

意しておかねばならない。

回帰分析

1. 線形回帰分析

関心のある1個の変数の値の変動を、幾つかの他の変数で説明するための統計手法として、回帰分析が知られている。その最も単純な場合は、最小自乗法に基づく2次元散布図への直線の当てはめ(単回帰分析)である。散布図データ $(x_i, y_i), i=1, \dots, n$ に対して、直線 $y = a + bx$ を当てはめる。その残差平方和

$$\sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i)^2$$

を最小にする解(最小自乗解)を (\hat{a}, \hat{b}) とすると、

$$\hat{b} = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})y_i}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}, \quad \hat{a} = \bar{y} - \hat{b}\bar{x}$$

となる。より一般に、 p 個の説明変数を扱う場合、

$$\{(y_i; x_i) = (1, x_{i1}, \dots, x_{ip})^T \mid i = 1, \dots, n\}$$

に対して、線形回帰モデルは、

$$y_i = \beta^T x_i + \varepsilon_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_p x_{ip} + \varepsilon_i, \quad i = 1, \dots, n, \quad (4)$$

により記述される。ここで、 β は $p+1$ 次元のベクトルであり、回帰係数ベクトルと呼ばれる。 ε_i は説明変数で表現できない目的変数の変動を表す項であり期待値が0の確率変数である。このモデルは $p \geq 2$ の場合(線形重回帰モデルと呼ばれる。このとき、 $X = (x_{11}, \dots, x_{1n})^T, Y = (y_1, \dots, y_n)^T$ とすると、 $X^T X$ が正値行列であるならば、残差平方和

$$\sum_{i=1}^n (y_i - \beta^T X_i)^2 = (Y - X\beta)^T (Y - X\beta),$$

の値を最小にする回帰係数ベクトル β の解(最小自乗推定量)は、

$$\hat{\beta} = (X^T X)^{-1} X^T Y,$$

と表される。そして、 $\hat{y}_i = \hat{\beta}^T x_i$ は、目的変数の第 i 番目の標本値 y_i に対する予測値であり、実測値との差は残差と呼ばれる。

2. 外れ値の混入の影響

実際のデータには、しばしば外れ値が存在しうる。図3は、ある単回帰データ(人工データ)に対して、通常の最小自乗法の適用による直線の当てはめを行った結果を示す。この解析の場合、3個の外れ値があるために直線の当てはめが破綻している。しかし、散布図の傾向から、これらの外れ値を無視すれば、とても高い精度で直線が当てはめられるであろうということが容易に分かる。この例の場合のように、統計解析により普遍的な結果を得ようとするとき、外れ値が混入しているか否かを検討することが重要となる。単回帰分析の場合のようにデータの次元が低い場合には、散布図を描くことで容易に対処できるが、データの次元が高くなると、外

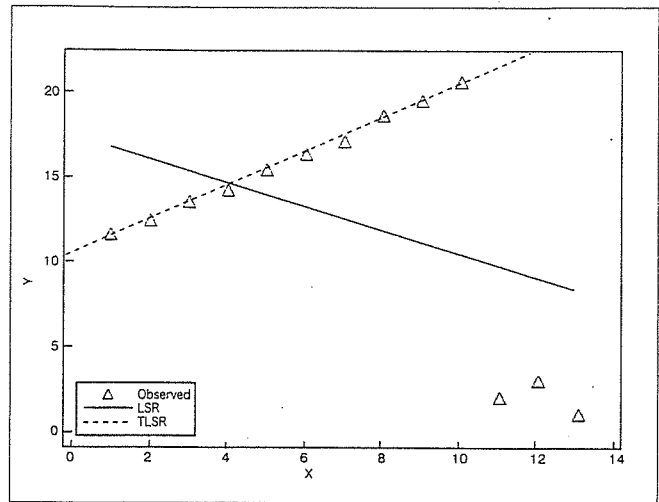


図3 外れ値を含む散布図データに最小自乗法を用いて直線を当てはめた場合に得られる破綻的結果の例

れ値の探索は一般に困難なものとなる。それがいかに困難なものであるかということを示す例を挙げておく。表2は説明変数の個数が4個の重回帰型データ(人工データ)で、目的変数を入れて全体では、6次元の構造を持っている。まず、このデータに対して通常の最小自乗法による重回帰分析を行った結果を示す。表3(a)は推定された回帰係数である。図4(a)は y の予測値に対する実測値のプロット(重相関プロット)を示す。この解析では、重相関係数として、0.90が得られている。図5(a)により示されている残差プロットからは、特に当てはまりの悪いデータの存在は疑うことが出来ない。これらの分析結果から、このデータには外れ値は存在せず、線形モデルによる重回帰分析が上手く機能している

表2 外れ値を含む20個の標本値から成る重回帰型データ(人工データ)

IDN	X1	X2	X3	X4	X5	Y
1	0.573	0.106	0.465	0.538	0.841	0.534
2	0.651	0.136	0.527	0.545	0.887	0.535
3	0.606	0.127	0.494	0.521	0.920	0.570
4	0.437	0.159	0.446	0.423	0.992	0.450
5	0.547	0.114	0.531	0.519	0.915	0.548
6	0.444	0.163	0.429	0.411	0.984	0.431
7	0.489	0.123	0.562	0.455	0.824	0.481
8	0.413	0.167	0.418	0.430	0.978	0.423
9	0.536	0.118	0.592	0.464	0.854	0.475
10	0.685	0.156	0.631	0.564	0.914	0.486
11	0.664	0.159	0.506	0.481	0.867	0.554
12	0.703	0.134	0.519	0.484	0.812	0.519
13	0.653	0.140	0.625	0.519	0.892	0.492
14	0.586	0.111	0.505	0.565	0.889	0.517
15	0.534	0.114	0.521	0.570	0.889	0.502
16	0.523	0.132	0.505	0.612	0.919	0.508
17	0.580	0.125	0.546	0.608	0.954	0.520
18	0.448	0.103	0.522	0.534	0.918	0.506
19	0.417	0.169	0.405	0.415	0.981	0.401
20	0.528	0.106	0.424	0.566	0.909	0.568

かのような印象を与えるかもしれない。しかし、実は、このデータには4個の外れ値が混入しているのである。その4個の外れ値を無視した解析を行うと、推定された回帰係数は表3(b)のようになりオリジナルデータに対する推定結果(表3(a))と大きく異なったものになる。

表3(a) 最小自乗法に基づく回帰分析により推定された回帰係数

variable	estimate	s.e.	t	p
Const.	0.422	0.169	2.49	0.026
X1	0.441	0.117	3.77	0.002
X2	-1.475	0.487	-3.03	0.009
X3	-0.261	0.112	-2.33	0.035
X4	0.210	0.161	0.13	0.900
X5	0.171	0.203	0.84	0.415

