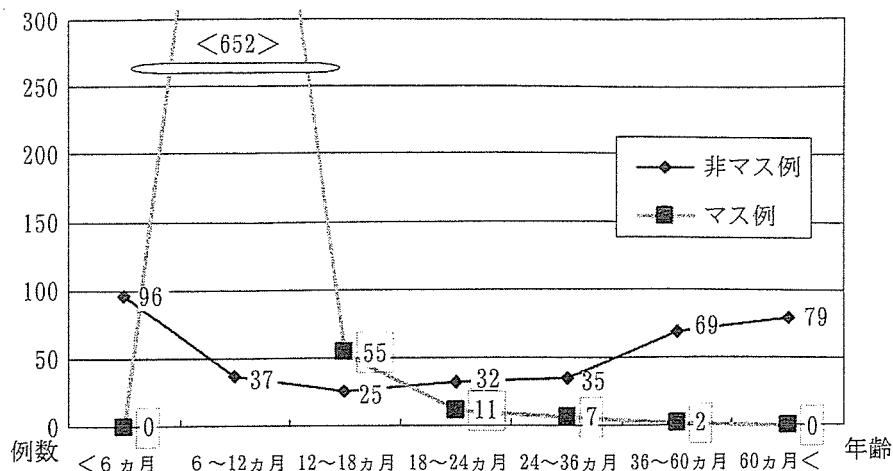


図1 神経芽腫、マススクリーニング例および非マススクリーニング症例の年齢別分布

類)による組織型を確認し¹⁻⁴⁾、神経芽腫群腫瘍の組織型と予後にかかわる生物学的特性や年齢的因子との関連を検討した。とくに最近、いくつかの地域で実施されている二次マススクリーニング(マス)時期である1歳から2歳にかけての神経芽腫例についても検討を加えた。組織型と年齢分布についてはさらに1施設(国立成育医療センター)の124症例を加えた1121例を調査対象とした。神経芽腫例のMYCN増幅の有無については527例を、そして神経芽腫のDNA倍数体との関連については474例を検討対象とした。

なお、多数例の調査にあたっては、各施設で患者名を匿名化したデータベースを集計し、個人情報保護についても配慮した。各症例の組織診断については各施設の小児病理医の診断に従った。乳児神経芽腫登録例の診断については中央病理診断(浜崎, 八反田, 中川)によった。

III 結 果

1) 神経芽腫の年齢分布

症例の年齢分布をみると、マス例と非マス例では年齢分布が大きく異なり、マス例は6ヵ月から12ヵ月症例が大半(87.5%)を占め、12ヵ月以降にはマス発見例は著減する。非マス例では、1歳未満から年長児まで各年齢における発見頻度はほとんど一定していて、18ヵ月から24ヵ月ころにマス発見例と非マス発見例の割合は交差する(図1)。

2) マス例、非マス例の予後

神経芽腫症例をマス、非マス例に分けると、マス例が69.7%(695例)に対し、非マス例は30.3%(302例)で、非マス例全体としての死亡率は31.5%である(表1)。それぞれの年齢分布をみると、12ヵ月までの729乳児例(全体の73%)のうち、マス発見例が620例とその85%を占める。マス例ではその間の腫瘍死亡例はないが、非マス109例では10%が死亡している。12ヵ月から24ヵ月までの症例は106例で、マス66例の死亡例はないが、非マス40例では13例が死亡している(死亡率32.5%)。2歳以降の非マス例全体の死亡率は52.3%と高くなる。

生後12ヵ月から24ヵ月の神経芽腫例について検討するために、3ヵ月毎の年齢区切りで症例を集計し、12ヵ月、15ヵ月、18ヵ月、21ヵ月をそれぞれひとつの時点として、その前後3ヵ月の症例における死亡率を比較した(表2)。全体としては6.0%の死亡率であるが、12ヵ月前後での死亡率は1.6%、15ヵ月前後では5.7%、18ヵ月前後では15.6%、21ヵ月前後では25.0%であり、15ヵ月前後と18ヵ月前後での死亡率に差が認められた。

