

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
神経芽細胞腫マススクリーニングの
効果判定と医療体制の確立

平成16年度～18年度 総合研究報告書 (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スクリーニングの
効果判定と医療体制の確立
平成16～18年度 総合研究報告書

目 次

I. 班員名簿

II. 総合研究報告

登録症例に基づく神経芽細胞腫マススクリーニングの効果判定と医療体制の確立	3
主任研究者 檜山 英三	
（資料1）神経芽細胞腫データベース	48
（資料2）指定統計調査票使用申請書	50
（資料3）外部評価委員との合同会議資料	60
（資料4）神経芽細胞腫マススクリーニング時期と方法についての検討資料	70
（資料5）生後18ヶ月幼児に対する神経芽細胞腫マススクリーニングの前向き研究案	77
（資料6）生後18ヶ月幼児に対する神経芽細胞腫マススクリーニングの実施要綱	83
（資料7）保護者への説明文書	104
（資料7-1）京都府	104
（資料7-2）大阪府	108
（資料7-3）札幌市	109
（資料8）神経芽腫腫瘍特性解析協議事項	115
（資料9）バーチャルバンキング運用規定	118
（資料10）神経芽細胞腫のリスク分類検討会資料	120

III. 研究報告

生物学的指標からみた乳児神経芽腫マススクリーニングの評価	129
研究協力者 田中 丈夫 他	
神経芽細胞腫マススクリーニングの外部精度管理の結果と問題点	135
研究協力者 鈴木 恵美子 他	
札幌市における神経芽腫スクリーニング	139
－1才2ヶ月の成績と1才6ヶ月スクリーニングへの移行－	
研究協力者 花井 潤師 他	
次世代生産の視点から見た神経芽腫マススクリーニング	143
研究協力者 西 基	

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 149

V. 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-あんしんこども館）	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 nkymmsr@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	静岡県立こ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	
〃	高原 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 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄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 kozo.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 者 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. 総合研究報告

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 - 一般 - 012

総合研究報告書

登録症例に基づく神経芽細胞腫マスマ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 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

生後6ヶ月児を対象とした神経芽腫検査事業が、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かったことから平成15年に休止が決定した。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神経芽腫マスマスクリーニング（以下、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検討会から示された。そこで、本研究は、これらの課題に対し、神経芽腫マスの効果判定および有効なマスのあり方を検討し提言することと、さらに、本腫瘍の臨床診断と治療成績向上を目的とした。①本症の罹患と死亡の正確な把握、については、小児がんの公的データベースが存在しないことから、1981年から2000年までに発症し、5年後の予後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に加え、乳児神経芽腫スタディグループのデータを結合し、さらに重複症例を一つにし、可能な症例では中央病理診断にて再検討して、約5,000例（マス発見例2,255例）のデータベースを構築した。この登録率については、人口動態調査死亡票による死亡確認データと照合し、また、1998-2000年症例は小児慢性特定疾患データベースと照合し、その結果65%程度の症例が捕捉されていた。これを利用した後向き研究から、HPLCによる定量法でマスを受診した群では、6ヶ月以降の神経芽腫による累積罹患率が30.8、累積死亡率が2.7となり、非受診群（累積罹患率が11.9、累積死亡率が5.12）にくらべ、有意に上昇、低下していた（ $P < 0.01$ ）。年度別に検討すると、マスによって乳児期の予後良好な腫瘍が数多く過剰診断されたが、HPLCによる定量法が導入された1990年以降出生した群では2才以降の年長児症例が半減していた。さらに、MYCN増幅例を検討すると、1才前半の症例数と2才以降の症例数が北米の報告に比べ有意に少なく、進行例の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、後向き研究の成果や、無治療経過観察例の尿中カテコラミンの推移などから前向き研究の実施時期は生後18ヶ月と決定した。また、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提示し、各自自治体に配布し、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良好腫瘍の腫瘍特性が明らかになった。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。さらに、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