$\hat{\sigma} = 0.020 \quad R = 0.90$

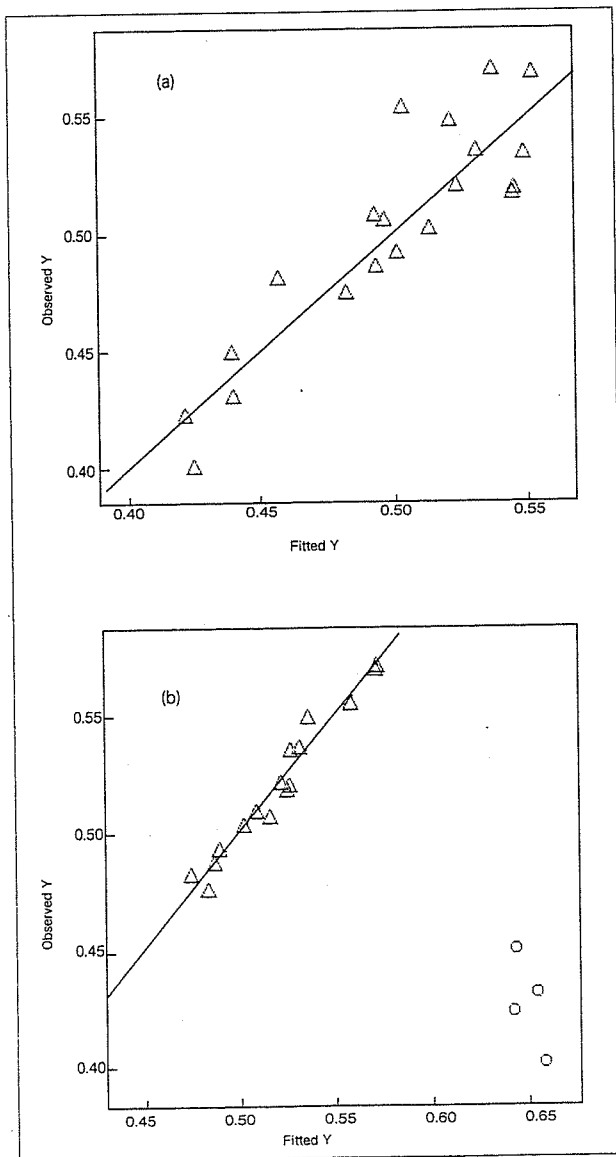


図4 外れ値を含む重回帰型データ(表2)全体に最小自乗法により超平面を当てはめた結果得られた重相関プロット(a)および4個の外れ値を無視して最小自乗法を適用し超平面を当てはめた場合の重相関プロット(b)

また、重相関係数は0.98となり、その重相関プロットとして図4(b)が得られる。図5(b)はその残差プロットを示す。このデータ解析は、外れ値を上手く検出できるか否かにより、統計解析の結果が大きく異なってしまうこと、そして、外れ値の検出が重要であることを示して

表3(b) 当てはまりの悪い4個の標本を除外して回帰分析により推定された回帰係数

variable	estimate	s.e.	t	p
Const.	0.377	0.054	6.99	0.000
X1	0.217	0.042	5.16	0.000
X2	-0.085	0.198	-0.43	0.676
X3	-0.564	0.043	-12.98	0.000
X4	-0.400	0.065	-6.12	0.000
X5	0.607	0.079	7.73	0.000

$\hat{\sigma} = 0.0059 \quad R = 0.98$

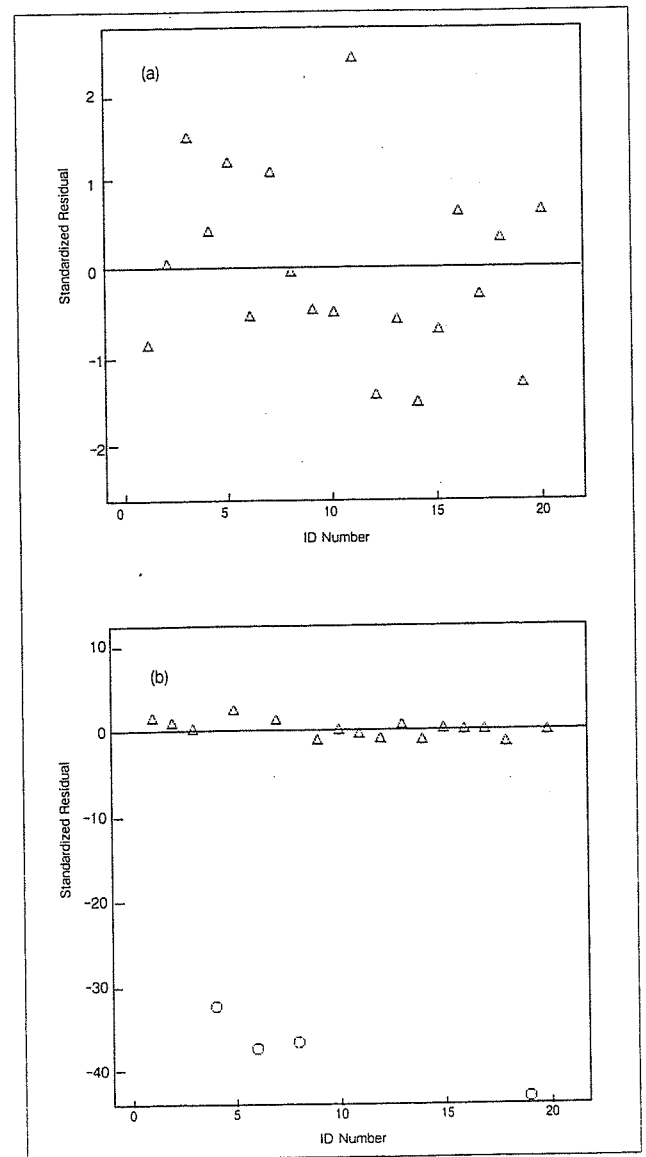


図5 外れ値を含む重回帰型データ(表2)全体に最小自乗法により超平面を当てはめた結果得られた残差プロット(a)および4個の外れ値を無視して最小自乗法を適用し超平面を当てはめた場合の残差プロット(b)

いる。

3. LMSR と TLSR

近年、未知の外れ値の混入を前提にした、様々な統計解析手法の開発も行われている。その代表的なものとして知られている LMSR (Least Median of Squares Regression) は、頑健な回帰分析の実現を目的として Rousseeuw により提案された手法で⁷⁾、偏差平方和の代わりに偏差平方の中央値を最小にするような回帰式を求めるものである。目的変数の期待値が

$$E(y_i) = a + bx_i, \quad i = 1, \dots, n,$$

と表される単回帰分析の場合には、偏差平方値の集合

$$\{(y_i - a - bx_i)^2 \mid i = 1, \dots, n\}$$

の中央値を最小にするような (a, b) を回帰係数の推定値とするものである。このような解を解析的に求めることは不可能であるが、数値的に十分な精度をもって下記のアルゴリズムにより探索することができる。

Step 1. 2個の標本を無作為に抽出し、それらを通る直線を求め、仮の回帰直線とする。

Step 2. 上記の直線に基づく“予測値”を $\hat{y}_i, i = 1, \dots, n$ とするとき、各標本における偏差 $r_i = y_i - \hat{y}_i$ およびその平方値を求めて小さい順に並べ、 $r_{(1)}^2 \leq r_{(2)}^2 \leq \dots \leq r_{(n)}^2$ とする。

Step 3. $r_{(i)}^2, i = 1, \dots, n$ の中央値 $r_{(n/2)}^2$ を求める。

上記の Step 1, 2, 3 を繰り返し、 $r_{(n/2)}^2$ が最小となる (a, b) を探す。このアルゴリズムは重回帰分析の場合へも拡張されている。さらに、外れ値に対して頑健であり、LMSR に較べてより高い効率を持つ TLSR (刈り込み最小自乗回帰分析) も提案されている⁷⁾。

4. 変数選択

回帰分析では、直感的にはできるだけ残差の絶対値の小さいモデルを使うことが好ましいと思われるかもしれない。その考え方に基づいて、実測値と予測値の相関が高くなるようなすなわち、 $\{(y_i, \hat{y}_i) \mid i = 1, \dots, n\}$ の

相関係数が高いモデルを選ぶことが考えられる。しかし、それは必ずしも良い結果をもたらすとは限らない。実際、説明変数の個数を大きくすればするほど、その相関は高くなるが、それは単にそのとき扱っているデータへの予測が良くなっているに過ぎず、外部データに当てはめた場合の予測精度が高いことを保証するものではない。特に、標本数 n が説明変数の個数 p に対してあまり大きくない場合には注意を要する。この問題を回避するために、残差が独立な同一正規分布に従うことが仮定できるとき、変数選択の基準として、

$$AIC = n \log \left\{ \sum_{i=1}^n (y_i - \beta^T x_i)^2 \right\} + 2p,$$

がよく用いられている⁸⁾。この AIC 規準量は対数尤度に基づく (外部データを用いた場合に想定される) 予測精度を表しており、右辺第 1 項はデータへの適合度を反映し、第 2 項はモデルの複雑さに対する罰則 (ペナルティー) となっている。即ち、AIC が小さくなるような変数の組み合わせのモデルが望ましいものとされる。では、AIC の値を最小とするようなモデルが最良なものであるとして、機械的に変数選択を行って良いかということ、必ずしもそうではないのである。以下、その 1 例を挙げる。