3) 神経芽腫のINPC組織型と予後

INPC国際分類により神経芽腫群腫瘍997例の組織型を分類した結果(表3)、全体としては、undifferentiated neuroblastoma(NB)(未分化型神経芽腫)が2.8%、poorly differentiated NB(低

分化型神経芽腫)が80.0%, differentiating NB (分化型神経芽腫)が8.1%, ganglioneuroblastoma (GNB) intermixed (混成型神経節芽腫)が2.9%, GNB, nodular (結節性神経節芽腫)が1.9% (Favorable group; 予後良好群 0.6%, Unfavorable group; 予後不良群 1.3%), ganglioneuroma (神経節腫)が4.2%であり, 低分化型神経芽腫の頻度が高い。死亡率でみると, 未分化型神経芽腫, および high MKI (mitosis-karyorrhexis index)

の低分化型神経芽腫では40%以上の死亡率を示し, intermediate ~ low MKI の低分化型神経芽腫に比較して明らかに予後不良である。さらに年齢分布と組織型との関連を1121例で検討してみると, 18ヵ月前後から低分化型神経芽腫は比較的一定した発生比率を示すようになる(図2)。

組織所見と予後との関連では, 表1のように, マス例の予後不良群が2.7%に対して, 予後良好群は97.3%であり, 腫瘍死は1例のみである。一

表1 神経芽腫, マスクリーニング発見例, 非マスクリーニング例の年齢分布および組織型

症例	年齢	6ヵ月未満	6ヵ月~12ヵ月	12ヵ月~18ヵ月	18ヵ月~24ヵ月	24ヵ月~36ヵ月	36ヵ月~60ヵ月	60ヵ月以上	計死亡(率)
非マス例(302例)									
unfavorable group (死亡例)		5 (2)	11 (5)	7 (2)	16 (9)	26 (22)	33 (20)	47 (27)	145 87(60%)
favorable group (死亡例)		74 (3)	19 (1)	8 (2)	9 (GN1)	3 (GN1)	20 (2) (GN13)	24 (GN22)	157 8(5.1%)
									小計 302 95(1.5%)
マス例(695例)									
unfavorable group			12		6		1		19
favorable group (死亡例)			608 (1) 心筋障害	55 (GN1)	5	7 (1) (GN3)	1 (GN1)		676 2(0.3%)
									小計 695 2(0.2%)
計 (死亡例)		79 (5)	650 (7)	70 (4)	36 (9)	36 (23)	55 (22)	71 (27)	997 97(9.7%)

GN: ganglioneuroma, 997 症例全体の死亡率は 9.7%

表2 神経芽腫の発生年齢—12ヵ月から24ヵ月における症例分布と予後—

症例	設定年齢	<12ヵ月	<15ヵ月	<18ヵ月	<21ヵ月	計
	年齢幅	9ヵ月~15ヵ月	12ヵ月~18ヵ月	15ヵ月~21ヵ月	18ヵ月~24ヵ月	
予後不良群 (死亡例)		14 (4)	7 (2)	17 (6)	22 (9)	60 (21)
予後良好群 (死亡例)		236 (0)	63 (2)	28 (1)	14 (0)	341 (3)
計 (死亡率)		250 (1.6%)	70 (5.7%)	45 (15.6%)	36 (25.0%)	401 (6.0%)