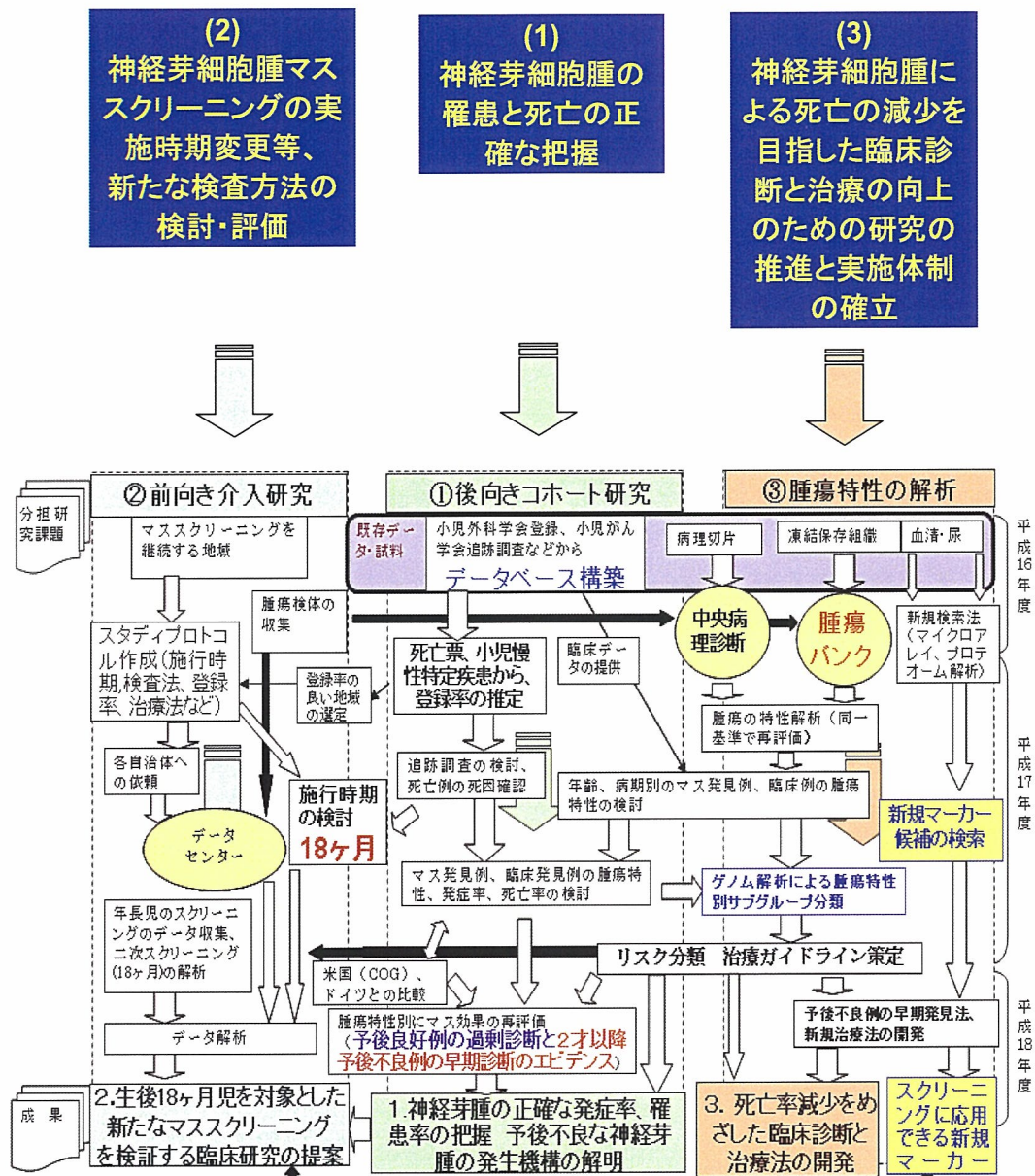
In 2003, Japanese Neuroblastoma Mass-Screening (MS) Project was paused due to the overdiagnosis of the favorable tumors which might have spontaneously regressed or matured and absence of assured evidences for mortality reduction. As this MS program was paused, the following three issues were set to be promptly solved: ① Accurate estimation of the incidence and mortality rates of neuroblastoma ② Evaluation and proposal of a new MS program with different timing and new method ③ Research promotion and clinical establishment of improved clinical diagnosis and treatment protocols to reduce the mortality rate of neuroblastoma. To solve these three issues promptly, this study group was launched on 2004. For the first issue, retrospective cohort study was performed using the database consisting of more than 5,000 cases including MS-detected cases registered in Japanese Societies for Pediatric Surgery and Pediatric Oncology or Japanese study group for infant neuroblastoma. This database was estimated to have stored approximately 62.5% of whole Japanese neuroblastoma cases by the comparison with the death registration data in Population Survey Report and the Japanese program for childhood chronic diseases supporting system.

Then, we summarized 4,016 cases including 2,255 MS-detected cases, who had been diagnosed until 2000 and followed for 5 years with their pathological and biological findings reconfirmed. Infant tumors detected by MS-program contained a lot of favorable ones, most of which were consequently considered as over-diagnosis cases. This database retrieved that the cumulative morbidity and mortality rates of neuroblastoma diagnosed at more than 6 months old in the cohort who underwent HPLC-based MS system were 30.8 and 2.7, which were significantly increased and reduced respectively in comparison with the cohort who did not undergo MS (their cumulative morbidity and mortality rates were 11.9 and 5.12, respectively, $P < 0.01$). In the cohort of children who were born after 1990 when HPLC method was nationally adopted in MS, the case number diagnosed after 2 years of age was reduced, and the incidence of the *MYCN* amplified tumors was also reduced with the comparison of the North American cohort. These findings indicate that Japanese MS program for 6-month-old infants was effective to reduce the elder advanced patients, especially those diagnosed after 2 years of age. To solve the second issue, we reached a consensus that 18 months old is the appropriate timing for new MS system according to the evidences of the retrospective study and the change of urinal catecholamine levels in watching cases without therapies. All 10 cases detected by the 18-month-MS in Osaka, Kyoto, and Sapporo are alive and none of them are considered as over-diagnosed ones. In the analysis of the 217,795 cohort of the second-stage MS project for 18-month-old children in Miyagi and Kyoto prefectures, the mortality rates of the cases who underwent and not underwent the second-stage MS were 2.25 and 7.11 per 100,000, respectively. And no case who underwent the second-stage MS developed neuroblastoma until 4 years old. These findings also suggest the efficacy of 18-month-MS. Then, we are proposing the protocol of the prospective study project for the neuroblastoma screening for 18-months old children. As biological characteristics in neuroblastoma, genomic alteration analysis using SNP array revealed four different groups, indicating the new biological feature of favorable and unfavorable tumors. To identify new serum markers specific for unfavourable tumors, new analytical method using LC/MS for simultaneous analysis of catecholamine metabolites have been established. And the mass-mapping using LC/MS/MS procedure for serum samples revealed several candidates of unfavorable tumor specific tumor markers, which would be applicable to diagnosis and therapeutic targets as well as new MS system. To promote and establish the advanced basic research on this tumor, we established the new virtual banking system in which many researches all over the world would be able to use.