表 4 は、既述の相関分析の項で紹介した医学生のデータ (男子 298 人、女子 114 人、計 412 人) から、身長を目的変数、本人の性別 (男性であれば 1、女性であれば 0)、父親と母親の身長および本人の中指の長さ (mm) を説明変数候補とした場合の、いろいろな説明変数の組み合わせ毎の重回帰分析の結果を示している。これより、AIC の値が最小となるモデルは、候補となる全ての説明変数を含むもの (M14) であり、身長を規定する遺伝的因子の情報が父親の身長と母親の身長を加法的に組み合わせるだけでは十分でなく、本人の中指の長さには、身長に対してそれらとは独立な説明力があることが示されている。しかし、この解析の目的が、将来生まれてくる子供の身長に関心があったのであれば、対象となる子供の

表 4 医学生データの身長データに対する各説明変数の組み合わせ別回帰モデルの適合度、表中の 1 は説明変数として使用、0 は不使用を意味している。

モデル	性別	父親の身長	母親の身長	両親の平均身長	中指の長さ	残差の標準偏差	重相関係数	AIC
M1	1	0	0	0	0	5.07	0.76	1340.9
M2	0	1	0	0	0	7.59	0.20	1673.3
M3	0	0	1	0	0	7.60	0.19	1674.7
M4	0	0	0	1	0	7.49	0.26	1662.4
M5	0	0	0	0	1	7.12	0.40	1514.8
M6	1	1	0	0	0	4.55	0.81	1253.6
M7	1	0	1	0	0	4.75	0.79	1289.3
M8	1	0	0	1	0	4.34	0.83	1214.2
M9	1	0	0	0	1	4.82	0.79	1215.7
M10	0	1	1	0	0	7.49	0.26	1664.7
M11	0	0	0	1	1	6.98	0.44	1501.6
M12	1	1	1	0	0	4.33	0.83	1215.2
M13	1	0	0	1	1	4.25	0.84	1122.6
M14	1	1	1	0	1	4.24	0.84	1121.5

中指の長さの情報が得られるまで(少なくとも十代後半まで)予測は不可能となり、その解析の意義はなくなる。ということで、本人の中指の長さを含まないモデルの中で最も AIC が小さいものを探すと、性別と両親の平均身長を組み合わせた (M8) を選ぶことができる。父親と母親の身長に寄与を同等と見なしたときに得られるモデルであり、子供の身長には父親由来のものと母親由来のものが等分に影響しているらしいことが分かる。

5. 加法的寄与か乗法的寄与か

モデル (4) は、各説明変数が目的変数に対して加法的に寄与していることを表現している。もし、その寄与が乗法的であると考えられる場合には、このモデルは適切ではない。例えば、年収を目的変数、説明変数を職種や年齢とすると、説明変数の寄与は加法的よりも乗法的なものと考えの方が自然である。そのような場合は、目的変数の値を対数変換したものを使用することで対処することができる。医学生物学関連分野では正值しかとらない計量値データを扱うことが多いので、そのような計量値を目的変数として使用する場合は、事前に対数変換をしておくことが望ましい。なお、加法的な寄与を持つものと乗法的な寄与を持つ複数の変数を同時に説明変数として扱いたい場合には、モデル (4) と対数変換を組み合わせるだけでは十分でないこともある⁹⁾。

6. ロジスティック回帰分析

目的変数が陽性または陰性のように2値をとる場合、線形の回帰分析をそのまま適用することは好ましくない。そのような場合には、ロジスティック回帰分析がよく使われている。この分析方法を用いることで、陽性反応が得られる確率を直接に予測できる。説明変数の観測値が与えられているという条件の下である事象が発生する確率を

$$p(x) = \Pr\{Y=1|x\} = \frac{\exp(g(x))}{1 + \exp(g(x))}$$

$$g(x) = \log \frac{p(x)}{1 - p(x)},$$

と定義する。 $g(x)$ は $p(x)$ のロジット (logit)、対数オッズ (log odd) などと呼ばれる。ロジスティック回帰モデルとは、

$$g(x) = \beta^T x = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_k x_k,$$

と表現されるモデルである。ただし、 β_0 は定数、 β_j は x_j の回帰係数である。これらの値は通常未知であるが、データが与えられたとき、最尤法により推定される。なお、解析結果から導かれる $\hat{\beta}_j$ の指数変換値 $e^{\hat{\beta}_j}$ の値は x_j の値が1単位分増加した場合に期待される目的変数が陽性となる度合いの変化に関するオッズ比 (odds ratio) の推定値になっている。

平滑化

1. 散布図平滑化

2個の変数間の関わり合いは、直線的なものとは限らず、場合によっては複雑な曲線で要約表現せざるを得ないこともある。そのような場合に適用できる手法として平滑化がある。いま、2次元散布図データ $\{(x_i, y_i), i=1, \dots, n\}$ が与えられているとき、近傍データに対してのみ0でない値の重みを持たせた重み付き平均に基づく y の x に対する平滑化は、

$$\bar{y}_{(x)} = \sum_j w(|x_j - x_i|) y_j, \quad i=1, \dots, n,$$

と記述することができる。ここで、 $w()$ は重みを規定する非負の関数である。この平滑化法は、移動平均法 (Moving average) と呼ばれている。正の重みを持つ区間の幅をバンド幅と呼ぶ。大きいバンド幅を使用すると、平滑曲線 (平滑値を結んで描かれる曲線) は直線的になり堅い平滑化が実現される。その反対に小さいバンド幅を使用すると、より細かい変動が記述され柔らかい平滑化が行われる。バンド幅の最適化は、解析を行う際にどのような変動に興味があるのかによって異なる余地があり、実質科学的な検討の下に行われるべきである。

移動平均法による平滑化において区間の端で生じうる偏りを回避するために、各観測点の近傍で下記のような直線を局所的に当てはめる方法も使われる。

$$\hat{y}_i = \bar{y}_{(x)} + \frac{\sum_j w(|x_j - x_i|) (x_j - \bar{x}_{(x)}) y_j}{\sum_j w(|x_j - x_i|) (x_j - \bar{x}_{(x)})^2} (x_i - \bar{x}_{(x)}),$$

ただし、 $\bar{x}_{(x)} = \sum_j w(|x_j - x_i|) x_j$ である。このモデルは局所線形モデル (Locally linear model) と呼ばれている¹⁰⁾。移動平均法の場合と同様に得られる平滑化曲線は使用するバンド幅により大きく変化する。S-plusなどに収録されている散布図平滑化で知られている Loess は、これに外れ値の影響を軽減するように頑健化されたアルゴリズムを組み込んだものである¹¹⁾。

相関分析の項で説明した理由により、マイクロアレイデータを用いて遺伝子発現強度を解析する際には、事前に可能な限り偏りを補正しておくこと (ノーマライゼーション) が不可欠である¹²⁾。図6は、あるオリゴマイクロアレイによる遺伝子発現データ (mRNAの発現強度の自然対数値) を縦軸に、アレイ上での遺伝子番号を横軸にして得られた散布図 (の一部) と、バンド幅を変化させながら局所線形モデルによる平滑化を行った場合に得られた結果を示す。小さい値のバンド幅による平滑化の結果から、遺伝子発現強度が周期的な変動を持つことが分かる。遺伝子番号は、アレイ上に並べられた DNA プロブの物理的位置を反映しているので、これらの結果は、何らかの技術的背景要因に関して、mRNAの発現強度データに人工的な偏りが生じたことを示唆している。小さいバンド幅を用いた場合には、微細な変動の検出ができ、大きいバンド幅の場合には、大局的な