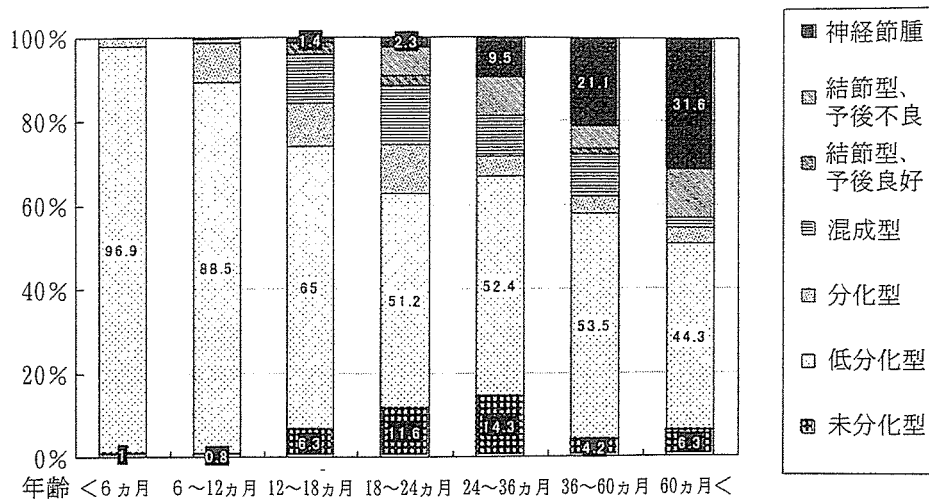


図2 神経芽腫群症例の発生年齢と INPC 組織型の比率 (1121 例)

方, 非マス例では, 予後良好群が 52.0% を占め, その死亡率が 5.1% に対して, 予後不良群は 48.0% であり, 死亡率が 60.0% である. 2 歳前後から良性の神経節腫例数も増加するので, 2 歳以降の非マス例全体の死亡率は上記のように 52.3% であるが, 予後不良群 (106 例) の死亡率は 65% とさらに高くなる.

小児医療 7 施設の非マス 247 例について詳細な組織型と年齢, 予後との関連をみると, 18 ヶ月までの 70 例の死亡率は 14.3% で, そのうち予後不良群 (15 例) は 46.7% の死亡率, 予後良好群 (55 例) が 5.1% の死亡率である. 18 ヶ月から 5 歳までの 106 例の死亡率は 50% で, そのうち予後不良群 (77 例) が 66.2% の死亡率に対し, 予後良

表 3 神経芽腫の年齢別の組織型とその予後

神経芽腫組織型	年齢	6 ヶ月未満	6-12 ヶ月	12-18 ヶ月	18-24 ヶ月	24-36 ヶ月	36-60 ヶ月	60 ヶ月以降	計死亡(率)	
未分化型 NB	例数	1	6	4	4	6	2	5	28	
	死亡		1	1	2	5		3	12(42.9%)	
低分化型 NB High MKI	例数	4	17	3	5	9	2	6	46	
	死亡	2	2	1	2	8	2	3	20(43.5%)	
低分化型 NB Intermed MKI	例数	13	64	2	4	5	7	10	105	
	死亡			1	1	4	2	6	14(13.3%)	
低分化型 NB Low MKI	例数	59	496	40	9	4	22	17	647	
	死亡	3	1(ADM)		3	3	15	10	35(5.4%)	
分化型 NB	例数	2	59	9	3	2	3	3	81	
	死亡						1	1	2(2.5%)	
混成型 GNB	例数		6	9	6	3	3	2	29	
	死亡					1	1		2(6.9%)	
結節性 GNB Fav.	例数		2	2	1		1		6	
	死亡								0(0%)	
結節性 GNB Unfav.	例数				3	3	1	6	13	
	死亡				1	1	1	4	7(53.8%)	
神経節腫	例数			1	1	4	14	22	42	
計 (死亡率)			79(6.3%)	650(0.6%)	70(4.3%)	36(25.0%)	36(61.1%)	55(40.0%)	71(38.0%)	997(9.2%)

NB: neuroblastoma, MKI: mitosis-Karyorrhexis Index, GNB: ganglioneuroblastoma, fav.: favorable, ADM: adriamycin