<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・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)

研究のフローチャート



A. 研究目的

神経芽腫は1才以上の年長児は予後不良であることから、これを早期に発見し、できるだけ早い段階で適切な措置を講じることを目的として、生後6～7ヶ月の全ての乳児を対象に、尿によるマスキリーニング（以下マス）を行う事業（神経芽細胞腫検査事業）が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、マス施行されると、神経芽腫全体の罹患率が2倍以上に増加し、この腫瘍の中には知らないうちに消退したり、或いは分化して良性になっていた腫瘍が存在していることが明らかになり、治療不要な腫瘍の過剰診断が指摘されるようになった。その後、2002年の欧米の短期間の研究から神経芽腫マスの有効性に関して疑問があるとの報告がなされると、本邦では治療不要な腫瘍の過剰診断による不利益と、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の理由で平成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）。その休止にあたっての条件として①神経芽細胞腫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神経芽細胞腫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、本研究班は、これらの三つの課題に対応し、①生後6ヶ月の神経芽細胞腫マスの効果判定および②将来に向けての有効なマス事業の開発と③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、後向きコホート解析を中心とし、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集結し、本邦の神経芽腫症例をある程度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。スクリーニング方法としては、当初はスポット法による定性法が用いられていたが、1990年頃から高速液体クロマトグラフィー（high-performance liquid chromatography, HPLC）による定量法が全国的に導入され、HPLC導入後の変化についても検討する。②については、前向き研究とし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妥当性と実現性を検討し、可能であればその立案を行うとともに、既に自治体レベルでの生後18ヶ月などで施行されたマスの成果を検討し、有効性が高い新たなスクリーニングを提案する。③については、腫瘍特性解析とし、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。奇しくも、国際的に共通した神経芽腫のリスク分類を行う動きがあり、これらに有効なエビデンスを供給する。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。

B. 研究方法

1 後向きコホート解析

1.1 データベースの構築

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2,200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した。これらの2学会の登録例に、乳児神経芽腫研究グループの症例と、さらに、各施設から同意のもとに登録が追加されてきた症例について詳細に検討し、重複症例については各1例とした。これらの作業後、病理診断で確定されている症例でかつ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4,014例（マス発見例2,255例）をデータベース化した（資料1：神経芽細胞腫データベース）。

これらのデータベースは、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確認を出生日と地域コードから照合して確認訂正した（資料2：指定統計調査票使用申請書）。さらに、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罹患率の上昇や死亡率の減少効果の算定、さらに、患者の捕捉率の

高い地域を選定することを目的として、厚生労働省統計情報部に目的外使用を申請し、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が必須であった。実際には、死亡時年齢20才未満の者のうち、原死因符号が以下のもの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、当研究班で作成したデータベースの症例との相関を検討し、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。

1.2 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

1985年から1995年の期間に日本全国で診断された神経芽腫患者2,493名(そのうちマスにより検出された患者は1,750名)のデータを基礎データとし、予後と発症年齢のデータから、この腫瘍の発生を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り検討した。すなわち、遺伝子を標的とした多標的モデルを構築し、細胞数の動態に関するモンテカルロ数値実験により罹患年齢分布の説明を試みた。その検討結果と実際の発生数と予後との関連を検討し、より実際に近い神経芽細胞腫の発生モデルを提唱した。

1.3 診断時年齢別神経芽腫登録数の年次変化

登録症例の、登録時の年代を追って、乳児、1才代、2才以降の3群に診断時を分けて、年齢別に神経芽腫の登録数の変化を検討した。出生数の減少やマスの受診率の変化による影響も検討する目的で、1976年以降の出生数、1984年以降のマス受診数を厚生労働白書より引用し、比較検討した。

1.4 乳児期発症の神経芽腫の検討

乳児期の神経芽腫は予後良好とされており、特にマス発見例は予後良好であることが知られている。今回、乳児神経芽腫におけるマス発見例と非マスキリング発見例(非マス例)の比較検討を行った。

1.5 1才代発症の神経芽腫の動向

1才代の神経芽腫症例の変化を検討する目的で、本研究班で集計したデータベースをもとに、以下の条件を満たした症例を対象として検討した。

- (1)生後6ヶ月時にHPLCによるマスが実施され、かつMYCN遺伝子増幅検査が普及した年代の

患児（1990年出生以降）。

(2)生後12ヶ月以上24ヶ月未満に臨床的に発見された。

(3)5年後の予後調査が行われている。

実際のマスは1985年から全国で施行されているが、初期は定性法で行われていた。1990年頃より全国的にHPLC法が普及するようになり、発見例も飛躍的に増加している。また、今回の検討項目にMYCN増幅を加えたが、1990年以前の症例においては、MYCN遺伝子増幅を調べられていない症例が多かった。したがって本研究では、データの信頼性を担保するために、MYCN遺伝子増幅検査が国内で普及した1990年以降の症例に絞って検討することとした。本データベースにおいて、(1)の条件を満たしたのは、2,039例で、このうち臨床発見例457例を抽出した。さらに(2)(3)の条件で絞り込むと最終的に104例となった。

これら104例を対象に、臨床像（性別、発症月齢、病期、腫瘍マーカー）、生物学的予後因子（病理組織分類、MYCN増幅、DNA ploidy）および転帰について検討を行った。

1.6 2才以降の発症例の検討

1976年以降、データベースに登録された症例を発症年齢別に年代を追ってその動向を検討した。さらに、生後6ヶ月児に対するスクリーニングが開始される以前の症例と、HPLCが導入された後の1990年以降出生の症例についてその分布を検討した。これらを、米国あるいはドイツの症例とその年齢分布を比較検討した。その際には、本邦でスクリーニングの影響を受けていないと考えられる生後6ヶ月未満での診断例を1として、6-11ヶ月、12-17ヶ月、18-23ヶ月、24-60ヶ月の相対比を表して検討した。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）、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。

