

1.3 診断時年齢別神経芽腫登録数の年次変化

年代を追って診断時年齢別に神経芽腫の登録数の変化を検討した（図7）。神経芽腫のスクリーニングを開始した1985年頃から1才未満の乳児症例が増加し、HPLCによる定量法が全国的に行われるようになった1990年ころから、ほぼ横ばいになった。1才代の神経芽腫症例の症例数は数としては変化が少ないが、2才以降の症例は1990年からちょうど2年くらい遅れて半減していた。これは、出生数の低下の関与も考えられるが、出生数は1990年以降の減少率はさほど顕著ではなく、マス受診数も大きく変化していないことから（図8）、HPLCによる神経芽腫スクリーニングにHPLCを導入することによって年長児の進行例が有意に減少したことを示した結果と考えられた。

1.4 乳児期症例の神経芽腫の検討

マス例は525例、非マス例は111例であった。初診時平均月例は、マス例が7.9ヶ月に対し、非マス例が4.1ヶ月と非マス例の診断時期は早期であった。マス例の病期が1期 49.5%，2A/2B期 24.1%，3期 15.5%，4期 4.2%，4s期 6.7%に対し、非マス例が1期 24.5%，2A/2B期 9.1%，3期 19.1%，4期 28.2%，4s期 19.1%と進行例の比率が多かった。診断時のVMA/HVAの値は、マス例が68.2/72.5（ $\mu\text{g}/\text{mg}\cdot\text{Cr}$ ）に対して、非マス例は279.4/233と高値であった。嶋田分類 Unfavorable histology はマス例の1.8%，非マス例の12.5%に認められた。再発、死亡はマス例の4.2%、0.8%に対し、非マス例は7.6%、11.2%と予後不良であった。

1.5 1才代発症の神経芽腫の動向

本研究班で集計したデータベースでは、1才代の神経芽腫症例数は、スクリーニングの施行前後で大きな変動は認められていないが症例の内容について検討を加えた。本研究では、研究方法で示した条件を満たした症例を対象として検討した。

1990年出生以降のHPLCによるスクリーニングを受診した対象は、104例であった。このうち遠隔転移を有するINSS病期4症例は、58例（56%）で、これはドイツの32%、COGの40%に比し有意に高頻度であった。18ヶ月未満では

本邦55%に対し、ドイツ23%、COG37%と差を認めたが、18ヶ月以上では本邦57%に対し、ドイツ56%、COG43%と有意な差は認められなかった（表3）。腫瘍マーカーの検討では、NSE 100 ng/ml以上54例、LDH 1000 U/L以上62例と半数以上の症例が著明高値を示した。生存率（5年 overall survival）では、18ヶ月未満症例において本邦50%に対し、ドイツ86%、COG72%と本邦の治療成績が不良であったが、18ヶ月以上では本邦51%に対し、ドイツ58%、COG56%と差を認めなかった（表3）。

表3. 1才代神経芽腫の本邦と欧米の比較
＜病期4症例の頻度＞

	12M以上 18M未満	18M以上 24M未満	1才代全体
本 邦	55% (28/51)	57% (30/53)	56% (58/104)
ド イ ツ	23% *** (67/293)	56% (66/117)	32% *** (133/410)
C O G	37% * ### (155/419)	43% # (141/328)	40% *** # (196/747)

本邦のデータと比較して有意差有り（*P<0.05、*** P<0.0001）

ドイツのデータと比較して有意差有り（# P<0.05、### P<0.0001）

＜5年生存率＞

	12M以上 18M未満	18M以上 24M未満	1才代全体
本 邦	50% (26/51)	51% (27/53)	51% (53/104)
ド イ ツ	86 ± 2%	58 ± 5%	
C O G	72 ± 3%	56 ± 3%	

1.6 2才以降発症例の検討

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診断時年齢の分布を検討した（表4）。1980年までの、本邦での神経芽腫の診断時年齢分布は、現在の（COG）、ドイツの分布とほぼ同様の分布を示していた。1990年以降は、本邦のマス以前の症例やドイツ、北米の症例分布と比較し、6-11ヶ月の有意の上昇と24-60ヶ月症例の有意の低下を認めた。さらに、

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(図9)。その結果、表4にも示したが、本邦でHPLCによるマスが全国的に施行されるようになった90年度以降出生のコホートでは、6-11ヶ月症例が3倍以上に増加し、明らかに過剰診断症例が認められたが、一方で24-60ヶ月の症例がほぼ半数程度に減少していた。

表4. 本邦およびドイツ、北米での年齢別診断数

発症年齢(月)	日本('90-'94)	日本('70-'84)	ドイツ('90-'94)	COG('90-'94)
<6	132	271	160	245
6 <12	791**	199	104	170
12 <18	41	185	49	107
18 <24	65	141	62	138
24 <60	130**	478	224	406

** P < 0.01

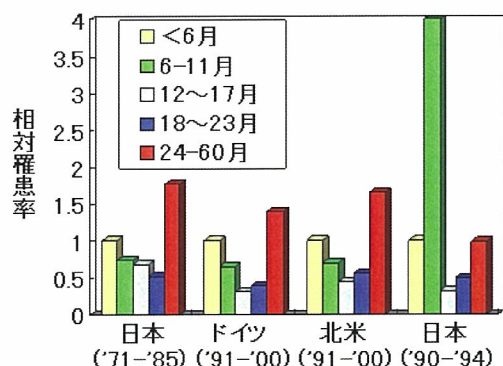


図9. 生後6ヶ月未満症例を1とした時の各年代別罹患率比率

1.7 MYCN増幅症例の検討

1.7.1 乳児期 MYCN増幅症例の検討

乳児期症例の中でMYCN増幅例について比較検討を行った。乳児例でMYCN遺伝子増幅10倍以上(3倍以上)の症例は、マス例は1.5%(3.2%)に対し、非マス例は9.7%(15.1%)であった。さらに、MYCN遺伝子増幅例の診断時月齢は、マス例がマス時期の6ヶ月前後に集中しているのに対して、非マス例は2ヶ月以

前の乳児期早期と9ヶ月以降の後期に集中していた。マス例のMYCN増幅症例は69.2%が非進行例(病期1,2,4s)で病理組織型は全例がFavorable histologyであったが、非マス例のMYCN増幅症例は非進行例が30.8%のみであり、Favorable histologyは22.2%にすぎなかった。MYCN増幅症例の5年無病生存率はマス例が63.3%、非マス例が50.5%とマス例の方が有意に予後良好であった(p=0.01)(図10)。

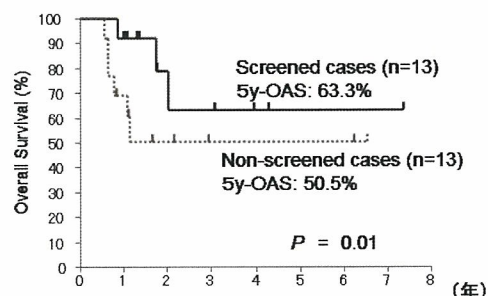


図10. 乳児期のMYCN増幅症例の生存曲線
スクリーニング症例が有意に予後良好であった。(OAS: Overall Survival)

1.7.2 1才代のMYCN増幅症例の検討

2.1で検討したシリーズで1才代のMYCN増幅例は本邦が51例(49%)で、ドイツの20%、COGの30%に比し有意に高頻度であった。また18ヶ月未満でも、本邦41%に対しドイツ14%、COG25%、18ヶ月以上でも、本邦57%に対しドイツ36%、COG35%と、本邦において有意に高頻度であった(表5)。

表5. 1才代の症例のMYCN増幅例の頻度

	12M以上 18M未満	18M以上 24M未満	1才代全体
本邦	41% (21/51)	57% (30/53)	49% (51/104)
ドイツ	14% (41/293) ***	36% (42/117) *	20% (83/410) ***
COG	25% (109/419) * ##	35% (115/328) **	30% (124/747) ***

ドイツおよびCOGの()内症例数は、論文中の総症例数および%より計算

本邦のデータと比較して有意差有り(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.0001)

ドイツのデータと比較して有意差有り(##P<0.01)

1.7.3 MYCN増幅症例の発症年齢の検討

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。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（図11）。

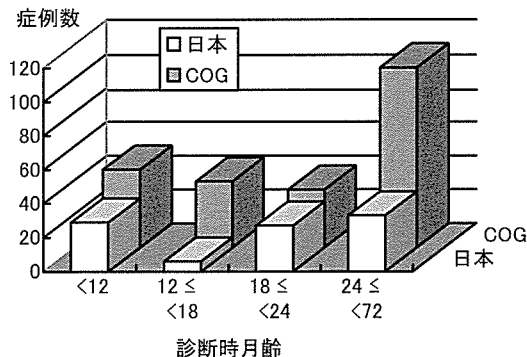


図11. 本邦および北米（COG）での診断時月齢別のMYCN増幅症例の分布（1990-2000）

本邦および北米でのMYCN増幅別を比較検討すると、本邦では北米に比べ生後12-18ヶ月の症例が極端に少なく、これは6ヶ月スクリーニングにて増幅例も早期に発見していたためと推測される。しかし、それとは別に2才から6才の増幅例も有意に減少しており（ $P < 0.01$ ）、これは早期発見だけでは説明不可能である。MYCN増幅例は、おそらく自然退縮するとは考えられないことから、この結果は、MYCN増幅は腫瘍の進展と共に獲得される形質であることを示唆しており、極めて興味深い。このことが事実であれば、早期診断と治療の重要性が大きくなると考えられる。

1.8 後向き研究における6ヶ月マスキリーニングの有効性に関する検討

構築したデータベースを用いて、出生日別にその推移を検討した（表6）。1984年以前の出生例にスクリーニング受診例もごく少数約11万程度が存在するが今回は、総数のみ検討した。1985年に全国的に神経芽細胞腫検査事業が行われ、当初は定性法であったが、1990年以降HPLC法による定量法が全国的に導入されたため、1990年以降とそれ以前の比較を行った。