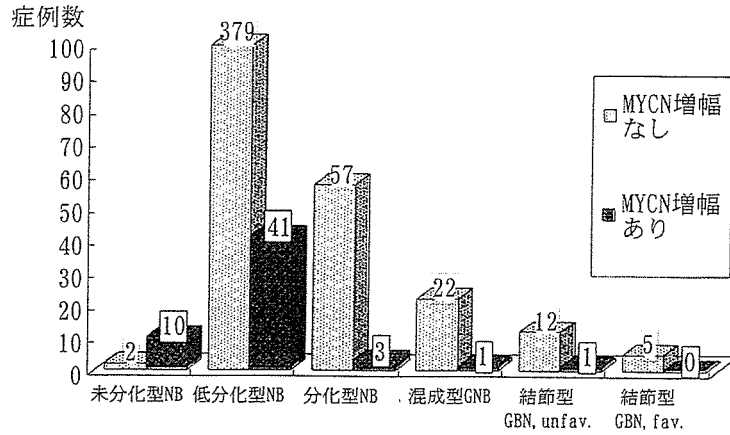


図3 神経芽腫の MYCN 増幅の有無と組織型との関連 (533 例)

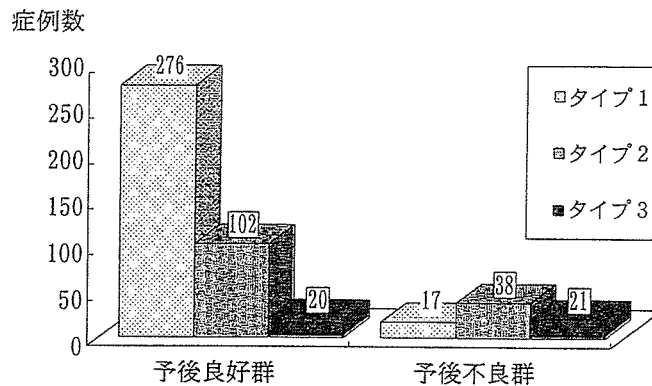


図4 神経芽腫のタイプ分類と予後良好群、予後不良群との関連 (474 例)

好群 (29 例; 神経節腫が 15 例) は 6.9% の死亡率である。5 歳以上の 71 症例では、全体が 38.0%、予後不良群 (47 例) が 57.0% の死亡率で、予後良好群 (24 例; 神経節腫が 22 例) では死亡例はみられない。また、予後不良群のなかでも組織型として未分化型神経芽腫、high MKI 低分化型神経芽腫はそれぞれ 57.9%、65.6% と全体に死亡率が高い。低分化型神経芽腫のなかでも intermediate MKI 症例は 18 ヶ月までは 7.7% の死亡率であるが、18 ヶ月以降は 56.0% と死亡率が高く、同様に、low MKI 低分化型神経芽腫も 18 ヶ月までは 5.1% であるが、18 ヶ月以降は 64.6% と高い死亡率を示す。

4) 神経芽腫の組織型と MYCN 増幅

小児医療 7 施設の 681 例のうち MYCN 増幅の有無についての検索は 533 例である (図 3)。MYCN 増幅を示した 56 例では、未分化型神経芽

腫の 83% は MYCN 増幅を示し、低分化型では 9.8% の症例が増幅を示した。また、全体として MYCN 増幅例の 58.9% が死亡し、とくに 18 ヶ月以降に死亡率が高くなる。一方、マス例のうち大半を占める MYCN 非増幅の 369 例では、年齢、組織型による差異は少なく、マス例での MYCN 増幅例は 6 ヶ月から 12 ヶ月の 323 例中、3 例 (0.9%) のみであった。

組織型を予後良好群と予後不良群に分類したとき、予後良好群の 460 例では、MYCN 非増幅が 415 例 (90.2%) に対し、MYCN 増幅は 45 例 (9.8%) である。一方、予後不良群の 67 例では、非増幅が 52 例 (77.6%) に対し、増幅は 15 例 (22.4%) であり、予後不良群では MYCN 増幅例が多くなる。