1.7 MYCN増幅症例の検討

最も予後不良な神経芽腫の特徴であるMYCN増幅を認める症例の検討を行った。

1.7.1 乳児期MYCN増幅症例の検討

乳児期の神経芽腫は予後良好とされており、特にマス発見例は予後良好であることが知られている。今回、乳児神経芽腫におけるマス発見例と非マスキリーニング発見例（非マス例）の比較検討を行い、その中でMYCN増幅例について比較検討を行った。

1.7.2 MYCN増幅症例の発症年齢の検討

神経芽腫のMYCN増幅が予後因子として注目されたのが1990年以降であることから、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の年齢分布を検討し、欧米のデータ（Cancer Lett, 2005）と比較検討を行った。

1.8 後向き研究における6ヶ月マスキリーニングの過剰診断と有効性の評価に関する検討

生後6ヶ月時を対象とする神経芽細胞腫検査事業の過剰診断と有効性の検証のために、我々のデータベースから、1980年1月1日以降1999年12月31日にまでに出生した症例を対象として検討した。

これらを、マスが全国的に施行されるようになった1985年以前の1980-1984年出生の群、主に定性法でマスが行われた1985-1989年出生の群、全国的にHPLCによる定量法が導入された1990年以降の群に分けて検討した。マス施行前は、出生数をそのまま対象者数とした。また、マス開始以降の年代は、厚生労働省発表の神経芽細胞腫マスキリーニングの受診対象者数、受診数を用いた。各群でマスに影響されない6ヶ月未満の臨床発見例を別に検討し、6ヶ月以降72ヶ月までのマス発見例と臨床発見例を含めた診断例を受診群と非受診群で比較検討し、罹患率、死亡率、さらに、罹患率の相対リスクを算出した。

2 前向き研究

神経芽腫の治療成績向上をめざして、有効性が高く、過剰診断を極力抑えうるスクリーニングを検討

する目的で、前向き研究を行った。その前段階として、マス施行以前の症例から、それらの進行例の増加時期と VMA・HVA の増加してくる時期、予後良好例の VMA・HVA の減少時期などから、適切なマス施行時期の推定を行う目的で、いくつかのパイロットスタディや二次スクリーニングの結果を検証した。さらに、対象年齢を変更し、新たなマスを行うにあたり、その有効性を検証する臨床研究案を策定した。さらに、コストベネフィットの検討も行った。

2.1 パイロットスタディの検討

2.1.1 生後14ヶ月二次スクリーニング

2004年4月から2005年7月まで札幌市で行ってきた生後14ヶ月の二次マスキングの結果を検討し、発見例の特徴と有効性について検討した。

2.1.2 生後18ヶ月二次スクリーニング

1991-2000年に京都府で、1992-2002宮城県で施行された6ヶ月マス受診対象群に対する生後18ヶ月の二次スクリーニング（以下、二次マスと称す）との結果を集計し、発見例の特徴から、18ヶ月マスへの有効性検証へのエビデンスを解析した。

2.1.3 生後18ヶ月スクリーニング

2004年から施行されている大阪府、京都府での生後18ヶ月の神経芽腫スクリーニングでの発見例の特徴から、生後18ヶ月のスクリーニングの有効性について検討した。さらに、すでに18ヶ月マスの施行している大阪府、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。

2.2 無治療経過観察症例の検討

大阪大学、大阪府立母子医療センターで行われてきた生後6ヶ月スクリーニング発見例の無治療経過観察症例のうち、経過観察中に自然退縮した症例の尿中カテコラミン値の推移を検討した。その結果から、過剰診断例と考えられる症例の分化、退縮とともにこれらの値の変化から、過剰診断例が診断されなくなる時期を検討した。

2.3 後向き研究からのエビデンス

1の後向き研究から得られたエビデンスから、有効なスクリーニングの構築の可能性、さらに適切な施行時期、施行回数などの検討を行い、前向き研究への提案を行った。

2.4 コストベネフィットからの検討

神経芽腫は、多彩な病像を持ち、軽度なものから難治性のものまで治療内容も種々である。過去10年間に大阪大学および大阪総合母子医療センターに入院した神経芽腫症例を臨床病期別に、入院日数と入院費を比較した。スクリーニングでは、多くは無症状の時に発見されており、1才代の自然発症例に比べ、臨床病期は軽いものが多い。これを入院費用との関連で検討した。これらのスクリーニングに要した費用を合算し、コストベネフィットからの有効性を検討した。

2.5 生後18ヶ月児を対象とした新たな神経芽腫スクリーニングの前向き研究案の策定

対象年齢を変更しマス事業を継続・継続予定の京都、大阪、新潟、札幌、静岡、川崎などのマス施行地域と、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、綿密に自治体と連携、協議し、前向き研究を開始することを検討した。

3 腫瘍特性解析

3.1 病理データの解析

多施設共同研究にて997例（小児医療7施設656例、乳児神経芽腫登録341例）の所見を International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC国際分類) による組織型で確認し、神経芽腫群腫瘍の組織型と予後にかかわる MYCN増幅の有無、DNA倍数体解析などの生物学的特性や年齢的因子との関連を詳細に検討した。組織型と年齢分布についてはさらに1施設の124症例を加えた1,121例を調査対象とした。とくに最近、いくつかの地域で実施されている1才代でのマス時期に関連して、1才から2才にかけ