偏りの傾向を観ることが出来る。いろいろなバンド幅による平滑化の結果を総合することにより、このマイクロアレイデータの偏りの特性を把握することができる。

2. 一般化加法モデル

前節で紹介した散布図平滑化を応用して、非線形構造を含む重回帰型データの解析も可能である。その一つは、Breiman and Friedmanにより提案されたACEと呼ばれる手法で、モデルとして $\{(y_i; x_{i1}, \dots, x_{ip}) | i=1, \dots, n\}$ に対して、

$y_i^* = \phi_1(x_{i1}) + \dots + \phi_p(x_{ip}) + \epsilon_i, i=1, \dots, n$
 を想定したノンパラメトリックな回帰分析である^{13, 14)}。
 ただし、 $y_i^* = y_i - \bar{y}, \phi_j(0)$ は滑らかな関数で、

$$\sum_{i=1}^n \phi_j(x_{ij}) = 0, j=1, \dots, p$$

を満たすものである。未知の滑らかな関数 $\phi_j(0)$ を推定するために、下記のアルゴリズムが使われている。

Step 1. $\phi_j(0) = 0, j=1, \dots, p$ とする。

Step 2. 各 $j=1, \dots, p$ 毎に、データ

$$\{(x_{ij}, r_{i(j)}) | i=1, \dots, n\}$$

ただし、

$$r_{i(j)} = y_i^* - \sum_{l \neq j} \hat{\phi}_l(x_{il})$$

に対する散布図平滑化を行い、その結果を $\phi_j(0)$

Step 3. $r_i = y_i^* - \sum_{j=1}^p \hat{\phi}_j(x_{ij}), j=1, \dots, n$
 を算出し、

$$Q = \sum_{i=1}^n r_i^2$$

を求める。 Q の値が減少しなくなるまで、上記Step 2とStep 3を繰り返す。

視覚化

統計的データ解析の各ステップにおいて、数値データ(デジタル情報)の視覚化を行うことが有用であることが多い。探索的段階で多用される視覚化としては、散布図(X-Yプロット)や箱型図が挙げられる。近年のコンピュータの性能の向上により、散布図についてもマークの色や形およびサイズなどを変化させたり、連続的表示によるアニメーションなどの技法を組み入れることにより、複雑な高次の次元を有する情報を視覚化することが可能となっている¹⁵⁾。箱型図は、1次元データの標本分布や外れ値の混入状況を概観するのに便利である。

統計的検定の限界

ある帰無仮説からの乖離の度合いを観察データに基づいて確率的に定量・評価する方法が統計的検定であり、昨今の医学領域での統計解析の際には多用されている。その結果は、いわゆるp値として、厳密に帰無仮説

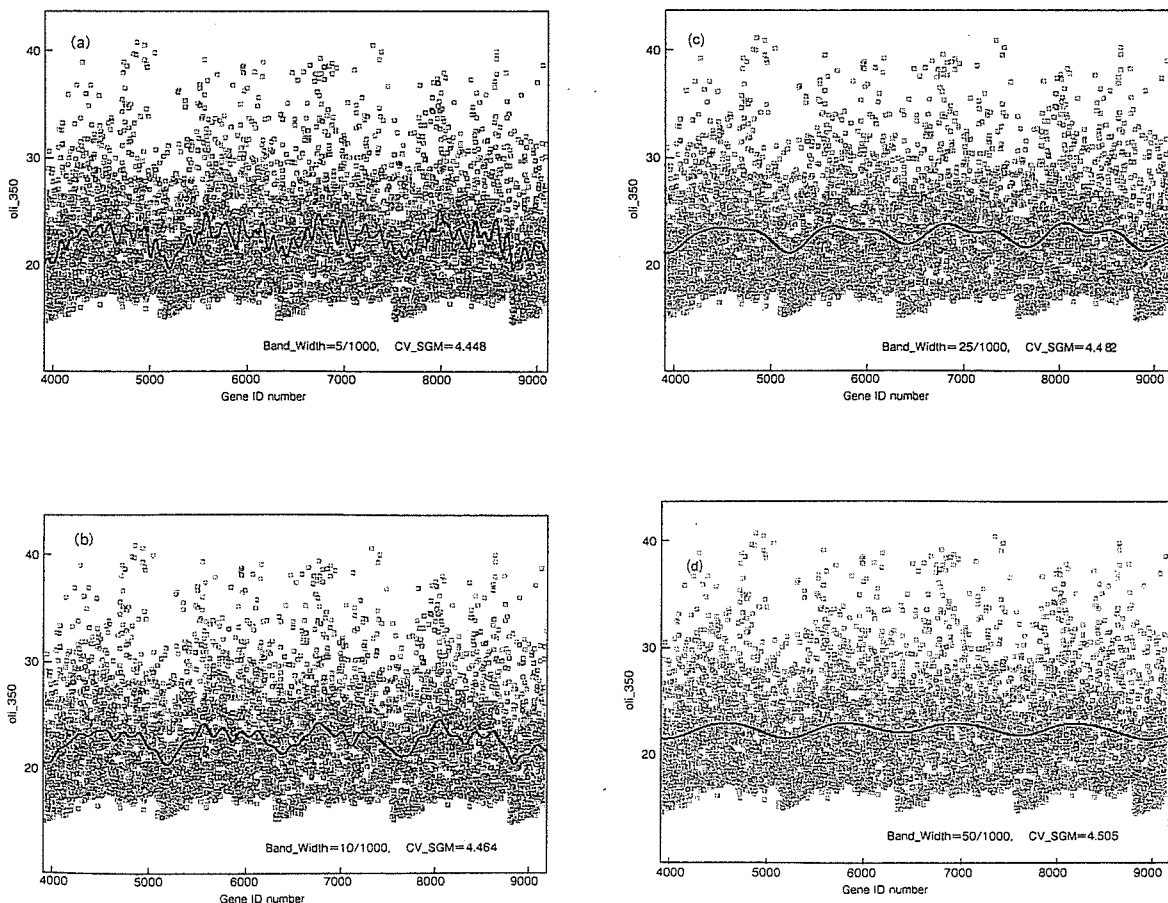


図6 オリゴマイクロアレイより得られた遺伝子発現強度データ(ノーマリゼーション処理前)に対するいろいろなバンド幅による局所線形平滑化の結果

が真であると見なして良いか否かを検討する材料を提供するが、対立仮説の下での推測に関する情報については全く触れないものであり、その解釈には注意を要する。例えばよく行われる2群間の平均値の比較において、 p 値が0に近く統計的に大きな有意差が得られたとしても、その差は実質科学的に意味のある程度に大きいものなのかどうかは自明ではない。標本数が大きいときの「有意差有り」は、実質科学的には意味のない些細な差を検出しているに過ぎない可能性もあり、逆に、標本数が小さい場合の「有意差無し」は、データが持つ情報が少なく判断保留と解釈すべきことが多い。その意味では、順序統計量に基づきいわゆるノンパラメトリックな各種検定からは、多くの場合、重要な情報が得にくい。できれば、関心のあるデータに対して適当なパラメトリックモデルを設定し、未知母数を用いた定式化を行った上で、データに適用し、外れ値の有無について注意しながら統計的推定や検定を行い、定量的にデータの構造の把握を行うことが望まれる。