マス非受診群の発症率は、全国的にスクリーニングを施行した1984年までと、その後の値はほぼ同様であり、出生10万あたり7程度で、これに6ヶ月未満発症の症例10万出生あたり約1.2を加えて、先の死亡票との照合から、このデータベースの登録率が62.5%であったとすると、これらを登録率で換算すると生後72ヶ月までの累積罹患率は13.1（1/7,620出生）となり、従来約7,000人に1人の自然発生との報告とはほぼ一致する。1980-84年が、6.42とやや低値なのは、対象を出生数としたことと、6才までの診断法の変化による診断率の向上が関与していると考えられる。また、6ヶ月未満の罹患率と未受診例の死亡率は、どの年代も同程度で、これは登録率が一定であったことと、本症に関して生死に関しての治療成績の向上が得られていないことを示している。先の死亡票との照合から、本データベースの登録率が62.5%であったとすると、累積死亡率は4.25となり、従来の報告例とはほぼ同様の値となった。これに対して、定性法を行ってきた1985-89年の受診群は、罹患率が12.38、死亡率が2.367となり、登録率から同様に換算すると19.81、3.776、定量法に移行した1990-98年出生の群は、罹患率が18.94、死亡率が1.765となり、登録率から同様に換算すると30.30、2.824となる。表にはないが、1995-99年のコホートでは更に死亡数が低下しており、これは、無治療経過観察の導入やマス陽性例に対する過剰な治療の回避（手術と経過観察療法等の導入）による治療関連死が減少したためと考えられる。これらが、年代を超えて均一に登録されて群であると仮定すると、マス受診群の罹患率の上昇は1985-89年が、1.58（95% CI:1.32-1.91）、1990-98年が、2.61（95% CI:2.15-3.16）となり、定性法では約1.6倍に、HPLCによる定量法では約2.6倍になることが示された。一方、マス受診群の死亡率低下は1985-89年が、0.80（95% CI:0.56-1.13）、1990-98年が、0.46（95% CI:0.33-0.64）となり、定性法では有意差はないが3/4程度に、HPLCによる定量法では有意差をもって1/2以下になることが示され、HPLC法導入による有意な死亡率の低下が認められた（ $P < 0.001$ ）。

表6. 出生年度別の神経芽細胞腫の発症と死亡の比較

出生年	総数	6ヶ月未満	6-72ヶ月発症例*	
			マス受診(受診率) (検出例)	マス非受診
1980-1984 対象数	7,620,203	7,620,203		7,620,203
発症数	567	78		489
累積罹患率	7.441 [11.90]	1.024 [1.638]		6.417
死亡数	245	22		199
累積死亡率	3.215 [5.144]	0.2887 [0.462]		2.611 [4.178]
1985-1989 対象数	6,693,008	6,693,008	4,927,295 (74.6%)	1,765,713
発症数	829	86	606 (469)	137
累積罹患率	12.38 [19.81]**	1.285 [2.064]	12.30 [19.38]	7.759 [12.42]
死亡数	158	13	100 (12)	45
累積死亡率	2.361 [3.778]	0.194 [0.310]	2.030 [3.248]	2.549 [4.078]
1990-1998 対象数	108,789,181	108,789,181	9,342,132 (85.9%)	902,199
発症数	2,024	137	1,775 (1,526)	112
累積罹患率	18.94 [30.30]**	1.133 [1.813]	19.00 [30.40]	7.288 [11.66]
死亡数	125	5	128 (20)	46
累積死亡率	1.765 [2.824]**	0.165 [0.264]	1.370 [2.091]	2.993 [4.789]

累積罹患率、累積死亡率は対10万人に対する6-72ヶ月発症例、6-72ヶ月発症例の死亡について検討した。1980-1984対象数は、出生数より、1985-1999のマスキング対象数と受診率は、厚生労働省白書より引用。[]:登録率を62.5%として人口ベースで換算した値。**:1980-1984(スクリーニング施工前)に比べ、有意(P<0.001)

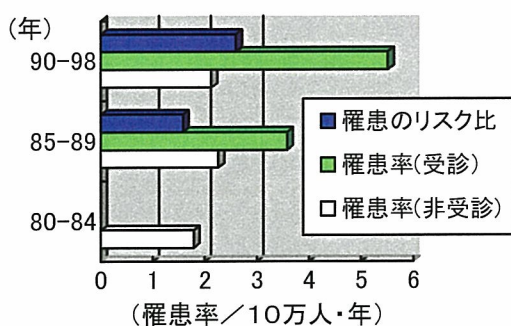


図12. 年代別の6-72ヶ月での神経芽腫の罹患率とリスク比の推移

(罹患率/10万人・年) 罹患率は、登録率で補正した値。85-89年の定性法、90年以降の定量法で罹患率は、約1.5、2.5倍となり、過剰診断例が評価される。

診断時年齢毎の累積発症率と死亡率を1985-99年生まれと、1990-94年生まれで比較検討すると(図14)、明らかに後者で発症率が上昇し、死亡率が低下していた。これを出生数で補正しても有意の差であった。

以上から、本研究班の検討結果から、HPLC法による定量法の導入により、受診例の罹患率が上昇し過剰診断は定性法の時に比べ上昇した(図12)が、

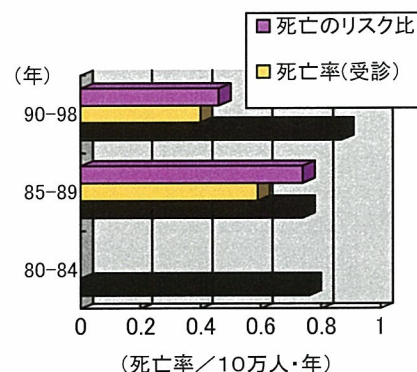


図13. 年代別の6-72ヶ月での神経芽腫による死亡率とリスク比の推移

(死亡率/10万人・年) 死亡率は、登録率で補正した値85-89年の定性法、90年以降の定量法で死亡率は、約0.7、0.5倍となり、定量法では有意の死亡率低下を認めた(P<0.05)。

一方で死亡率は定性法に比べ、有意差を持って低下した(図13)。

累積死亡が、10万にあたり5.5年間で低下率が、2.6人で、非受診例と受診例の死亡率比が0.47であったことは、従来、2003年に難治性疾患克服研究事業、マスキングの効率的実施及び開発に関する

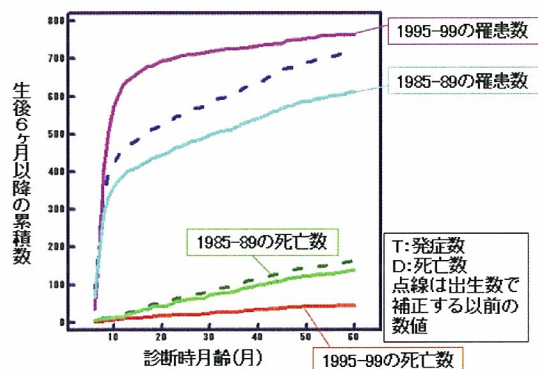


図 14. 年代別の生後6ヶ月以降の神経芽腫による累積罹患率と累積生存率

出生数で補正しても、定量法を導入した時期では、累積罹患率の上昇と累積死亡率の低下を認める。

研究（黒田班）での神経芽腫マスキリーニングの前向きコホートで報告された値0.281よりはやや高値であったが、100万人あたり27.7人の死亡の減少というデータと極めて類似した値となった。

よって、生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業は、罹患率は有意に上昇し、過剰診断が明らかである一方、死亡率の低下も有意であり、今後、過剰診断を最小限にしたスクリーニング法を行うことで、本疾患の死亡率を低下させることが可能であると考えられた。

2 前向き研究

マスの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価を目的に、施行時期を変えてマスを継続、継続検討中の自治体関係者等を交えて、実施時期と方法について検討した（資料4：神経芽細胞腫マスキリーニング時期と方法についての検討資料）。

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1日から2005年7月31日まで札幌市で行ってきた生後14ヶ月の二次マスキリーニングは、受検者数：14,672人（受検率：74.4%）で、精密検査数が8人、検出できた患者数は4人（3,668：1）であった。

受診月齢は13-18ヶ月におよび、13-15ヶ月が86.2%を占めていた。

札幌市の14ヶ月マスは、その発見例の腫瘍性状が6ヶ月マス発見例ときわめて類似して、

予後良好な腫瘍が多かった。また、14マスの発見頻度は、6マス陰性群に対してでも5,787：1であり、患者の発見頻度が高かった。（1990年～2000年の出生コホート：受検者：115,733人、患者：20人）

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生後18ヶ月の二次スクリーニングとの結果を集計した。

それぞれのスタディの結果は、分担研究者報告に詳細に報告されているが、6ヶ月マスを施行し、さらに二次マスとして18ヶ月マスを施行された対象は併せて217,795人のコホートとなり、結果的に163,704人が6ヶ月マスを受診し34例が発見され、さらに18ヶ月マスを133,393人が受診し12例が発見されている。臨床発見例は、19例で、6ヶ月前に1例、6-18ヶ月の間に7例発見され、このうち4例が6ヶ月マス非受診で2例が死亡していた。18-47ヶ月例は7例で、全て18ヶ月非受診例でこのうち6例が腫瘍死していた。残りの4例は、48ヶ月以上の症例で、いずれも18ヶ月マス陰性であった（図15）。一次マス、二次マス発見例ともに死亡例はなく、あわせて、65例が診断、治療され、3,350人に1例の割合で発見されていた。罹患率から、6ヶ月マスでかなりの過剰診断例が存在することは、従来の報告と一致する結果であったが、特記すべきは、18ヶ月マス受診例に4才までの発症とさらに死亡例がなかったことであった。集計結果では、18ヶ月以降の神経芽腫の死亡率は、10万出生対18ヶ月マス受診群が2.25人、非受診群は7.10人となった。統計解析法については、問題があるところであるが、マス受検群の死亡率が低いことが明らかになった。