ての神経芽腫例についても検討を加えた。さらに6ヶ月マスでは陰性であり、その後の経過中に、臨床的に発見された多施設の神経芽腫56症例についても組織学的、生物学的に検討した。

3.2 バーチャルバンキング

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った。

3.3 腫瘍のゲノム解析

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、Human Mapping Array（Affymetrix社製））等の新しい解析法で、解析し再検討した。

3.4 腫瘍の遺伝子発現解析

腫瘍の遺伝子発現を網羅的に解析することを目的に、腫瘍からRNAを抽出し、全ゲノム型の発現解析用マイクロアレイ、Human Whole Genome Array（CodeLink, Amersham社）とHuman Genome U133 Plus（Affymetrix社）を用いて解析した。発現データの解析は、発現解析ソフト（GeneSpring、Agilent社）を用いた。

3.5 新たな腫瘍マーカー解析

3.5.1 血漿由来DNAを用いたMYCN増幅検出法の確立

京都府立医大小児科および千葉県がんセンターにて悪性度診断を行った神経芽腫のうち治療前の保存血清が利用できた87例；MYCN増幅（サザンブロット法）17例（Stage 1：1例、2B：1例、3：2例、4：13例）、非増幅70

例（Stage 1: 22例、2A+2B: 18例、4S: 5例、3: 7例、4: 18例）血清200 μ lよりQIAmp blood kit(QIAGEN)を用い血清遊離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で各々定量し、MYCN/NAGK値からMYCN増幅の有無を検討した。

3.5.2 患者血清・尿を用いたプロテオーム解析

血清・尿の直接注入によるカテコールアミン類の一斉分析系の確立、及びこれを利用した新規のマーカーの検索法の最終確立を目指し以下の検討を行った。

3.5.2.1 LC/MS及びLC/MS/MSによるカテコールアミン一斉定量系の確立

3.5.2.2 尿中カテコールアミン一斉分析の為の前処理濃縮法の確立

3.5.2.3 血液中カテコールアミン一斉分析の為の前処理濃縮法確立及び新規マーカー検索

LC条件検討は日本分光（株）のGulliver Series及びMicro21 Series（Pump:PU-01, Detector:UV-01）を、分析カラムとして化学物質評価研究機構のL-column ODS（150 x 1.5 mm及び150 x 4.6 mm）を用いた。

前処理においては、尿に対して陽イオン交換-逆相ミックスモード固相カラム（Oasis[®] MCX（Waters：4.6 x 20 mm）を、血清に対しては内面逆相カラム（TSK precolumn、BSA-ODS、T0219、東ソー（株））及び内面陽イオン交換カラム（CAPCELL PAK MF-SCX、SHISEIDO）を用いた。

LC/MSはMicro21 SeriesとMariner[™], ESI-TOF/MS（Applied Biosystems）のセット及びLCMS-2010（ESI or APCI-Q/MS:SHIMADZU）を用い、データ処理はData Explorer[™]及びLCMSポストランにより行った。

LC/MS/MSはMicro21 SeriesとQSTAR[®] XL, ESI-QqTOF/MS（Applied Biosystems）のセット及びProminence Series（SHIMADZU）とAPI3200, ESI or APCI-QqQ/MS（Applied Biosystems）を用い、データ処理は同社のAnalystQSにより行っ

た。また Mariner への導入はスプリッターティーにより流量を1/40になるよう調整し測定を行った。

カテコールアミンの標準物質として、DOPA、dopamine、norepinephrine、epinephrine、normetanephrine、metanephrine、DOPAC、HVA、VMA を用いた。それぞれの調整は超純水を用い1 mg/ml になるように作成した。さらに条件検討のために全ての標準試料を混合し、超純水により希釈し最終濃度を10 μ g/ml とし、これを標準試料混合溶液とした。また同様に尿、FCS により希釈し、模擬尿、模擬血清とした。

血清中低分子の一斉分析法を用い、患者血清の分析及びその解析を行った。今回用いた検体は全部で28検体、広島及び京都で保存されていた検体であり病期等の情報のついたものである。またコントロール試料は、小児リウマチ患者の血清を用いた。また、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。

3.6 リスク分類

3.6.1 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

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った。方法は、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した。

候補因子は以下のように処理した。

- 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。

1,800例以上ある項目(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・本邦組織分類・本邦組織亜分類・眼窩転移・原発部位・骨転移・骨髄転移・原発左右・肝転移・亜鈴型・皮膚転移・他臓器転移・本邦病期分類・INSS病期・VMA・HVA・NSE・LDH・MYCN増幅を候補因子とした。初発症状、国際組織分類、Shimada分類、フェリチン、DNAploidy、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。

一部の因子は順序変数ならびに名目尺度変数のダミー変数へ変換して解析した。

3.6.2 本邦の神経芽腫リスク分類の提案

現在国際的に神経芽腫のリスク分類を統一した、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、我が国ではマスキリングの休止後、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、本邦で各リスクに沿った適切な治療法の導入を行うためのリスク分類の検討を行った。後向き研究でのデータベースのうち86年～98年解析変数に欠損・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) は診断日を開始日とし、全死亡を最終日とした。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した。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、マスキリ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、マスキリング発見例を除いた臨床例のみでの解析も行った。COG (Children's Cancer Group) 提唱のリスク分類を用いて、日本の登録症例を解析し、ついで、日本独自のリスク分類を創案した。

後向き研究の解析、さらに前向き研究の策定、リスク分類に関しては、欧米のデータとの比較検討と共に、外部評価委員としてCOGから、嶋田教授、C. Patrick Reynolds教授を招へい(社団福