5) 組織型と DNA 倍数体

神経芽腫群腫瘍で DNA 倍数体解析をおこなっ

た474例について、DNA 倍数体と *MYCN* 増幅や組織型との関連性をみると⁵⁾ (タイプ1:3倍体および *MYCN* 非増幅, タイプ2:2倍体/4倍体および *MYCN* 非増幅, タイプ3:2倍体/4倍体および *MYCN* 増幅), 非マス例でタイプ1の38例では26.3%が死亡し, とくに18ヵ月以降に死亡率が高い. 非マス例でタイプ2の60例では, 31.7%が死亡し, 2歳以降に死亡率が高い. 非マス例でタイプ3の39例では59.0%が死亡し, しかも年齢にかかわらず死亡率が高い.

一方, マス例, タイプ1の255例, タイプ2の89例, およびタイプ3の2例の検討では, タイプ分類と予後との関連性に乏しく, タイプ1で3例の死亡(1.2%)があるのみである. 組織学的な面から分析すると, 予後良好群の398例のうち, タイプ1が276例, タイプ2は102例, タイプ3は20例を占める. 一方, 予後不良群76例では, タイプ1が17例, タイプ2が38例, タイプ3が21例を占める(図4). 非マス例ではマス例に比較してタイプ2およびタイプ3が多い傾向を示す.

IV 考 察

神経芽腫群腫瘍の多数例の組織学的検索や無治療経過観察例の検討結果から, マスで発見された乳児期腫瘍は12ヵ月ないし18ヵ月ころから退縮傾向ないし腫瘍縮小を示すか, あるいは腫瘍成熟の結果, 良性の神経節腫への移行を示し, 大半の症例は予後良好の経過をたどる^{6,7)}.

今回の多数例による詳細な組織型と年齢分布の検討でも, マス発見例の大半は組織学的にも, 臨床的にも予後良好群の範疇に入る. 一方, 非マス例, とくに18ヵ月以降の幼児, 年長児では組織学的に予後不良症例が多く, 未分化, 低分化な組織型を示す神経芽腫ほど予後不良であることが示唆される. これらの乳児神経芽腫症例と年長児神経芽腫の年齢的な境界, 移行領域と考えられる12ヵ月から24ヵ月ころの神経芽腫例についての検索は本邦ではまだ十分にはおこなわれていない⁸⁻¹⁰⁾.

今回の検討では, 乳児期マス例の発見頻度は18ヵ月前後の年齢域で非マス症例数と交差し, 両群

の発見頻度が逆転することが明らかとなった¹¹⁾. すなわち, 12ヵ月から24ヵ月の症例でみると, マス例が減少し, 予後不良の範疇に入る症例が増加する時期は15ヵ月から18ヵ月のころに相当する. このことは, マス休止後, 神経芽腫患児の早期発見のためにはいつの時期が適当か, という課題の検討に参考となるものである⁹⁾.

神経芽腫の生物学的特性に関しては, DNA 倍数体と組織型, 予後との関連性が認められ, *MYCN* 増幅を伴わない予後良好な3倍体腫瘍は乳児期に多いことが確かめられている¹²⁾. 予後不良な2倍体/4倍体腫瘍は18ヵ月ないし24ヵ月ころから発見症例の増加があり, 組織型との関連でも, 低分化型・未分化型神経芽腫では2倍体/4倍体の比率が高くなっている. *MYCN* 増幅の有無については神経芽腫の予後との密接な関連性が考えられているが^{13,14)}, 未分化型あるいは低分化型神経芽腫など, 組織学的に未熟な神経芽腫で *MYCN* 増幅傾向があり, 年齢的には18ヵ月ころから *MYCN* 増幅を示す症例の比率が高くなる.

以上のように神経芽腫の生物学的特性からみても, 18ヵ月前後の年齢が予後の良, 不良にとってもっとも重要な移行時期と考えられ, 乳児神経芽腫例と非マス発見例における年齢分布の交差時期ともほとんど一致し, また, 組織所見とも密接に関連した年齢でもある.