2.1.3 生後18ヶ月スクリーニング

生後6ヶ月マスが休止となった以降に、現在進行中の、大阪（2004.5～2006.10）、京都（2004.12～2006.8）、札幌（2006.4～2006.10）の18ヶ月マスの状況についてまとめてみると、集計63,908人受診し、10名の神経芽腫が

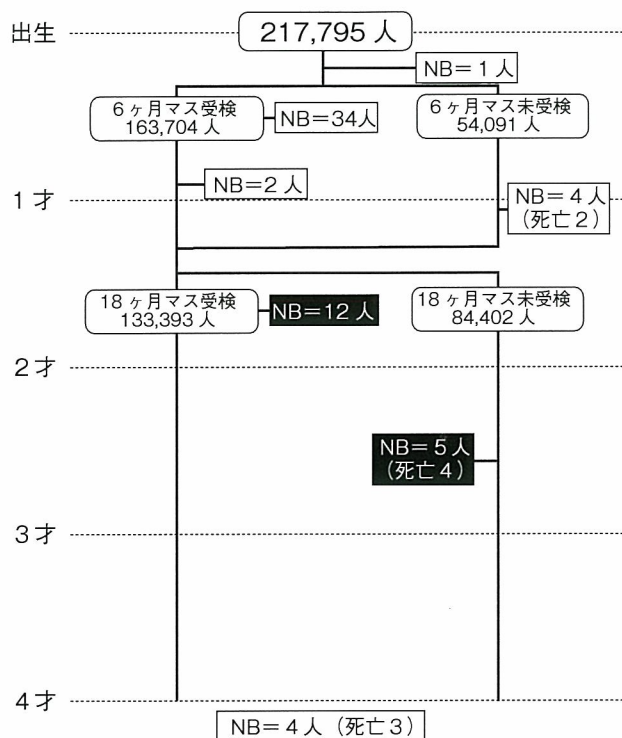


図15. 18ヶ月での2次スクリーニングのまとめ (宮城 '92 - '02と京都 '90 - '00を集計したもの)

発見されている。これらは、全例現時点では生存中であり、早期発見として18ヶ月が明らかに遅いことを示唆した症例や過剰診断例はなかった。発症率は66,391出生に対して1 (対10万出生あたり1.56) であった。先の二次マスのデータが、11,116出生に1 (対10万出生あたり0.89) であったことから、発見率は二次マスよりも高く、自然発生が7,000人に1人ということから、妥当な値であると考えられた。さらにこれらの症例の長期予後とともに、臨床発症例の分布、さらにそれらの悪性度解析が必要と考えられた。これらのエビデンスから、18ヶ月マスの有効性を検証する大規模な前向き研究が是非とも必要であることが強く示唆される結果となった。

2.2 無治療経過観察症例の検討

自然退縮あるいは分化例がほとんど検出されなくなる年齢で、かつ悪性度の高い腫瘍が早期に検出可能である年齢を検討した。

VMA/CRN, HVA/CRN高値のために要精検となり、大阪大学、大阪母子総合医療センターで、

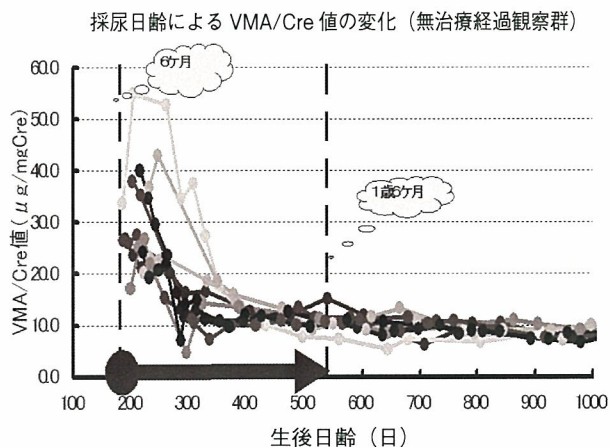


図16. 無治療経過観察例の尿中 VMA値の変動。ほぼ18ヶ月までに全例正常域に低下している。

精密検査で陰性であった症例のうち、その後追跡された例を検討した。VMA/CRN、HVA/CRNともにほとんど12ヶ月までに、18ヶ月では全例が基準値以下に低下していた。更に、大阪府などで数年来実施している無治療経過観察したI期II期の自然退縮例のその後の追跡結果でも、同様の傾向が見られた (図16)。

2.3 コストベネフィットからの検討

神経芽腫を病期別に入院日数の平均および初年度医療費を比較した (表7)。

先の罹患率、死亡率の変化 (表6) から、年間100万人出生したとすると生後72ヶ月までの罹患数がマスで184人増加し、進行例23人助かっている計算になる。仮に、病期Iが184人増えて、病期IV Aが23人減少したとすると、前者の医療費が25,760万円増加し、後者が41,331万円減額となる。マスに一人あたり700円で受診率が80%とすると、56,000万円で、結果的に40,429万円のコストがかかることになる。これは、6ヶ月マスの概算であり、これを18ヶ月で行なうと、過剰診断が0となり、病期IV Aなどの進行例をより減少させることができれば、コストベネフィットも0を超えて、プラスに転じる可能性も高く、この疾患の死亡の低下とともにコスト面からも十分に有効性の高いスクリーニングになると考えられた。

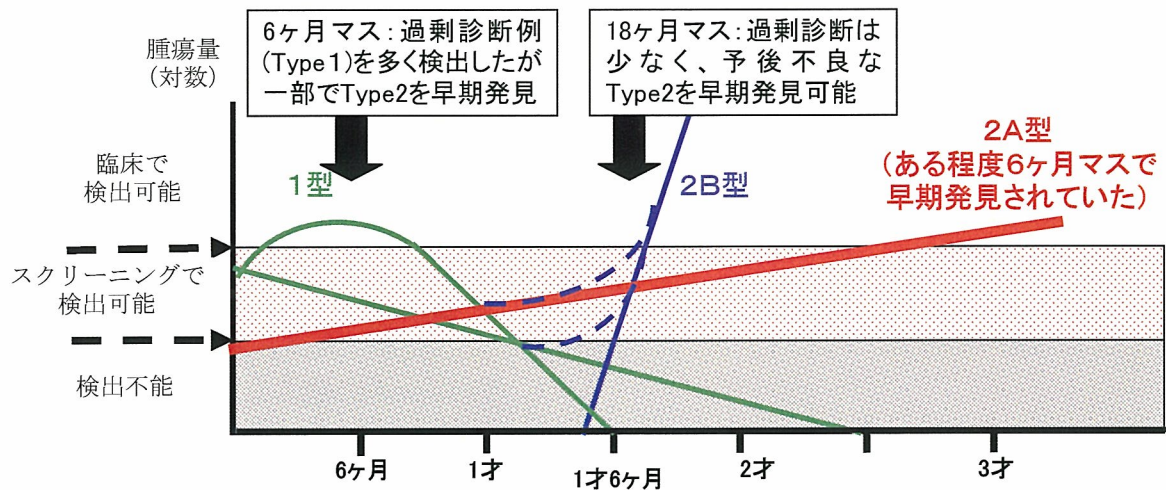


表7. 病期（日本小児外科学会分類）別の入院日数と初年度医療費

病期	症例数	入院日数	初年度医療費
I	9 (9)	28	140万円
II	12 (12)	63	239万円
III	7 (6)	134	560万円
IV A	7 (1)	251	1,797万円
IV B	4 (0)	215	994万円
IV S	1 (1)	131	482万円

() スクリーニング症例

2.4 後向き研究からのエビデンス

生後6ヶ月マスの後向き研究から、明らかに3つのサブグループが存在し、これらの発症形態がほぼ明らかになってきた。これらのうち、1型は予後良好型で、生後に認められ、これらはほぼ生後18ヶ月ころまでに退縮或いは分化することが推定された。一方、予後不良な2つのタイプは、生後1才以降にその多くが症状を呈してくるため、早期発見が有効であることが明らかになった(図17)。

生後6ヶ月マスで2才以降の症例が明らかに減少していることから、生後6ヶ月スクリーニングにおいてもある程度早期発見されていることも明らかになった。

MYCN増幅例の検討からも、2才以降のMYCN増幅例の減少に寄与していることが示され、生後18ヶ月頃までに早期発見することが有効であることが示唆された。

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

対象年齢を生後18ヶ月に変更してマス事業を継続あるいは再開する京都、大阪、新潟、札幌などのマス施行群と、神経芽細胞腫の発生率が同等で、全数登録可能なマスを施行しない自治体を対照群とした前向き研究について、サンプル数と観察期間、マス施行時期、方法と精度管理、受診例および非受診例の追跡調査方法などの具体的プロトコルを作成した。これらのプロトコルを配布し、綿密に自治体と連携、協議し、前向き研究の開始の科学的妥当性と倫理性を検討し、プロトコル案を作成した(資料5.6: 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および実施要綱)。その前段階として、これらのプロトコル内容の評価と、参加可能な自治体の調査、神経芽腫の発生が同等な対照となる自治体の選定、臨床研究としてのインフォームドコンセントの作成、倫理申請等の検討を行った(資料7: 保護者への説明文書)。

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)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%であった。それぞれの年齢分布をみると、12ヶ月までの729乳児例(全体の73%)のうち、マス例ではその間の腫瘍死

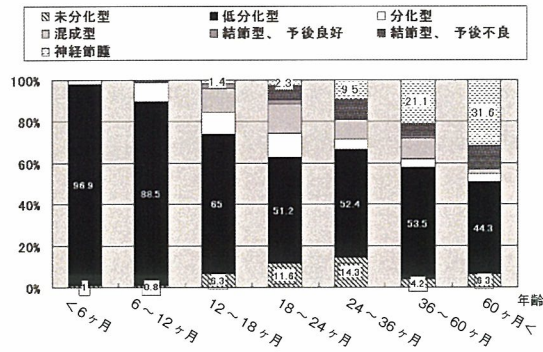


図18. 神経芽腫群腫瘍の診断時年齢とINPC組織型比率との関連性

亡例はないが、非マス109例で約10%が死亡していた。12ヶ月から24ヶ月までの症例は106例で、マス66例での死亡例はないが、非マス40例では13例（うち9例が18ヶ月以上）が死亡した（死亡率32.5%）。2才以降の非マス例全体の死亡率は52.3%と半数以上であった。