社法人 恩賜財団母子愛育会、子ども家庭総合研究推進事業にて）し、外部評価を受けて、研究を遂行した（資料3：外部評価委員との合同会議資料）。

（倫理面への配慮）

後向き研究でのデータベース作成に使用した日本小児外科学会悪性腫瘍委員会神経芽腫群腫瘍登録、及び日本小児がん学会神経芽腫マスキリーニング登録、乳児神経芽腫登録については、それぞれ、学会の倫理委員会あるいは臨床研究委員会に資料の第三者提供も含めて倫理審査を依頼し、承認の上利用した。また、これらの検討を行う上で、広島大学医学部倫理委員会に申請し、「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 分担研究：後向きコホート研究」（承認番号 第491号）にて承認の上、研究をおこなった。

また、前向き研究にて18ヶ月のマスキリーニングをすでに施行している自治体（大阪・京都）での研究は、それぞれで倫理申請し、さらに受検者にはインフォームドコンセントを行った上で施行され、独自に解析されており、データのみを研究班の解析に使用させて頂いた。

腫瘍解析に使用した検体は、全て、広島大学医学部倫理委員会承認の「小児固形腫瘍の染色体および遺伝子解析」（承認番号医倫ヒ第20号）研究に基づき、倫理指針施行前の検体と施行後は同意が得られているもののみを使用した。

C. 研究結果

1 後向き研究

1.1 データベースの構築

1971年から登録されてきた日本小児外科学会および日本小児がん学会の登録例に、乳児神経芽腫研究グループの症例と、さらに、各施設から同意のもとに登録が追加されてきた症例について詳細に検討し、重複症例を除去した結果、病理診断で確定されている症例でかつ5年後の追跡調査が終了した1981年から2000年までの発症例は4,047例（マス発見例2,286

例）となった（資料1：神経芽細胞腫データベース）。診断時年齢と予後の関係を検討すると、マス発見例は6-10ヶ月に集中し、予後不良例は、2-3才と4-5才の二つの分布を認めた（図1）。

このデータベースは、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確認を出生日と地域コードから照合して確認、さらに一部は訂正した。人口動態調査死亡票とデータベースの死亡例を照合した。

1.1.1 死亡票コードとの照合

死亡票に存在するコードで、死亡時年齢20才未満の者のうち、13頁に記した原因符の者について照合を行った。特に手術あるいは解剖所見にて組織学的に神経芽腫であることが確認された死亡例を抽出した。1991年以降に出生し、2003年迄に死亡した者を死亡コード別に検討し、当研究班で作成したデータベースとの照合を行った。

死亡例のほとんどが、平成7年以降は、C74.9の副腎の悪性新生物、平成6年までは194.0のその他の内分泌腺および関連組織の悪性新生物 副腎であったため、これらを主に解析対象とした。少数であるが、C47.0, C47.4, C48.0, C76.0, C76.1, C76.2に死亡例が認められたため、手術所見あるいは解剖所見で明らかに神経芽細胞腫であった症例を対象とした。今回の検討で、他のコードに死亡例を見出すことはできなかった。

これらのデータを比較検討した（表1）。死

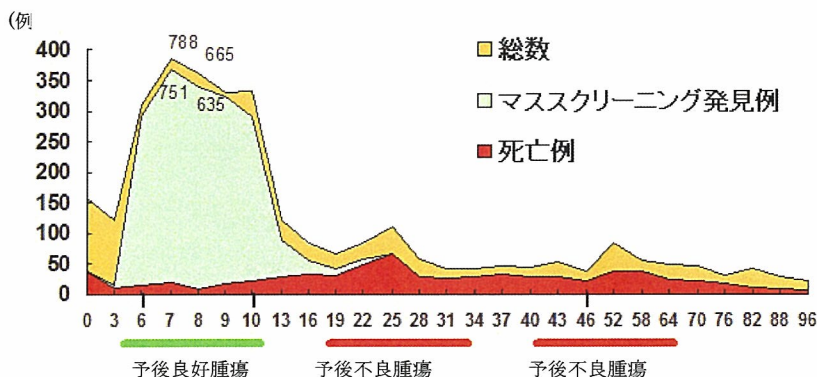


図1. 構築したデータベースの症例の月齢別の発生数

マスで発見される予後良好腫瘍は6-10ヶ月に高頻度に認められる一方、予後不良な症例は、2才前後と4才前後の2峰性の分布を認めた。

亡票との照合で、北海道、東北、中部、中国・四国、九州は80%以上の登録率であり、近畿も71.4%と良好であった。しかし、登録施設が多く、症例数も多い関東・甲信越の登録率が20%代と不良で、全体として63%の程度が我々のデータベースで補足されていると推定された。

表1. 小児慢性特定疾患のデータとの照合結果 (1991年以降出生で、2003年までの死亡例)

	死亡票の死亡数	当研究班データベースの死亡数	データベースの登録率 (%)
北海道	6	5	83.3
東北	28	23	82.1
関東・甲信越	97	22	22.7
中部	40	35	87.5
近畿	56	40	71.4
中国・四国	26	24	92.3
九州	35	31	88.6
計	288	180	62.5

1.1.2 小児慢性特定疾患データとの照合

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）から提供された平成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た。その結果、表2の如くとなった。

表2. 小児慢性特定疾患のデータとの照合結果 (1998-2000年登録例)