【文献】

- 1) Forgy EW : Cluster analysis of multivariate data : efficiency versus interpretability of classifications. *Biometrika* 21 : 768 - 769, 1965.
- 2) Flury BA : Principal points. *Biometrika* 77 : 33 - 41, 1980.
- 3) 村木千恵, 大瀧 慈, 水田正弘 : 主要点解析法による極東夏期天気図の分類. *応用統計学* 27 : 17 -31, 1998.
- 4) J. Roy : Box GPE and Cox DR : An analysis of transformations (with discussion). *Statist Soc B*26 : 211 - 252, 1964.
- 5) 濱崎俊光, 磯村達也, 大瀧 慈, 後藤昌司 : ベキ変換とその変型, *応用統計学* 28 : 179 - 190, 1999.
- 6) Schuhardt J, Beule D, Malik A, et al : Normalization strategies for cDNA microarrays, *Nucleic Acid Res* 2002. <http://nar.oupjournals.org/cgi/content/full/28/10/e47>.
- 7) Rousseeuw PJ : Least median of squares regression. *Journal of American Statistical Association* 79 : 871 - 880, 1984.
- 8) Akaike H : Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In Petrov and Czaki (Eds.), *Second International Symposium on Information Theory*. Akademiai Kiado, Budapest, p267 - 281, 1973.
- 9) Yanagihara H, Ohtaki M : A family of regression models having partially additive and multiplicative covariate structure, *Bulletin of Informatics and Cybernetics*, Special Issue of the Bulletin of Informatics and Cybernetics in honor of Professor Takashi Yanagawa, in print.
- 10) Simonoff JS : *Smoothing Methods in Statistics*. Springer-Verlag, Hamburg, 1998.
- 11) Friedman JH : Flexible metric nearest neighbor classification. Technical report, Department of Statistics, Stanford University, 1994.
- 12) Ohtaki M, Ohtani K, Satoh K, et al : Model-based analysis of microarray data : Exploration of differentially expressed genes between two cell types based on a two-dimensional mixed normal model. *Japanese Journal of Biometrics* 26 : 31 - 48, 2005.
- 13) Hastie TJ, Tibshirani RJ : *Generalized additive models*. Chapman and Hall, London, 1990.
- 14) Breiman L, Friedman JH : Estimating optimal transformations for multiple regression and correlation, (with discussion). *J. Amer Statist Assoc* 80 : 580 - 598, 1985.
- 15) 佐藤健一, 大瀧 慈 : 統計グラフィブラリの開発とWebへの応用. *統計数理* 49 : 261 - 275, 2002.

新生児期に発見された悪性固形腫瘍症例の検討

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）¹⁾、

大阪府立母子保健総合医療センター小児外科²⁾、同検査部病理³⁾

米田 光宏¹⁾ 大植 孝治²⁾ 福澤 正洋¹⁾ 草深 竹志¹⁾
 奈良 啓悟¹⁾ 野瀬 聡子¹⁾ 田中 夏美¹⁾ 窪田 昭男²⁾
 奥山 宏臣²⁾ 桑江 優子³⁾ 中山 雅弘³⁾

Key words

neonate
 malignant solid tumor
 neuroblastoma
 oncologic emergency

はじめに

新生児期に発症する悪性固形腫瘍は大変稀であるが、しばしばoncologic emergencyを呈し治療に難渋する。新生児悪性固形腫瘍症例の臨床像を明らかにする目的で、大阪大学および大阪府立母子保健総合医療センターにおいて経験した症例について臨床的検討を行った。

対象と方法

大阪大学および大阪府立母子保健総合医療センターにおいて、組織学的に悪性腫瘍と診断された新生児固形腫瘍症例15例を対象とした。

診断は、神経芽腫8例、hemangiopericytoma (HPC) 3例、横紋筋肉腫、Rhabdoid tumor of the kidney、副腎皮質癌、infantile fibrosarcomaが各1例ずつであった。

結果

在胎週数は26週から41週、平均37週で、36週未満は3例であった。出生体重は944gから4,236g、平均2,849gであった。出生前診断は5例(33%)に行われていた。Oncologic emergencyを呈した症例は12例(80%)であった。6例が死亡し、うち5例が発症時にoncologic emergencyを呈していた。死亡原因は、術中死および化学療法の合併症による死亡が各2例、腫瘍破裂によるショック、他病死が各1例ずつであった(表1)。

神経芽腫(表2)

神経芽腫は8例で全体の53%を占めた。INSS病期分類では、stage 4Sが1例、stage 4が4例と遠隔転移を有する症例が半数以上を占めた。8例中7例が来院時oncologic emergencyを呈していた。このうち4例は肝腫大による腹部膨満に起因するものであった。摘出術

を施行した4例のうち症例2と3は術後化学療法中に死亡した。摘出術を行わずに救命できたのは3例で、無治療で縮小した症例1、化学療法のみで縮小した症例7、生検後化学療法により縮小した症例8であった。5例が長期生存中で、無治療例を除き、いずれも初期の化学療法を安全に施行し得た症例である。

以下主な症例を呈示する。

症例3は生下時より著明な腹部膨満、呼吸不全を呈し救急搬送された。貧血が進行し、CT上右副腎腫瘍と腹水の貯留、びまん性肝転移を認めた(図1)。腫瘍破裂を来した神経芽腫と診断し、日齢1に右副腎腫瘍摘出術を施行した。術後James療法に準じてVCR 1.0mg/m²・CPM 200mg/m²を投与したが、真菌感染を合併し、日齢14に死亡した。剖検にて肺転移も確認された。なお本症例の胎盤に異型細胞が認められ、NCAM陽性細胞であることから神経芽腫の胎盤転移と考えられた(図2)。

症例5は生下時より両下肢の運動麻痺、第1腰椎以下の知覚障害と膀胱直腸障害を呈していた。MRIにて右後腹膜腔に腫瘤を認め、第9胸椎から第2腰椎の椎間孔から脊柱管内に腫瘍が進入していた(図3)。Dumb-bell typeの神経芽腫と診断し、半量に減量したJames療法を行った。腫瘍マーカーは低下したが、神経症状は改善しなかったため、日齢55に後腹膜腫瘍摘出及び椎弓切除を行った。またこの際、右胸腔内に胸膜転移を認めたため、stage 4と診断、約半量に減量したA1 protocolを6コース施行した¹⁾。治療終了後16年経過し、再発なく生存中であるが、下肢麻痺と膀胱直腸障害は残存している。

表1 対象症例

番号	性別	日齢	週数	体重	分娩	診断	原発巣	診断	OE	備考	予後
1	F	0	32	1,298	CS (骨盤位)	院外	後腹膜	神経芽腫	-	経過観察のみ	生存
2	M	7	39	3,200	経膈	院外	後腹膜	神経芽腫	+	術後肝不全, 感染	7カ月 死亡
3	F	1	38	3,930	経膈	院外	左副腎	神経芽腫	+	化学療法後腎不全	14日 死亡
4	M	0	40	4,236	経膈	院外	右副腎	神経芽腫	+	挿管, 腫瘍破裂	0日 死亡
5	M	15	41	3,800	経膈	院外	後腹膜	神経芽腫	+	膀胱直腸障害	生存
6	F	23	39	3,468	経膈	院外	縦隔	神経芽腫	+	挿管 (日齢7), 乳糜胸水	生存
7	M	0	38	2,788	経膈	出生前	右副腎	神経芽腫	+	呼吸困難, メレナ	生存
8	F	18	38	2,256	経膈	院外	左頸部	神経芽腫	+	気切	生存
9	F	39	39	4,004	不明	院外	右上顎	HPC	+	出血, 腫瘍	生存
10	M	0	36	2,644	経膈 (誘発)	出生前	左肺	HPC	+	挿管, 呼吸管理	生存
11	M	0	29	944	CS (徐脈)	出生前	脾臓	HPC	+	腹部膨満	生存
12	F	11	40	2,896	経膈	院外	膈前庭	横紋筋肉腫	-	botryoid type	生存
13	M	0	36	2,870	予定CS	出生前	左頸部	fibrosarcoma	+	高拍出性心不全	7カ月 死亡
14	F	6	26	1,628	経膈	院内	両側副腎	副腎皮質癌	-	EMG症候群, 多臓器不全	6日 死亡
15	F	0	39	2,772	経膈	出生前	右腎, 小脳	MRTK + PNET	+	右腎腫瘍破裂にて緊急手術	8日 死亡