国際分類（INPC）により組織型を分類した結果、未分化型が2.8%、低分化型が80%、分化型が8.1%、混成型が2.9%、結節性が1.9%、神経節腫が4.2%であり、低分化型の頻度が高い。死亡率でみると、未分化型及び高MKI (mitosis-karyorrhexis index) の低分化型では40%以上の死亡率を示し、中間～低MKIの低分化型神経芽腫の13.3%、5.3%に比較して明らかに予後不良であった。さらに年齢分布と組織型との関連を1,121例で検討してみると、18ヶ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した。（図18）。

組織所見と予後との関連では、マス例は予後良好群は97.3%であり、腫瘍死は1例のみで、非マス例では、予後不良群は48.0%であり、死亡率が60.0%で、2才以降の予後不良群の死亡率は65%とさらに高かった。

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、18ヶ月から5才までの106例の死亡率は50%で、5才以上の71症例では、38.0%であった。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、高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く、低分化型神経芽腫のなかでも

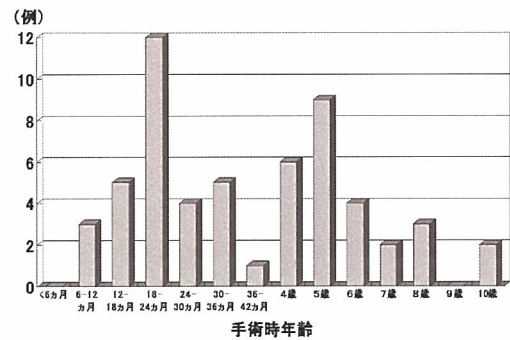


図19. マス陰性の神経芽腫56例の診断時年齢の分布

中間型MKI、低MKI症例は18ヶ月までは7.7%、5.1%の死亡率であるが、18ヶ月以降は56.0%、64.6%と高い死亡率を示した。

小児医療7施設の533例についてMYCN増幅の有無を検索した。MYCN増幅が56例で、未分化型神経芽腫の83%はMYCN増幅を示すが、低分化型では9.8%の増幅である。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、MYCN増幅例は0.9%であった。

神経芽腫群腫瘍でDNA倍数体とMYCN増幅や組織型との関連性をみると、非マス例で3倍体およびMYCN非増幅例は26.3%が死亡し、とくに18ヶ月以降に死亡率が高く、2倍体/4倍体およびMYCN非増幅は31.7%が死亡し、2才以降に死亡率が高い。非マス例でMYCN増幅例は59.0%が死亡し、年齢にかかわらず死亡率が高かった。一方、マス例の検討では、タイプ分類と予後との関連性に乏しかった。

マス陰性例の臨床所見として、マス受診時期の詳細な調査ができたマス陰性20症例のマス受診年齢は平均7ヶ月であり、その半数が6ヶ月検診であった。この20例では病期4が80%を占め、生存率は35%であった。またマス陰性56例について手術時年齢、腫瘍発見までの経過期間からみた症例（積算数）の年齢分布をみると、発見時期には18ヶ月前後と5才頃の二つのピークがあり、症例数は18ヶ月前後に集中していた（図19）。症例の大半はstage 4で、その生存率は54.5%であっ

たが、組織学的には予後不良群と予後良好群の間に生存率の差はみられなかった。

マーカー陰性の要因として、分化成熟傾向を示す神経節腫の3例ではマーカー陰性であり、神経節芽腫の11例のうち9例もマーカー陰性であった。未分化神経芽腫の8例中、2例がマーカー陰性であった。その他の臨床的に発見された神経芽腫のうち、組織型が低分化／分化型神経芽腫の大半はVMA / HVA陽性であり、その34例の経過期間をみると、6ヶ月までの比較的短い経過が3例で18ヶ月から36ヶ月、あるいは3年以上の経過で発生したと考えられる症例が多かった。

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する目的で、全国主要12施設での腫瘍の保存状況を調査し、約1,100例の腫瘍特性の分子生物学的データの集計を行った。測定法、判定基準の差異から、集計困難な因子も少なくなく、まずはこれらの腫瘍のバンキングを行うべく、バンキングに向けた規約づくりを行い、平成18年10月25日に第一回バンキング設立委員会を立ち上げた（資料8：神経芽細胞腫腫瘍特性解析協議事項）。

協力を依頼した施設は、1991年以降に10例以上の神経芽腫の治療例のある34施設に依頼したが、このうち中央病理診断に承諾頂いた24施設

にバーチャルバンキングを依頼し、同意の上、参加を依頼した。同意して参加する7施設を中心に検討し、骨子、運営方法、研究審査、検体登録法、使用規定について策定した（資料9：バーチャルバンキング運用規定）。

3.3 腫瘍のゲノム解析

凍結組織を用いた腫瘍特性解析において少量の腫瘍DNAを用いた検査で、感度、精度からも同一判定基準でこれらが一度に解析できる方法として、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)）で解析し再検討した。マス発見例76例を含む198例を対象とし、遺伝子変化はSNPsアレイ (Affymetrix社製) を用いて検索した。遺伝子異常のパターンは4群に分かれ、ほとんど異常ないもの (Silent型)、それぞれ染色体全体が増減しているもの (Whole chromosome gain/loss型)、染色体の一部が増減があるもの (Partial chromosome gain/loss型) と、MYCN領域の増幅を認めるもの (MYCN増幅型) の4群に大別し得た (図20)。その予後は、Whole Gain/Loss型42例は1例を除いて生存し極めて予後良好であったのに対し、MYCN増幅型39例は5例を除き予後不良であった。Silent型49例、Partial Gain/Loss型52例は予後良好、不良がほぼ半数であった。

以上から、神経芽細胞腫の生物学的特性はゲノム異常に依存しており、ゲノム異常の解析が予後予測に極めて有用であることが示唆された。とくに、Whole chromosome gain/loss型は、予後良好で、現在の治療に十分反応し、過度な治療を軽減することが可能であると考えられた。一方、他

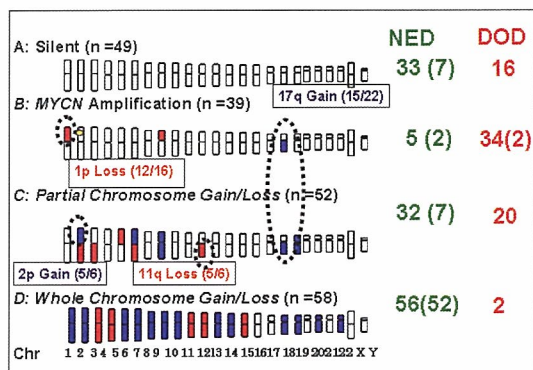


図 20. SNPs でのゲノム異常パターン

赤色：欠失部分、青色：増加部分、()内はスクリーニング陽性症例

Chr; chromosome, NED; event-free survival, DOD; dead of disease

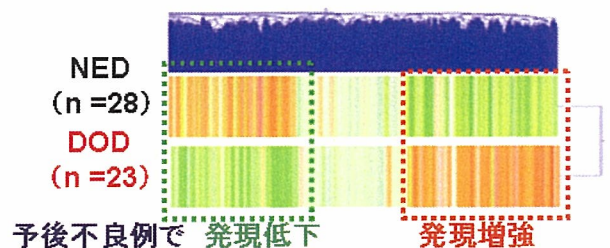


図 21. 遺伝子発見のクラスタリング解析

赤色：遺伝子発見増強、緑色：発見低下、NED; event-free survival, DOD; dead of disease

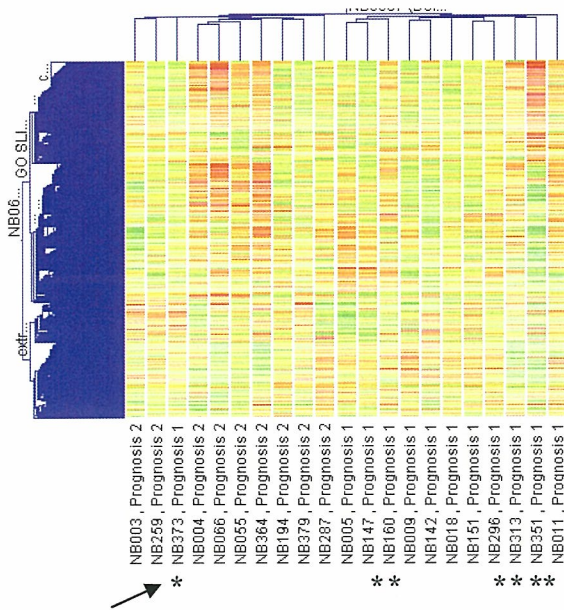


図22. 遺伝子発現の無層別クラスタリング（発現のあった28,817個の遺伝子を使用），Prognosis1：予後良好、Prognosis2：死亡例、予後良好例と死亡例が層別化されたが、1例マスキング症例（矢印）が予後不良例に分別された（*：マスキング発見例）。

の3型には現行の治療では不十分な症例があると考えられた。以上から、ゲノム解析から腫瘍特性とその症例の将来像が予測可能となった。

3.4 腫瘍の遺伝子発現解析

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 (Affumetrix 社製を用いて解析した。発現データの解析は、発現解析ソフト (GeneSpring、Agilent社) を用いた。3.3の解析で Partial deletion/loss型と Silent型に予後不良例と予後良好例が混在していることから、これらの群51例の遺伝子発現を Human Whole Genome Array で網羅的に解析した。その結果、予後良好であった28例が不良例に対して2倍以上に発現上昇した遺伝子が842個、発現低下した遺伝子が1,174個、クラスタリング解析にて同定された。(図21)。