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

*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

1.2 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

データベースのうち、1985年から1995年の期間に日本全国で診断された神経芽腫患者2,493名（そのうちマスにより検出された患者は1,750名）の予後と発症年齢のデータから、この腫瘍の発生を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り検討した。その多標的仮説では、神経芽腫の発生には2個の抑制遺伝子、1個の癌遺伝子および1個の分化制御遺伝子が関わっていることを想定した（図2）。受精卵から胚の生成および胎児の成長、さらに出生に至る状況を、細胞の増殖と分化の繰り返しとして見なし、確率過程の1種である分岐過程により定式化した。

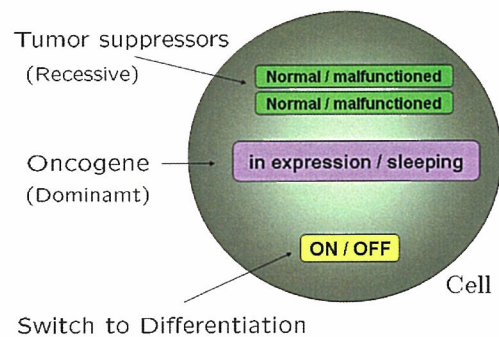


図2. 神経芽腫発生に関わる標的遺伝子

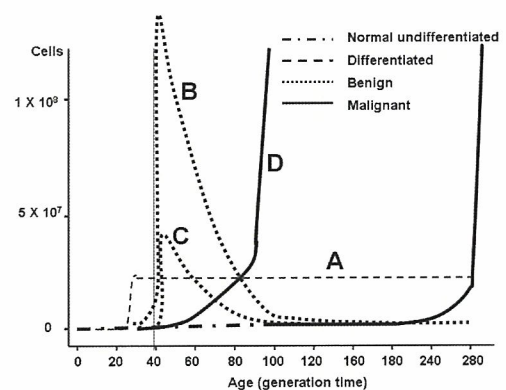


図3. 発育とともに推定細胞数の変化

A：正常細胞で分化すると一定値となる。 B：生後一旦増加する良性腫瘍でその後分化、退縮する。 C：生後一旦増加する良性腫瘍でその後分化あるいは退縮するが一部で後に悪性化する。 D：生後暫くして悪性腫瘍となる

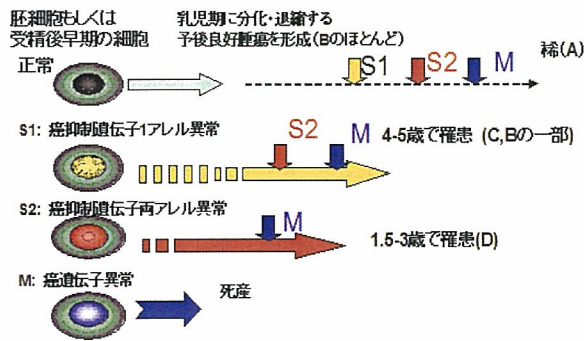


図4. 各神経芽腫の発生モデル

受精早期に何らかの異常がないと悪性腫瘍の発生は極めて稀で、一方、早期の癌遺伝子活性化は胎内発癌となる（A-Dは図3参照。）

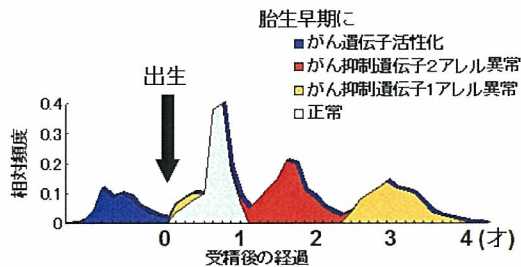


図5. 数理モデルからの4種のサブタイプの受精後の発生頻度

早期の癌遺伝子活性化は胎内発癌となり、生直後には良性腫瘍が発生し、1-2才と3才ころに二つの悪性腫瘍が見られ、図1の分布に近似のモデルと考えられた。

これらの作業で、遺伝子を標的とした多標的モデルを構築し、細胞数の動態に関するモンテカルロ数値実験により罹患年齢分布の説明を試みた。その検討結果と実際の発生数と予後との関連を検討し、より実際に近い神経芽細胞腫の発生モデルを提唱することができた。

その結果、受精後早期の異常の程度からこの腫瘍は4群に分かれることが示され、図3、図4、図5に示すように、受精卵の段階で癌遺伝子が既に発現していた場合には、40世代時間未満の時点（胎内）でその個体は神経芽腫を発症し、結果的に出生に至らないこと、また、受精卵において2個の抑制遺伝子の何れにも異常が無い場合には、確率的にその個体は神経芽腫に至ることがまれであることが判明し

た。そして、神経芽腫の初診時の年齢分布に関して、20世代時間～39世代時間、40世代時間～60世代時間、70世代時間～100世代時間および170世代時間前後の計4群に類別可能であることが分かった。これらの群のうち、40世代時間～60世代時間の群に属する症例はそのほとんどが単に分化制御遺伝子における異常による細胞数の一時的増大によるものであること、その後に現れる2個の群は何れも悪性でありそれに属する患者における致死性も高いことが分かった。すなわち、これらから、図6の仮説を提唱した。受精後早期の段階で「正常」であった場合は神経芽細胞は胎生期に一時増加するがその後分化する（図6のI）が、癌遺伝子の変異がなく正常な分化へのスイッチ機能が損なわれると（図6のII）、良性腫瘍となり、これらは生後間もない時点で多発する。一方、悪性の神経芽腫に罹患する場合は受精後早期の段階でがん抑制遺伝子少なくとも片方が機能不全になっており、がん抑制遺伝子の不活化やがん遺伝子活性化が生じ、これらが分化・退縮のスイッチを抑制し、その後にさらに増殖を来すことで悪性のがんとなるモデルが考えられた。