日齢：診断日齢, 体重：出生体重, CS：帝王切開, HPC：hemangiopericytoma, OE：oncologic emergency

表2 神経芽腫：8例

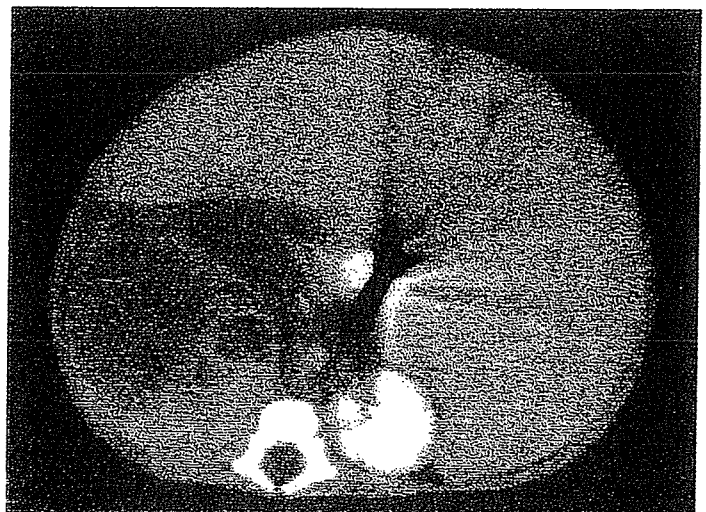
症例	性別	日齢	診断	原発	病期	OE	治療	備考	予後
1	F	0	院外	後腹膜	1	-	無治療	観察のみで退縮	生存9Y
2	M	7	院外	後腹膜	4	+	OP-C	化学療法後肝不全	死亡 (化療) 4M
3	F	1	院外	左副腎	4	+	OP-C	化学療法後感染	死亡 (化療) 14D
4	M	0	院外	右副腎	1	+	蘇生のみ	腫瘍破裂	死亡 (ショック) 0D
5	M	15	院外	後腹膜	4	+	C-OP-C	Dumb-bell, 下肢麻痺	生存16Y
6	F	23	院外	縦隔	4	+	C-OP-C	呼吸困難, 乳糜胸水	生存10Y
7	M	7	出生前	右副腎	4S	+	C	呼吸困難, メレナ	生存8Y
8	F	18	院外	左頸部	1	+	B-C	気道確保のため気切	生存2Y

OE：oncologic emergency, OP：手術, C：化学療法, B：生検

図1 神経芽腫 (症例3)



単純X線



腹部造影CT

図2 胎盤に認められた異型細胞 (症例3)

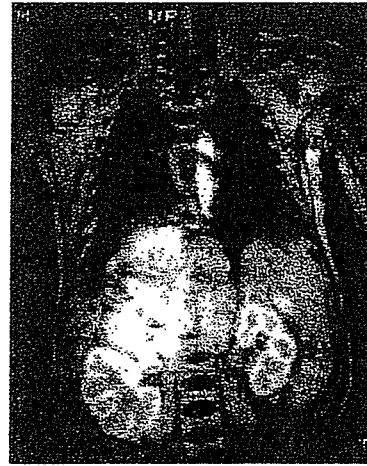


HE染色



NCAM免疫染色

図3 神経芽腫 dumb-bell例 (症例5: MRI)



Hemangiopericytoma

Hemangiopericytomaを3例経験した。症例9は右上顎原発例で出血のため治療に難渋した。出生前診断され周産期管理の後、治療された症例が2例あった。症例10は出生前診断により腹腔内の巨大な腫瘍が指摘されていたため、計画分娩の後、生後8時間で緊急手術を行った²⁾。症例11も出生前診断例で、妊娠経過中徐脈を認めたため緊急帝王切開を行った。右肺原発腫瘍による呼吸不全を呈したため、生検による診断確定の後、挿管管理下にVCR 0.45mg/m²とCPM 360mg/m²を2コース投与した。CT上腫瘍内造影効果は消失したが、十分な縮小は得られなかったため、日齢69に右中葉を合併切除して腫瘍を摘出した。術後3日間の呼吸管理の後、経過良好で退院した。再発徴候なく生存中である。

横紋筋肉腫

症例12は臍原発の botryoid type 横紋筋肉腫例で、出生時に臍外に発育するブドウ状の腫瘍を認め、生検にて横紋筋肉腫の診断を得、搬送入院となった。手術により腫瘍を全摘し得たため、Group 1と判断し、IRS IIIのプロトコルに従いVAC療法を6コース投与した³⁾⁴⁾。治療終了後7年経過しているが再発なく生存中である(図4)。

Infantile fibrosarcoma

症例13は治療に難渋した infantile fibrosarcoma 症例である⁵⁾。26週時の胎児エコーにて頸部腫瘍を指摘され、その後腫瘍内血流の増加と高拍出性心不全徴候を呈したため、36週に帝王切開にて出生。CTおよびMRIにて腫瘍は頸部から縦隔内にも達しており、著明な血

図4 臍原発新生児横紋筋肉腫 (症例12)

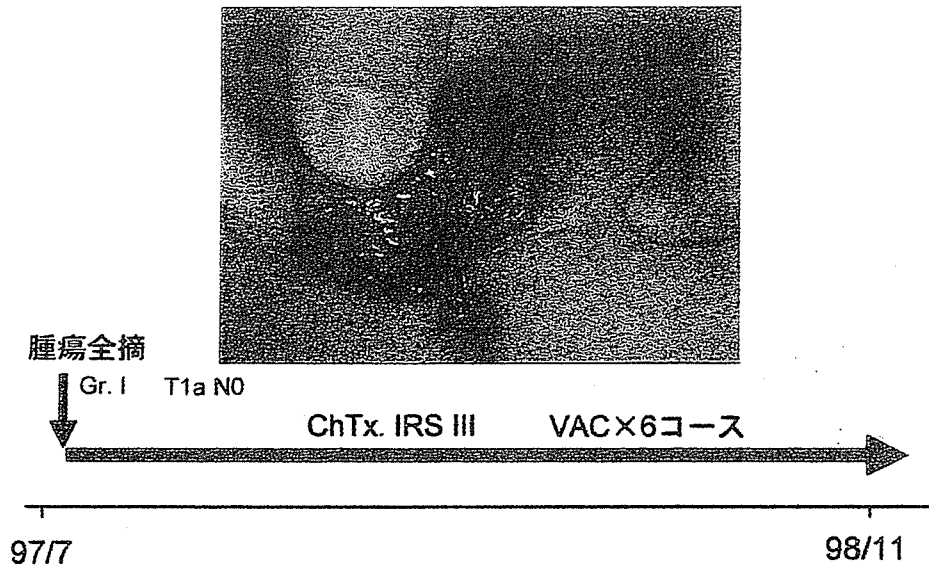
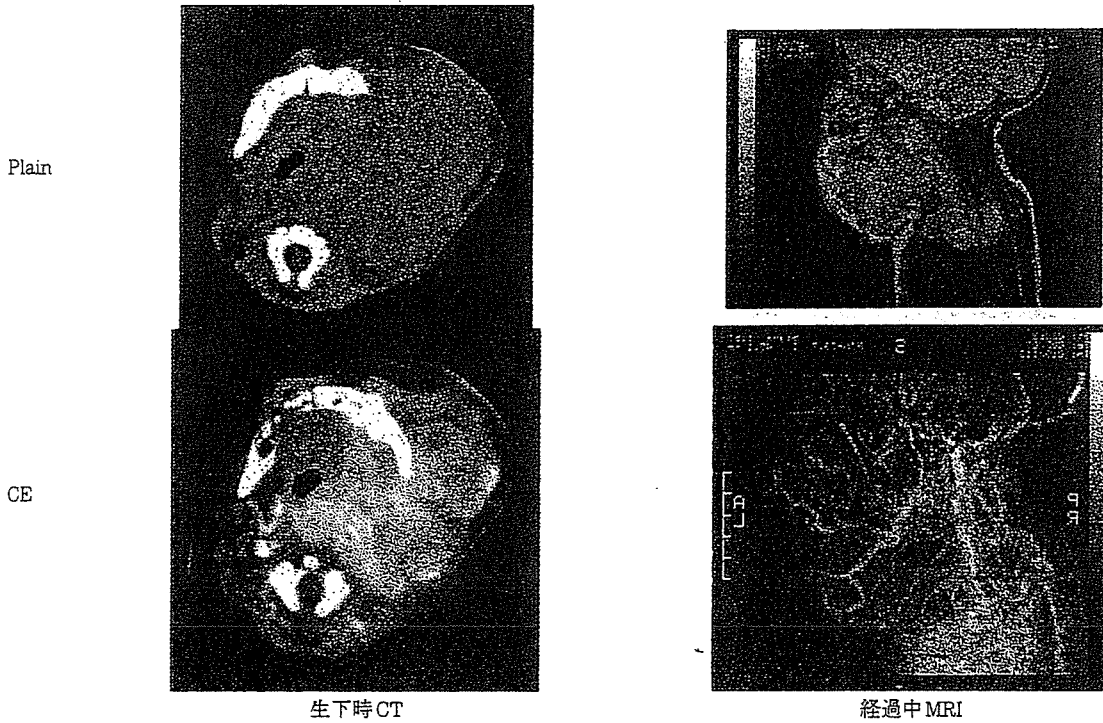