さらに、21例のサンプルを Human Genome U133 Plus を用いて解析した。21例中有意には発現がみられた28,817遺伝子全てを用いて階層解析を行うと、予後良好な腫瘍と不良な腫瘍に層別

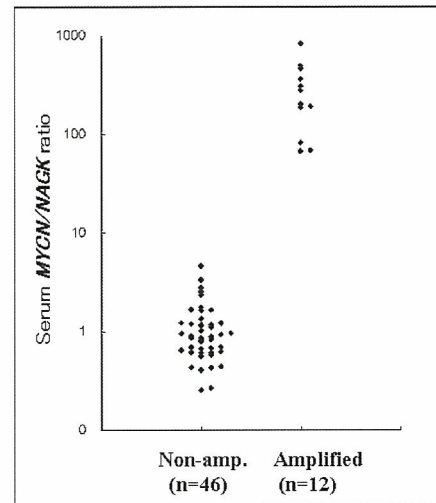


図23. MYCN増幅例 (Non-amp.) と非増幅例 (Amplified) の MYCN/NAGK 値

化された。予後不良例の中にスクリーニングで早期発見された腫瘍が存在することが示され、スクリーニングの有効な症例を見出すことが可能であった (図22)。

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

治療前の保存血清が利用できた87例、うちMYCN増幅17例の血清遊離DNAを抽出し、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 で定量した。MYCN/NAGK 値は増幅例 (median 199.3, range 17.1-901.6, 99% C I 107.0-528.7) では非増幅例 (median 0.87, range 0.25-4.6, 99% C I 0.82-1.26) に比べ有意に高く (p < 0.001, Mann-Whitney U test)、MYCN/NAGK値の cutoff を10とした場合、sensitivity, specificity, PPV, NPV ともに100%を得た (図23)。

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-斉定量系の確立

LCにより分離したそれぞれの物質がマスにおいてどのようにイオン化するか及びESIとAPCIのどちらがカテコールアミン類の分析に適しているかについて検量線を作成することにより検証した。ESIにおいては、アミノ基を有する6種類についてはポジティブモードで検出が可能であったが、VMAとDOPACに関してはネガティブモードで[M-H]⁻の形で検出が可能で、HVAに関してはどちらのモードでも検出がされなかった。これに対しAPCIでは、全ての物質をポジティブモードで検出されESIで検出されなかったHVAについても検出が可能であった。よって、検出限界、定量限界に関しては、HVAを除く全ての物質においてESIの方が優れていた。これらの濃度は血清の基準値に近い値で、実際の検体分析にも十分に利用可能であるといえる。

3.5.2.2 尿中カテコールアミン-斉分析の為に前処理濃縮法の確立

前処理の流れとしては、尿試料100 μLを陽イオン交換-逆相ミックスモード樹脂であるOasis MCXカラムに添加し、1%ギ酸溶液を3分間流すことにより電解質やイオン性の物質の除去を行った。3分後に移動相を2M

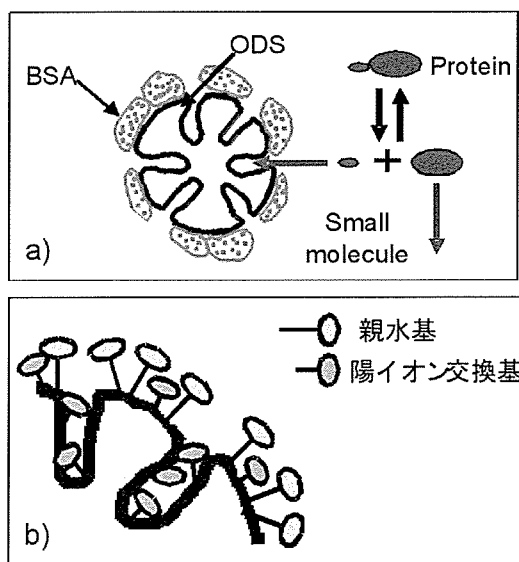


図 24. a) 内面逆相カラムの原理
b) 内面陽イオン交換カラムの原理

HCOONH₄ buffer (pH 3) : ACN=20 : 80に変更することによりカラム内に保持されていたカテコールアミン類を溶出させ、これらをLC/MSにて検討し良好な再現性を得た。

さらに、LC/MS/MS、MRMモードによる検量線の作成を試みたが、全ての物質についてAPCIの方が検出限界も低く、定量範囲が広く、APCIの方が良好な直線性を得ることができた。

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

血清のカテコールアミン類を含む低分子の抽出においては、多量に存在するアルブミンなどのタンパク質に結合していることもあるため、低分子とタンパク質の分離の目的で、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 (MF-SCX、SHISEIDO) (図24) を用いた血清直接注入による分析を試みた。どちらのカラムにおいても多孔性樹脂の表面が親水性にコートされているため、タンパク質のような大きな分子は孔の内部に入り込むことができず、表面とも相互作用できないため、カラムに保持されないが、低分子は孔の内部に入り込むことができるため、それぞれの修飾に応じた物質の保持がおこる。内面逆相カラムでは孔内部のODSにより脂溶性の高い物質 (カテコールアミン類であればカルボキシル基をもつVMA、DOPAC、HVA) を保持する。これに対して内面陽イオン交換カラムでは、内部に陽イオン交換基が修飾されているため陽イオン性の物質 (カテコールアミン類のうちアミノ基を持つnorepinephrine, epinephrine, dopamine, normetanephrine, metanephrine, DOPA) を保持する。今回の実験では、血清試料100 μLをカラムに添加し、1%ギ酸溶液を4分間流すことによりタンパク質の除去を行った。さらに4分後に移動相を内面逆相カラムについては1M NH₄HCO₃ buffer (pH 10.9) : ACN=5 : 95、内面陽イオン交換カラムについては3.6 M HCOONH₄ buffer (pH 3) : ACN=50 : 50に変更することによりカラム内に保持されていたカ

テコールアミン類を溶出させた。これらの溶液を回収、蒸発乾固した後、再溶解し分析に用いた。LC/MSによりこの前処理の再現性について検証した結果を Norepinephrine において C.V.値が5%を超えてしまったもののほかの物質においては5%以下と良好な再現性を得ることができた。カテコールアミン添加血清を試料とし、LC/MS/MS、MRMモードによる検量線の作成を試みた。尿分析の結果と同様に、全ての物質について APCI の方が検出限界も低く、定量範囲が広いという結果になった。更に直線性に関しても、APCI の方が良好な直線性を得ることができた。以上により確立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。

患者血清の分析により得られた LCクロマトグラムにおいては比較的早い時間（極性の高い物質が溶出する領域）に大きなピークが2つ、遅い時間（極性の低い物質が溶出する領域）に小さなピークが数多く検出された。ほとんどのピークにおいてピークの幅が比較的広いことから1つのピークの中にいくつかの物質が含まれていると考えられる。マス分析結果よりどのような物質が検出されているか抽出してみたところ、約250種の物質を抽出できた。これらの物質の変化・物質のパターンにより、予後やタイプの分類ができなかと考え、3次元のグラフ化を行った。結果が図25である。コントロール血清と早期例I期は、ほぼ似た形状をしている。しかし、I期ではグラフの左側（ m/z が小さく、溶出が早い物質）及びグラフの右側（ m/z が大きく、溶出が遅い物質）の群が検出されていないなどの相違点も見られた。しかしながら本邦分類IV期を比較してみると同じ病期にもかかわらず、大きくパターンが異なっている。これらのマッピングからある程度特性が推定可能と考えられた。

マス専用の統計解析ソフト MakerView を用いてマーカー検索を行った（図26）。

その結果、コントロール群で検出されず、腫瘍のある症例で検出されるマーカーと予後不良な症例のみに検出されるマーカーが見出され、前者は新規腫瘍マーカーとして、後者は、治療