乳児神経芽腫の特異な組織学的特徴, 生物学的形質についての知見がこの20年, 蓄積されてきたが, 2年前から6ヵ月乳児のマス休止という事態となった. マスの休止により減少していた神経節腫が今後, 年長児になってから発見される頻度が再度, 高くなる可能性がある⁶⁾. 1歳代の神経芽腫の組織学的, 生物学的性状については, さらに今後, 検索を進めていく必要があるが, 1歳6ヵ月前後における神経芽腫のマスは現在, まだ, 全国的なシステムにはなっていない. 一般の小児診療機関も含めた幅広い地域のシステムとして今後, 神経芽腫の登録, follow-up 体制の確立が必要であり, それが神経芽腫への理解と治療の改善につながることを期待したい.

V まとめ

神経芽腫群腫瘍の多数例の後ろ向き調査研究により、マス発見と臨床的な発見による症例の間には組織型、MYCN増幅、DNA倍数体と年齢的因子の間には明らかな関連性があることが確かめられた。今回の調査研究が神経芽腫の早期発見、治療の一助となり、今後の神経芽腫治療における基本資料になるものと考えている。

謝 辞

乳児神経芽腫のINPC国際分類による中央病理診断にかかわられた八反田洋一博士(別府医療センター)、中川温子博士(国立成育医療センター)に深謝いたします。

なお、本研究の一部は厚生労働省科学研究費(子ども家庭総合研究事業)H16-子ども-012、登録症例に基づいた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(主任研究者 檜山英三)の助成による。

文 献

- 1) 小児腫瘍組織分類委員会: 神経芽腫群腫瘍—国際分類INPCによる— 小児腫瘍カラーアトラス 第2巻 第1版 金原出版 2004
- 2) Shimada H, et al: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer*, 86:349-363, 1999
- 3) Shimada H, et al: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*, 86:364-372, 1999
- 4) Peuchmaur M, et al: Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification. Confirmation of the favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer*, 98:2274-2281, 2003
- 5) Brodeur GM, et al: Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol*, 19:93-101, 1997
- 6) 水田祥代, 他: マスクリーニングで発見され無治療で経過観察された神経芽腫 82 例—日本小児がん学会 平成10年—12年度神経芽腫委員会報告— 小児がん, 39:131-136, 2002
- 7) 浜崎 豊, 小林庸次, 中山雅弘, 田中祐吉: 神経芽腫の減少について—マスクリーニング発見神経芽腫摘出の影響か— 小児がん, 40:182-185, 2003
- 8) Navarro S, et al: Prognostic value of International Neuroblastoma Pathology Classification in localized respectable peripheral neuroblastic tumors: a histological study of localized neuroblastoma European Study Group 94. 01 Trial and Protocol. *J Clin Oncol*, 24:695-699, 2006.
- 9) Sano H, et al: International neuroblastoma pathology classification adds independent prognostic information beyond the prognostic contribution of age. *Eur J Cancer*, 42:1113-1119, 2006.
- 10) Iehara T, et al: MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor in infantile neuroblastoma detected by mass screening. *Br J Cancer*, 94:1510-1515, 2006.
- 11) 浜崎 豊: マスクリーニング症例の病理組織研究と腫瘍特性に関する研究—神経芽腫の組織型とその年齢分布, 予後との関連性—. 平成16年度厚生労働科学研究(子ども家庭総合研究事業) 神経芽細胞腫マススクリーニング研究報告, 95-99, 2005
- 12) 浜崎 豊, 岸本宏志, 田中祐吉, 山本圭子: 神経芽腫の予後, とくにDNA ploidyによるタイプ分類および組織型との関連性. *小児がん*, 42:216-221, 2005
- 13) George RE, et al: Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 23:6466-6473, 2005
- 14) Kaneko Y, 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