図5 Infantile fibrosarcoma (症例13)

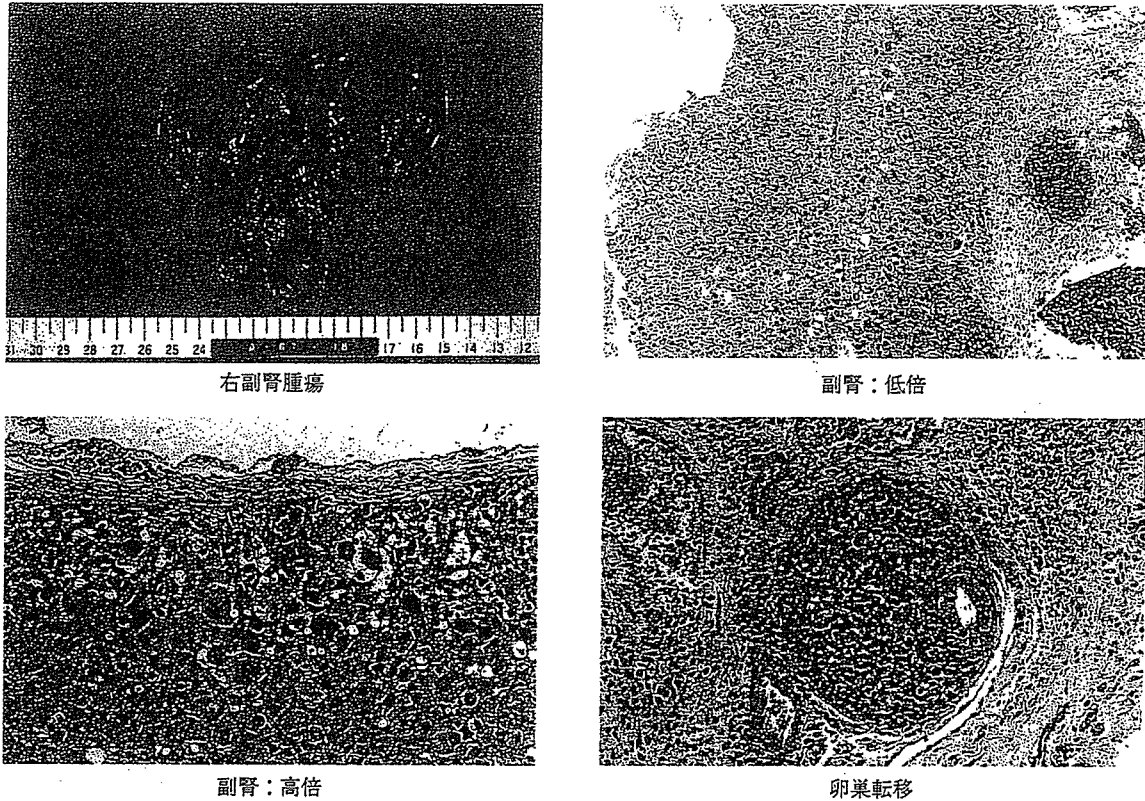
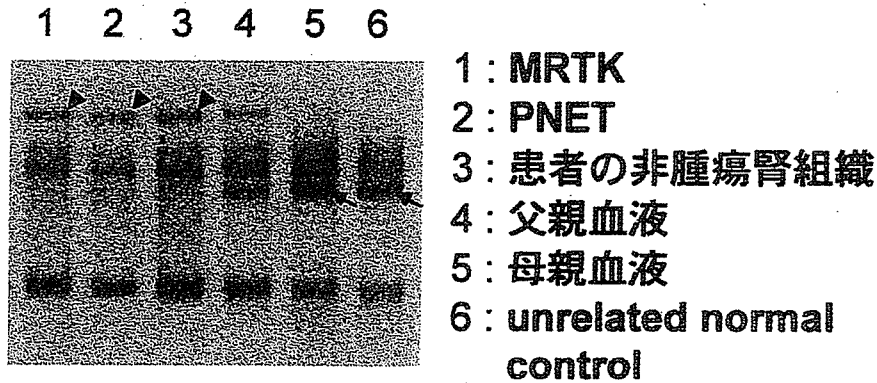


管増生が見られた (図5)。当初は血管腫と診断し、ステロイド、アスピリン、CPM投与を行ったが、徐々に腫瘍は増大し、人工呼吸管理を要するようになった。放射線療法も奏効せず、その後高カルシウム血症も合併したため、開胸手術を敢行したが術中出血により死亡した。剖検後の組織診断にて infantile fibrosarcoma の最終診断を得た。

副腎皮質癌^{6) 7)}

症例14はEMG症候群を合併した副腎皮質癌の症例である。25週の胎児エコーで羊水過多と臍帯ヘルニアを指摘され、高位破水を来したため、26週で頸膈分娩。生下時体重1,628g、胎児水腫を認めた。また臍帯ヘルニアに加え、巨舌もみられたことからEMG症候群と診断した。腎不全、心不全を併発し、日齢6に死亡。剖

図6 副腎皮質癌症例 (EMG 症候群合併：症例14)

図7 *INI1* 遺伝子の PCR-SSCP (exon 9) (症例15)

Arrow head : band shift

Arrow : 正常塩基配列に対応するband

検により両側副腎に腫瘍を認め、副腎皮質癌と診断された。また、肺、卵巣に複数の転移巣を認めた(図6)。

MRTK・小脳PNET合併例⁹⁾

症例15は出生当日に右腎腫瘍破裂による腹腔内出血にて発症。緊急右腎摘出術を行い、組織学的にMRTKの診断を得た。同時に小脳腫瘍を認め、日齢7に開頭術を行ったが、術中出血により死亡した。小脳腫瘍はPNETの診断であった。RTKと中枢性PNET(cPNET)の合併には*INI1* 遺伝子変異が関与していることが判明

しているため^{9) 10)}、両親の承諾を得て*INI1* 遺伝子変異の検索を行った。SSCP法により検討すると、exon 9に異常が認められた(図7)。レーン1, 2の腫瘍組織, 3の非腫瘍組織のみならず、患児の父親に特徴的なバンドが認められた。これはpolymorphismに起因しており、レーン5, 6の母親と正常コントロールのパターンと比較すると、父親ではwild typeとpolymorphismのheterozygosityを示した。患児の組織では非腫瘍組織も含めてpolymorphismのパターンのみが認められ、患児

においては母親由来の *INI1* 遺伝子が germ-line で欠失していることが判明した (図7)。次に *INI1* 遺伝子座の存在する22番染色体長腕上のマイクロサテライトマーカーを用いて検索すると、患児の MRTK, PNET いずれにおいても、非常に大きな領域の LOH が確認された。両腫瘍における *INI1* 遺伝子発現がほとんど検出されないという傍証も得たことから、患児は germline で母親由来の *INI1* 遺伝子が欠失しており、さらに両腫瘍内において、残された父親由来の遺伝子も欠失していると結論した⁸⁾。