が必要な予後不良例を層別化する悪性度マーカーの候補であり、それぞれいくつかの候補マーカーが見出された。

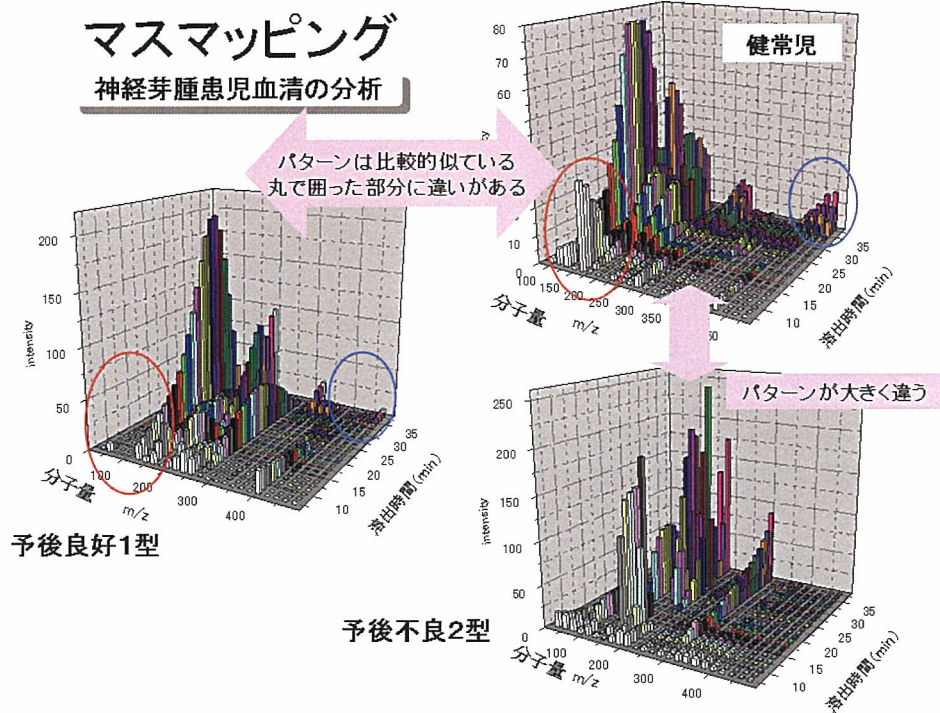


図25. マスマッピング：質量と溶出時間と濃度の三次元解析による血清分析結果

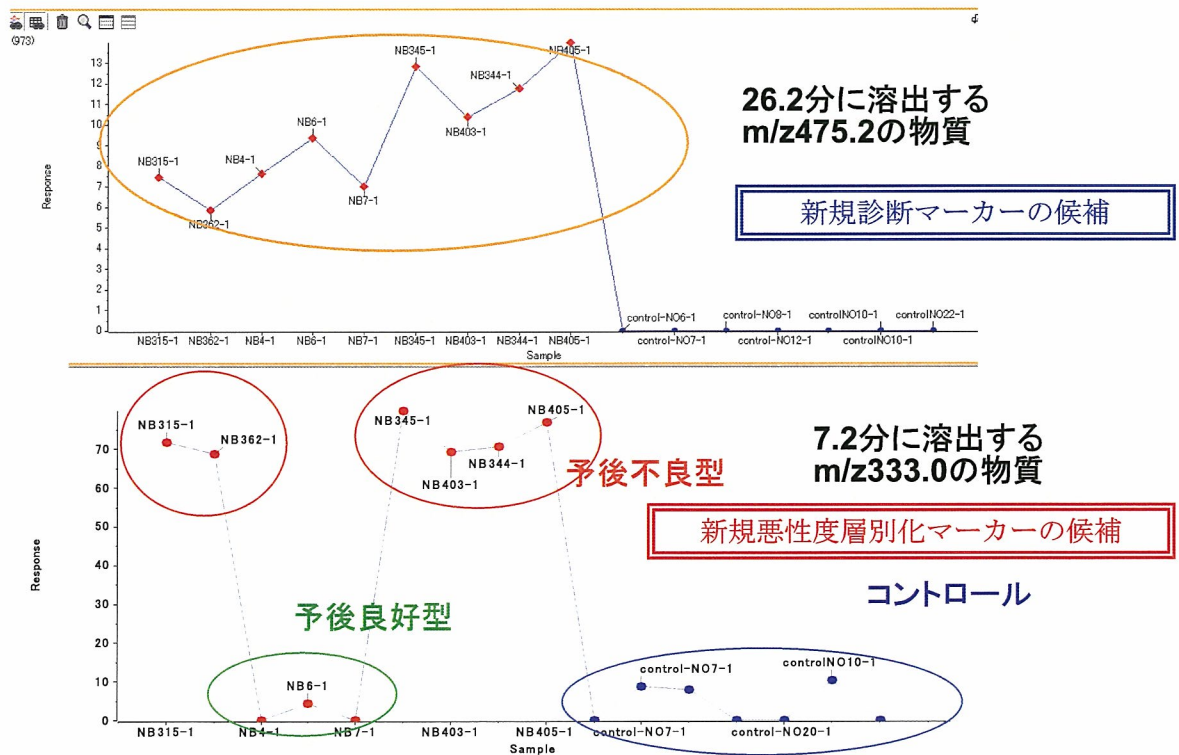


図26. 解析ソフト Marker View での結果：上段は新規診断マーカーの、下段は新規に悪性度層別化マーカーの候補として有用（現在、ペプチドの配列解析し、特許申請準備中）。

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い、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（資料10：神経芽細胞腫のリスク分類検討会資料）。

表8. リスク因子別の相対リスク

リスク因子 (参照群)	相対リスク (95%信頼区間)
本邦病期分類 (病期 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 IV A	10.93 (2.40, 49.87)
病期分類 IV B	5.32 (0.99, 28.51)
病期分類 IV S	4.91 (0.85, 28.46)
MYCN増幅 (増幅なし)	3.35 (2.18, 5.16)
発見経路 (VMAマス)	
検診	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)	2.28 (1.32, 3.94)
治療開始月齢 (1ヶ月分)	1.01 (1.002, 1.015)

本邦病期分類、MYCN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の順に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（表8）。

3.6.2 本邦の神経芽腫リスク分類の提案

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才未満のMYCN非増幅症例でINSS 3が5年EFS 94.4%と中間から低へ、INSS 4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INSS 1が92.3%と高から低へ、1才未満のINSS 4sが80%と高から中間へとダウンリスクが必要であった。（表9）

表9. COG分類に基づいたリスクの検討

病期	年齢	MYCN増幅	病理	核型	EFS(n)	リスク
1		-			98.9(613)	低
		+			92.3(15)	高→低
2A/		-			96.7(271)	低
2B		+			57.1(7)	高
3	1 >	-			94.4(55)	中→低
		+			33.3(3)	高
	≥1	-	F		- (1)	中
			U		51.1(14)	高
			+		16.7(6)	高
4	1 >	-			91.1(97)	中→低
		+			43.9(26)	高
	≥1	any			21.4(604)	高
4s	1 >	-	F	H	100(7)	低
				D	87.1(26)	中
				U	- (2)	中
		+			80(5)	高→中

病期：INSS (International neuroblastoma staging system) による、EFS: 無病生存、F: favorable, UF: unfavorable, H: hyperdiploid, D: diploid リスクは高：EFSが70%未満、中：70-90%、低：90%以上

MYCN増幅症例では、INSS1は年齢に関らず5年EFS (event free survival) 92.3%と低リスク、INSS 4Sは5年EFS80%と中間リスク、INSS 2A/2B, 3, 4は5年EFS 57.1%, 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EFS 98.5%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INSS 2A/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。以上の高、中間、低リスクの分布はマスキューニング例を除いた臨床発見例のみでも、有意であった。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。

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（表10）。

表10. 本邦分類案

年齢	病期	MYCN 増幅	病理	リスク	予測 リスク
any	1	any		低	低
	any	+		高	高
	4S	+		中	高
18>	2A/ 2B/ 3	-		低	中
	≥18	2A/	F	低	中
		2B/ 3	U	高	中B
18>	4	-		低	中
≥18	4	+		高	高
18>	4S	-		低	低

EFS: 無病生存, F: favorable, UF: unfavorable, H: hyperdiploid, D: diploid

予測リスクは、スキューニング休止後のリスク、中Bは中間リスクでもやや高いリスクのもの

D. 考 察

2003年まで過去20年近く継続されたこの事業は、過剰診断による不利益の存在は社会的な反響も大きなものがあつたが、一方で、これらから得られたエビデンスを今後の神経芽腫の診断と治療成績向上に確実に結びつけることが我々の研究班の使命である。特に休止にあたり、早急に解決すべき点として①本症の罹患と死亡の正確な把握、②マスの実施時期変更等、新たな検査方法の検討・評価、③本症

による死亡の減少を目指した臨床診断と治療成績向上のための研究の推進と実施体制の確立、の三点が挙げられ、これに対して、①後向き研究、②前向き研究、③腫瘍特性解析、の3分野に分けて検討した。

後向き研究のデータベースとして、1980年以降に診断された症例の発生頻度と予後の統計解析と病理所見の検討に加え、人口動態調査死亡票の使用が許可され、さらに小児慢性特定疾患データベースの使用も承認され、当研究班のデータ自体の内容も充実し、推計登録率は約62.5%と考えられ、人口ベースの検討が可能となった。奇しくも、北米あるいはドイツのデータが昨年公表され、これらのデータと比較検討することで人種間の問題はあつたが、同時代の比較さらに生物学的特性解析のデータの解析も可能であった。

まず、最初に発生頻度と予後から数理モデルの解析を行い、神経芽腫は3つのグループ（胎生期発症を加えれば4つ）に分かれることが示された。神経芽腫の発生をがん遺伝子、がん抑制遺伝子、さらに神経分化のスイッチが関与するモデルとして解析したが、現在、臨床因子、腫瘍特性と予後等の解析から神経芽腫の特性を3分類しているもの（Brodeur GM, et al. *Nature Reviews Cancer* 2003）、すなわち自然退縮するI型と予後不良な2つの型で、特に悪性で進行する2A型と高悪性度の2B型に分類しているものに極めて類似した結果となつた。この事実から、この腫瘍の発生原因とそれに関わる遺伝子として、がん遺伝子はMYCNである可能性が高い。実際、乳児期早期からMYCNが増幅している腫瘍はきわめて稀であり、胎児期のMYCN活性化は死産を招いているとすると説明可能であり極めて興味深い。MYCN遺伝子を含めたがん遺伝子、がん抑制遺伝子、さらに分化のスイッチの解明は、神経芽腫の診断・治療に直結する極めて意義深いものと考えられる。

後向き研究で得られた実際の疫学研究での大きな成果は、6ヶ月マスで乳児症例の過剰診断が、マスを行わない時の臨床診断例に加えてさらにその50-150%程度存在しており、特にHPLC導入後に罹患率が約2.5倍になり顕著となつていた。その一方で、HPLC導入後に2才以降の年長児症例が半減し、その結果、死亡率は受診群が、非受診の1/2以下に

なり、死亡率低下への有効性も証明されたことは新たな事実であった。この結果が、従来の欧米の有効性に疑問を投げかけたデータと異なった理由は、北米の研究は定性法での検討が主であったこと、1才代の神経芽腫の早期発見に主眼をおいたこと、さらにHPLCを導入後の長期解析がなされていなかったことなどが考えられる。実際に、スクリーニング前、定性法、定量法のそれぞれのコホートで比較検討した結果、本邦でも定性法では有意差は認められず、定量法にてはじめて有意の死亡率低下を認めている。この結果は、既に平成15年の黒田班の研究成果である生後6ヶ月児の神経芽腫マスキューニングの前向きコホート研究での死亡率の低下と一致する結果で、実際に登録例と推定登録率からみた累積死亡率の低下が、出生10万あたり2.6人であったことは、黒田班での前向き研究で人口100万あたり27.7人と極めて近似した値であったことは特記すべき結果であった。この結果から、神経芽腫のスクリーニングは受診することで、過剰診断を受けるリスクは伴うかわりに明らかに腫瘍死するリスクは半減することが示された。