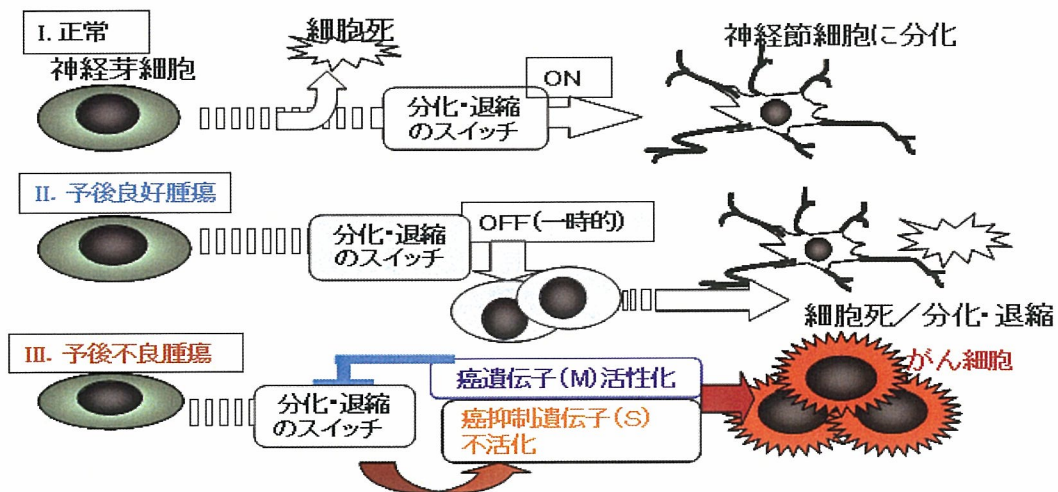


図6. 数理モデルから考えられた神経芽腫の発生モデル

正常の神経芽細胞は、発生段階で多くが細胞死し、分化・退縮して神経節細胞となる。その中で、分化・退縮のスイッチがOFFになったものが良性腫瘍として生後すぐに発生する。これらの腫瘍の多くはいずれ分化・退縮する。一方、発生段階で、癌抑制遺伝子の異常や癌遺伝子の活性化が起きると悪性のがん細胞となるが、これらの遺伝子は分化・退縮のスイッチを抑制するため、早期では予後良好例と同様の表現型となるが、分化・退縮は起こさず進展する。

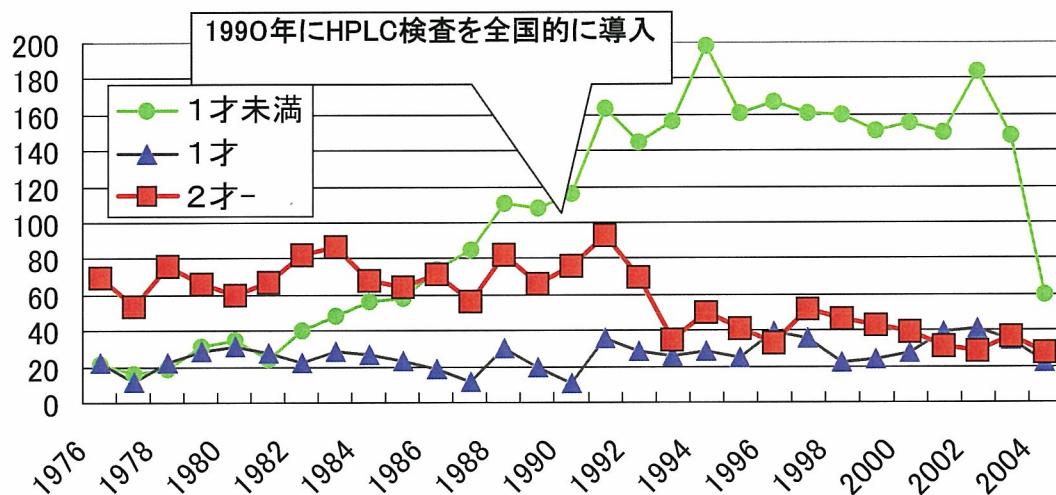


図7. 診断時年齢毎の神経芽腫登録数の年次別変化

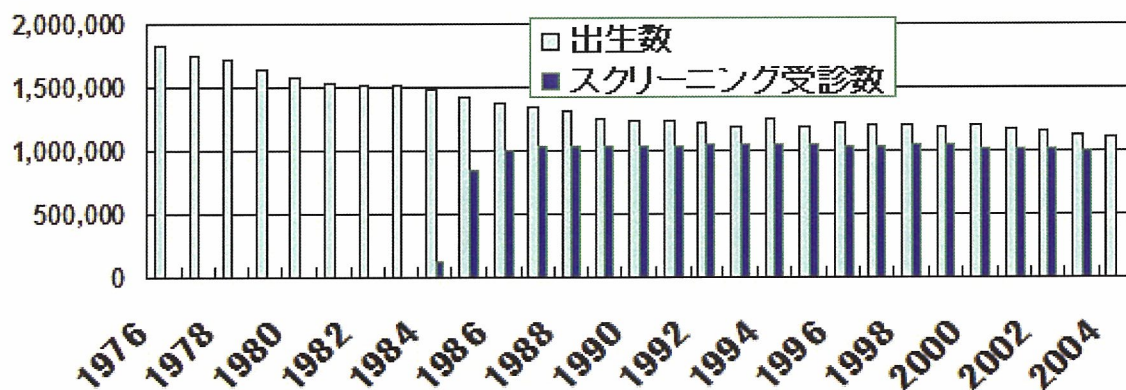


図8. 各年度の出生数と神経芽細胞腫検査事業受診数の年次別変化