過剰診断は、この腫瘍のスクリーニングにとって大きな問題であることは言うまでもない。しかし、ここで注意すべき点は、確かに疫学的に解析することで過剰診断は明らかに存在するが、どの症例が過剰診断症例であるかを判別することはできないことである。あとで述べるが、手術をして腫瘍解析すると、ゲノム異常から予後を判別することは可能であるが、それでも完全ではなく、まして腫瘍を切除せず非侵襲的に個々を見極めることは現時点では困難である。さらに、今回の解析で、年長児の予後不良例、特にMYCN遺伝子増幅例の総数が6ヶ月マスで明らかに減少した事実は、一見予後良好で退縮・分化する腫瘍と思われる腫瘍の中にいくつかは悪性度の高い腫瘍に後で変化している可能性を示しており、この理由からも腫瘍解析から過剰診断であるかどうかの判定は困難であるといわざるを得ない。さらに、これは無治療経過観察にも大きな警告を発しているとも考えられる。

これらの結果から、過剰診断を最小限にすることを十分に考慮し、さらにこれらが悪性度の高い腫瘍に転換するとしても悪性度の高い腫瘍が発生・進展する以前にスクリーニングを行うことが可能であれ

ば、極めて有効なスクリーニングとして施行できる可能性が考えられた。

神経芽腫の中で、予後がきわめて不良で現時点でも有効な治療法が確立されていないMYCN増幅例を検討した。6ヶ月マスでは極めて少数で、全体の1%以下であるが、MYCN遺伝子が増幅したマス発見症例は、MYCN増幅の臨床発見例よりも予後良好であることも示された。また、6ヶ月マス施行時期の本邦の1才代以降発症例の検討から、北米に比べ1才前半と2才以降の年長児のMYCN増幅例の有意の減少を認めた。MYCN増幅例の早期発見効果によって、1才前半の症例数の減少は説明できても、2才以降の減少は説明困難で、おそらく、本腫瘍でのMYCN増幅は腫瘍が進展する間に生じるlate eventであり、マスによってMYCN増幅する前の腫瘍を診断し治療したためと考えざるを得ない。予後別の腫瘍分布に基づいた先の数理モデルでもがん遺伝子活性化がlate eventであることを示唆していたが、これと一致するエビデンスであり、本腫瘍の進展とMYCN遺伝子増幅の関係解明に新たな一石が投げられたエビデンスと考えられる。そして、MYCN増幅が腫瘍の進行とともに生じてくる現象であるとする、腫瘍の進行とともに悪性度が増す症例があるという意味からも、スクリーニングがさらに重要となってくる。以上の結果から、当研究班では、神経芽腫の3つのサブタイプの実際の発生を図17の如く類推するに至った。

そこで、これらの後向き研究の成果や他のエビデンスを基に、前向き研究グループでは、施行時期の検討を第一に行った。マス施行前の非進行例の発症のピークは1ヶ月であり、12ヶ月までなだらかに減少した。これに対して、進行例の発症のピークは44ヶ月で、0～72ヶ月までほぼ定常的に発症していた。よって、進行例の早期発見を行う適した時期は12ヶ月以降で、過剰診断の出来るだけ少ない時期を選択することが肝要と考えられた(資料4:神経芽細胞腫マスキューニング時期と方法についての検討資料)。生後12ヶ月以降では、札幌で施行された生後14ヶ月児を対象としたスクリーニングにデータを検討した結果(研究協力者報告参照)、発見例の率も高く、発見症例のうちかなりの症例が予後良好な腫瘍と考えられ、過剰診断症例が少なからず含まれていることを示唆していた。そこで、実

際に自然退縮した症例の尿中 VMA、HVA 値の自然経過を検討する目的で、以前の6ヶ月マスで発見された症例の中で同意のもとに無治療経過観察を行われた症例の経過を検討した。すると、これらの自然退縮例では、ほぼ生後18ヶ月までには全例正常域に達していることが明らかになり、過剰診断を最小限にして、進行例を早期発見する時期として生後18ヶ月を提唱した。今回の後向きの検討でも、生後2才以上の症例の減少効果が明らかなることから、生後18ヶ月は妥当であると考えられた。

しかし、6ヶ月マス施行下での1才代の神経芽腫の検討では、本来1才代に発見されるべき中間リスク症例が、マスによって乳児期に早期発見、早期治療を受けていた「刈取り効果」が存在し、このため、1才代、特に生後18ヶ月未満例において予後不良例が相対的に高頻度となったと考えられ、これらは生後18ヶ月でマスを遂行する上で念頭に置くべき結果であり、かならずしも生後18ヶ月の施行では不十分で、それ以前にも予後不良例が発生する可能性を示唆しており、留意すべき点と考えられた。

そこで、生後18ヶ月スクリーニングでどのような症例を発見しうるかを検討すべく、以前二次マスマスクリーニングとして生後18ヶ月で施行された京都府（1990-2000）と宮城県（1992-2002）の結果について検討した。その結果、18ヶ月マスを受診した群では18ヶ月以降では4才までに神経芽腫の自然発症が全くなり、宮城では陰性例が4才以降に4例診断されていたのみであった。一方、非受診群は18ヶ月以降-4才までに7例発症しそのうち6例が腫瘍死しており、18ヶ月マスの有効性を指示するエビデンスと考えられた。更に、6ヶ月マスが休止になった以降に、大阪、京都、札幌で施行されている生後18ヶ月の神経芽腫スクリーニングの発見例に関して検討した。その結果は、現時点で10症例が発見され、6,391出生に対して1の割合であり、これらのうち明らかな早期診断症例はなく、有効性を検証する前向き研究の早期施行が期待される。

新たな前向き研究を行うにあたり、施行時期の問題と共に新たな検査法の導入の検討も必須であり、まず、血清を用いた MYCN 増幅の検討、さらに、血清 NM23H1 の測定などを行った。血清から抽出した DNA を用いて、腫瘍の MYCN 増幅の検出は可能となり、今後予後不良な MYCN 増幅例の早期

診断、発見例での層別化に有用と考えられた。これらとは別に、血清マーカー探索を目的に、前処理法の検討と共に、LC/MS/MS による網羅的分子追跡法（マスマッピング）を確立し、予後不良な神経芽腫に特異的なマーカー探索が可能となった。この方法を用いて、いくつかの候補蛋白が絞り込まれ、これらを同定することによって、予後不良腫瘍に特化したマーカーによるスクリーニングが可能となると考えられ、同定と確認を行っている。さらに、この治療が必要な腫瘍に特異的な腫瘍マーカーは、新たなスクリーニング法の開発だけでなく、臨床の場での診断や治療効果の判定に応用可能なマーカーとなり、その汎用性は極めて大きいと考えられる。現在、保存血清を用いて悪性度の高い腫瘍の特異的候補マーカーの評価中である。また、MALDI-TOF 質量分析法による高分子タンパク質検出法の確立により高分子タンパク質複合体の検出の検討も行っており、将来はプロテインチップや組織マッピングへの利用が可能である。さらに、高分子タンパク質の一斉解析が可能となれば、病態解析や人工ワクチンのためのプロファイリング技術などへの応用が考えられる。

また、この腫瘍の生物学的特性の鍵を握るゲノム異常について、本研究班では集中的に検討を重ねて、SNP チップやアレイ CGH (Comparative Genomic Hybridization) 法の検討から、4つのグループに分けることができた。染色体一本ごとに増減する whole chromosomal gain/loss 型は極めて予後良好で、これに対し partial chromosomal gain/loss, silent の型に分別され、さらに MYCN 増幅を加えた4型が認められた。whole chromosomal gain/loss 型は自然退縮或いは分化するもので、6ヶ月マス発見例の多くがこの型を示したことから、今後過剰診断のマーカーとなると考えられた。一方、partial chromosomal gain/loss, silent の型は予後が様々で、詳細な検討は、その遺伝子異常やそれに伴う遺伝子発現に左右され、これらの探索が必要となる。

こうした腫瘍特性の鍵を握る遺伝子変化の解明と悪性度の高い腫瘍に特異的なマーカーの検出は、腫瘍の個性を反映しており、それを確実に評価することはそれぞれの悪性度から治療法を選択する個別化医療につながり、神経芽腫の新たな治療戦略構築へとつながる可能性が高い。

世界に先駆けて本邦で開始され、20年近く行われたこの事業を通じて得たこのかけがえのない貴重な症例の積み重ねとそれらから得られた腫瘍検体は、この腫瘍に関する多くの知見を我々に与えつけてくれている。これらは、世界に類のない唯一無二の財産であり、これらのデータを集積して解析することで、この腫瘍を構成する特性の異なる各グループの発生と自然歴が解明可能である。そのため、腫瘍検体のバンク化と腫瘍特性解析法の標準化が必須であり、それらから学術的・社会的に得られる成果は計り知れない。そこで、本年度は腫瘍バンクにおける腫瘍の登録と使用規定を作成した（資料9：バーチャルバンキング運用規定）。臨床経過が明らかで匿名化の後バンキングされた腫瘍検体を平等に多くの研究者が使用できるバンクを提供することで、この腫瘍の研究は飛躍的に進歩すると考えられ、将来は国外にその門戸を広げるべく進行している。実際、自然に分化・退縮するグループから予後不良なグループまでの症例が数多く登録され、1,000を超える腫瘍検体が保存された。これらを詳細に解析することで、この腫瘍の自然歴や新たな特性が詳細に解明されうると考えられ、予後予測可能なリスク分類が作成され、それに従った治療ガイドラインは、治療法の選別と予後向上につながる。また、多くの研究者に利用可能な腫瘍バンクであれば、本邦から世界に向け多くの知見が発信され得る。こうしたデータを基に、腫瘍特性から治療が必要な悪性度の高い腫瘍のみを正しく分別し、それらの早期発見をめざした新たなマスキリング事業を展開し、また、新たな治療法を開発することは、神経芽細胞腫全体としての治療成績の向上につながる。従来のマス事業の反省とともに、この事業で得られたエビデンスを正しく評価することで、初めて国民に納得が得られる成果が示し、この腫瘍の治療成績向上に寄与できる。

現在、世界的にも神経芽細胞腫のリスク分類を行うべくワーキングが活発に行われており、本事業はこれらへの大きな科学的根拠を与える研究事業であることに間違いはない。特性の異なる三つのグループそれぞれ正確に評価し、それぞれのグループのリスク分類が可能となれば治療法選択への指針となり、臨床上きわめて有意義である。本研究班の解析データを基に、本邦の神経芽細胞腫のリスク分類案

を提唱した(表10)。国際分類と異なって、病理因子、骨転移、骨髄転移を導入した。さらに、病理所見だけでなく、腫瘍特性の解析が進行すればよりクリアなリスク分類ができるものと考えられ、有用なリスク分類をもとに、新たな治療のガイドラインを策定することで治療成績の向上につながることを期待される。

E. 結 論

神経芽腫マスの休止を受けて、複数の学会等の登録例を収集し、全数の約62.5%を網羅するデータベースを構築した。予後と発症年齢の関係から、数理モデル解析、さらにリスク解析を行うと、この腫瘍は、実際には3つのサブグループからなり、一つは自然に退縮あるいは分化するタイプ（予後良好型）であり、あとの二つは予後不良で、年長児に向けて進行する型（進行型）と悪性度が高く進行の早い（高度悪性型）が存在することが示された。また、予後良好型の一部は、経過中に予後不良な高度悪性型に移行することが推定され、早期診断の重要性が示唆された。

本研究班で構築したデータベースの解析から、非受診例の検討から、本邦の生後72ヶ月までの累積罹患率は13.1(1/7,620出生)であった。生後6ヶ月児の尿を使用した神経芽腫マスは、定性法で罹患率約1.6倍、HPLCによる定量法で2.6倍に上昇させた。一方、死亡率の検討では、定性法では約0.7倍となり、HPLCによる定量法の導入で受診群では死亡を1/2以下に減少し、これは有意な低下であった(P<0.001)。これを登録率から人口ベースで換算すると出生10万あたり2.3人の死亡を減少させており、6ヶ月マスは過剰診断の存在とともに、死亡率の低下に有効であったことが示された。

そこで、過剰診断を最小限にし、早期診断に有効な時期として、18ヶ月が適切であると結論し、生後18ヶ月幼児を対象とする神経芽細胞腫スクリーニングの臨床研究要綱を作成し、有効性を検証するための臨床研究案を策定した。

さらに、従来の6ヶ月マスが施行されていた時期に収集された検体をバーチャルな形でバンキングし、臨床診断と治療成績向上のために腫瘍特性解析の研究を推進する体制を確立した。腫瘍特性の研究の一つとして検討した腫瘍のゲノム解析では、4つ

の型がみいだされ、このうち染色体が全体で増減するタイプは予後良好で、その多くが自然退縮あるいは分化する腫瘍であることが明らかになり、ゲノム解析から腫瘍のサブグループを層別化可能となった。さらに、尿中、血中マーカーの探索を行い、血清 DNA での MYCN 増幅の検出法、尿中カテコラミン一斉分析法の確立を行い、さらに血中の新規マーカー探索を目的にマスマッピング法による網羅的解析を行い、予後不良例に特異的な候補マーカーを見出し、現在、臨床応用に向け、実際の症例にて実用化に向けて検討を行っている。

F. 健康危険情報

生後6ヶ月児を対象とした神経芽細胞腫検査事業が休止となったが、この事業の中で受診例は非受診例に比べ、6ヶ月以降発症の神経芽腫による累積死亡率が1/2以下であり、休止によって、これらの検査を受診できない年代では神経芽腫による死亡率の上昇が危惧され、特に2才以降発症の予後不良例の増加への対応が必要と考えられた。

よって、早急に、本疾患の新たなスクリーニング法も含めた早期診断法の確立と新たな治療戦略の策定が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiyama E, Hiyama K, Yamaoka H, Sueda T, Reynolds CP, Yokoyama T. Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. *Pediatric Surgery International*, 20(1): 33-38, 2004.
- 2) Hiyama E, Hiyama K. Telomerase detection in the diagnosis and prognosis of cancer. *Cytotechnology*, 45: 61-74, 2004.
- 3) Hiyama E, Yamaoka H, Matsunaga T, Hayashi Y, Ando H, Suita S, Horie H, Kaneko M, Sasaki F, Hashizume K, Nakagawara A, Ohnuma N, Yokoyama T. High expression of telomerase is an independent prognostic indicator of poor outcome in hepatoblastoma. *British Journal of Cancer*, 91(5): 972-979, 2004.
- 4) Kumazaki T, Hiyama K, Takahashi T, Omatsu H, Tanimoto K, Noguchi T, Hiyama E, Mitsui Y, Nishiyama M. Differential gene expressions during immortalization of normal human fibroblasts and endothelial cells transfected with human telomerase reverse transcriptase gene. *International Journal of Oncology*, 24(6): 1435-1442, 2004.
- 5) Satoh K, Ohtaki M. A note on multiple regression for single index model. *Communications in statistics*, 33(10): 2409-2422, 2004.
- 6) Izumi S, Ohtaki M. Incorporation of inter-individual heterogeneity into the multi-stage carcinogenesis model: Approach to the analysis of cancer incidence data. *Biometrical Journal*, 46(1): 1-13, 2004.
- 7) Satoh K, Ohtani K, Ushijima M, Isomura M, Matsuura M, Miki T, Ohtaki M. Genotyping of single nucleotide polymorphisms based on a mathematical model for two-dimensional data. *Japanese Journal of Biometrics*, 25(2): 61-67, 2004.
- 8) Satoh K, Yanagihara H, Ohtaki M. Clustering method by connected neighborhoods and its application *Advances & Applications in Statistics*, 4(2): 223-231, 2004.
- 9) Lu L, Suzuki T, Yoshikawa Y, Murakami O, Miki Y, Moriya T, Bassett MH, Rainey WE, Hayashi Y, Sasano H. Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(8): 4113-4118, 2004.
- 10) Morimoto K, Wakayama A, Yoshimine T, Nakayama M. High-grade spinal cord tumor with cerebellar and retroperitoneal extension. *Pediatric Neurosurgery*, 40(3): 149-150, 2004.
- 11) Ozone S, Hosoi H, Kuwahara Y, Matsumoto Y, Iehara T, Sugimoto T. Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells. *International Journal of Cancer*, 112(2): 219-224, 2004.
- 12) Kato C, Miyazaki K, Nakagawa A, Ohira M,

- Nakamura Y, Ozaki T, Imai T, Nakagawara A. Low expression of human tubulin tyrosine ligase and suppressed tubulin tyrosination/detyrosination cycle are associated with impaired neuronal differentiation in neuroblastomas with poor prognosis. *International Journal of Cancer*, 112(3): 365-375, 2004.
- 13) Takahashi M, Ozaki T, Todo S, Nakagawara A. Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene ING1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncology Reports*, 12(4): 811-816, 2004.
- 14) Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(24): 25549-25561, 2004.
- 15) Ohtori S, Isogai E, Hasue F, Ozaki T, Nakamura Y, Nakagawara A, Koseki H, Yuasa S, Hanaoka E, Shinbo J, Yamamoto T, Chiba H, Yamazaki M, Moriya H, Sakiyama S. Reduced inflammatory pain in mice deficient in the differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 25(3): 504-514, 2004.
- 16) Hamano S, Ohira M, Isogai E, Nakada K, Nakagawara A. Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas. *International Journal of Oncology*, 24(6): 1457-1466, 2004.
- 17) Miyazaki K, Fujita T, Ozaki T, Kato C, Kurose Y, Sakamoto M, Kato S, Goto T, Itoyama Y, Aoki M, Nakagawara A. NEDL1, a novel ubiquitin-protein isopeptide ligase for Dishevelled-1, targets mutant superoxide dismutase-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(12): 11327-11335, 2004.
- 18) Nakagawara A, Ohira M. Comprehensive genomics linking between neural development and cancer: Neuroblastoma as a model. *Cancer Letters*, 204(2): 213-224, 2004.
- 19) Yamakawa T, Toyabe S, Cao P, Akazawa K. Web-based delivery of medical multimedia contents using an (MPEG-4 system. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 75(3): 259-264, 2004.
- 20) Nakagawara A. Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link. Luigi Aloe and Laura Calza, NGF and Related Molecules in Health and Disease, Progress in Brain Research Vol. 146 : 233-242, Elsevier Science Publisher, 2004.
- 21) 西 基, 花井潤師, 藤田晃三, 一宮久恵, 田中稔泰, 畑江芳郎, 武田武夫. マスキリーニング中止後の神経芽腫死亡率の推定. *日本マスキリーニング学会誌*, 14(3) : 15-21, 2004.
- 22) 西 基, 武田武夫. マスキリーニングが神経芽腫の治療成績に与えたインパクト—ありの立場から—. *小児外科*, 36(1) : 63-70, 2004.
- 23) 家原知子. 乳児神経芽腫統一治療プロトコールのこれまでと今後. *小児がん*, 41(1) : 35-38, 2004.
- 24) 田中丈夫, 家原知子, 細井 創, 杉本 徹, 水田祥代, 澤田 淳, 金子道夫, 土田嘉昭. 神経芽腫進展リスク評価の特異性と感度—臨床診断神経芽腫での検討—, *小児がん*, 41(1) : 71-75, 2004.
- 25) 澤田 淳, 家原知子, 松本良文, 細井 創, 杉本 徹. 神経芽腫マスキリーニング—過去と現在—日本のマスキリーニングが示したもの—. *小児内科*, 36(12) : 1928-1932, 2004.
- 26) 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(2) : 65-70, 2004.
- 27) 井上雅美, 大植孝治, 澤田明久, 安井昌博, 坂田尚己, 窪田昭男, 西川正則, 森本静夫, 桑江優子, 中山雅弘, 河 敬世. 難治性神経芽腫に対する造血幹細胞移植への工夫: 移植1回法から2回法(自家-自家, 自家-同種)へ. *小児がん*,