考 察

新生児悪性固形腫瘍症例15例中12例(80%)が腫瘍に起因する緊急症状、いわゆる oncologic emergency を呈していた。全身管理の難しい新生児期に重篤な症状を呈する症例は予後不良で、12例中5例が死亡している。Oncologic emergency の症状は、腹部膨満、気道圧迫や胸水による呼吸障害、腫瘍破裂による出血性ショックが複数例に見られた。その他 dumb-bell 型神経芽腫に生じた神経障害、血管腫様の高拍出性心不全症状を呈した巨大頸部 fibrosarcoma も特徴的であった。

胎内や出生直後に重篤な症状を呈する症例では、出生前診断に基づく計画的な周産期管理が大切である。大阪府立母子保健総合医療センターにおいて胎児診断された腫瘍性病変を検討した大植ら¹¹⁾によると、管理上の問題点として、1) 腫瘍が巨大で産道通過障害を来す可能性がある場合、2) 腫瘍が急速に増大する場合、3) 腫瘍出血や高拍出性心不全による胎児の状態が不良となる場合、4) 気道圧迫などにより出生後に緊急蘇生処置が必要となる場合、を挙げている。これらに対応した周産期管理が治療成績向上のために重要であると考えられる。

疾患別では、神経芽腫が8例と最多であった。このうち問題となったのは、びまん性肝転移を有し、著明な肝腫大から呼吸不全を呈する症例である。救命は極めて困難で、早期に適切な放射線療法や化学療法を行うことが推奨される。このためには早期診断が重要であるが、全身状態が悪く開腹生検が不可能な症例では、症例3のように胎盤の腫瘍細胞を確認することも早期診断の一助となろう。次に問題となるのは下肢麻痺や膀胱直腸障害をもたらす dumb-bell 型神経芽腫症例である。一般的に腫瘍の生命予後は良好であるが神経症状を残す症例が多い。以前は緊急椎弓切除を行い、圧迫を解除することが行われてきたが、側彎等の晩期障害を来すことが問題である。胎児期から長期間脊髄圧迫を受けていた症例では、椎弓切除を行っても神経症状の改善が期待できない。神経芽腫は化学療法に対する反応も良いので、最近では化学療法を優先させることが推奨されている¹²⁾。

新生児神経芽腫の場合、*MYCN* 増幅の見られた症例

は極めて稀で、多くの症例において生物学的予後因子は良好である¹³⁾。重篤な oncologic emergency を呈した症例6, 7, 8においても、適切な化学療法を行えば腫瘍の縮小は極めて良好で、いずれも救命できている。反面、腫瘍破裂を来した症例4と化学療法による重篤な合併症を来した症例2, 3を失った。特に臓器機能が未熟な新生児に対する化学療法は、重篤な合併症を生じることが多いため、薬剤、用量の選択が重要である。

Hemangiopericytoma は1歳以上の患児に好発する adult type と1歳未満に見られる infantile type に大別される。前者は成人例と同様予後不良で、積極的な集学的治療が必要とされる。一方、新生児症例を含む infantile type は infantile myofibromatosis と同じスペクトラムにある腫瘍とされ^{14) 15)}、自然退縮も期待できることから、過剰な治療は慎むべきである^{16) 17)}。しかしながら新生児期に巨大腫瘤による圧迫症状を来すこともあり、慎重な周産期管理を要する。症例10および11において、産科と協力して胎児期からの管理を行うことで良好な結果を得た²⁾。また、症例10において腫瘍の縮小を期待して化学療法を施行した。十分な縮小効果は得られなかったものの、腫瘍内の造影効果が減弱するなどの変化が見られた。近年 infantile type は化学療法に対する反応が良好であるという報告も出ている^{16) 17)}。

腫瘍発の新生児横紋筋肉腫例に対しては全摘後に IRS III に準じて化学療法を行った^{3) 4)}。1歳以下の乳児例に対する化学療法は減量して行うべきという報告が多く^{18) 19)}、特に3カ月未満の患児に対してはアントラサイクリン系の抗癌剤投与は行うべきでないという意見がある¹⁸⁾。本症例では安全に治療を遂行できたが、今後は慎重に治療法を選択する必要がある。グループスタディによる多数例での検討が待たれる。

Infantile fibrosarcoma 例は不幸な転帰をとった。出生前に血流の豊富な腫瘍性病変がとらえられていたが、当初は血管腫と考えていたために、自然退縮を期待した姑息的治療に終始した。臨床経過が典型的でない場合は悪性腫瘍も念頭に置いて、生検による正確な診断を行い、早期から集学的治療を行うべきであったと反省される。

副腎皮質癌は、生後6時間で他病死した EMG 症候群症例の剖検時に発見されたものである。多数例の検討では、EMG 症候群の約8.5%に悪性腫瘍の合併が見られるとされる²⁰⁾。副腎皮質癌の合併は Wilms 腫瘍に次いで多く、11p15.5 の LOH や *IGF2* 遺伝子の発現亢進が両疾患に共通して観察されることから、共通する遺伝子異常がその病因であることが明らかとなってきた²¹⁾。本症例は germline に 11 番染色体短腕上で genomic imprinting を主体とした遺伝子異常を来し、これが副腎皮質癌の胎児期発生、多発性転移に関与したと考えられた。

MRTKとcPNETのいずれも、胎児期に発生するのは極めて稀である。患児と両親の遺伝子検索により、患児はgermlineで母親由来の*INI1*遺伝子が欠失しており、さらに両腫瘍内において、残された父親由来の遺伝子も欠失していることが判明した。近年両疾患の合併例では、本例と同様に、一方のalleleの*INI1*遺伝子変異がgermlineで存在し、それぞれの腫瘍内でもう一方のalleleに変異を生じていることが観察されている^{8, 10, 22)}。

先に示した副腎皮質癌症例と同様、germlineにおける遺伝子変化が胎児期の腫瘍形成に重要な役割を果たしていることを示唆する症例であった。副腎皮質癌、MRTKとも極めて悪性度の高い難治性疾患で、遺伝子変化に着目した新たな治療法の開発が期待される。

まとめ

新生児期に発見された悪性固形腫瘍15例を検討した。

12例80%がoncologic emergencyを呈しており、うち5例が死亡していた。

15例中8例は神経芽腫で、化学療法に反応した4例と自然退縮した1例が生存中である。死亡3例中2例は合併症死しており、新生児の治療法の選択が重要であると思われた。

またgermlineに遺伝子異常を有する例が2例存在した。

稀な新生児悪性固形腫瘍の治療成績改善のためには、多施設で症例を集積し検討する必要があると思われた。

文 献

- 米田光宏, 福沢正洋, 草深竹志, ほか. 新生児Dumb-bell型神経芽腫の1例. *小児がん* 1990; 27: 349-51
- 田中夏美, 窪田昭男, 川原央好, ほか. 胎児超音波検査にて発見された超低出生体重児の脾臓原発血管外皮腫の1治験例. *日本小児外科学会雑誌* 2005; 41: 206-11.
- Crist WM, Anderson JR, Meza JL, et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3091-102
- Crist W, Gehan EA, Ragab AH, et al. The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J Clin Oncol* 1995; 13: 610-30
- 米田光宏, 井村賢治, 八木 誠. 腫瘍と電解質代謝異常. *小児外科* 1995; 27: 1405-12
- Nakayama M, Kubota A. A case of adreno-cortical tumor in a premature baby with EMG syndrome. *Arch Histopathol D D* 2004; 11: 16-9
- 福澤正洋, 川原央好, 草深竹志, ほか. 出生後早期に多発転移を認めたEMG症候群合併, 副腎皮質癌の1例. *小児がん* 1988; 25: 549-51
- Kusafuka T, Miao J, Yoneda A, et al. Novel germ-line deletion of *SNF5/INI1/SMARCB1* gene in neonate presenting with congenital malignant rhabdoid tumor of kidney and brain primitive neuroectodermal tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 40: 133-9
- Versteeg I, Sevenet N, Lange J, et al. Truncating mutations of *hSNF5/INI1* in aggressive paediatric cancer. *Nature* 1998; 394: 203-6
- Savla J, Chen TT, Schneider NR, et al. Mutations of the *hSNF5/INI1* gene in renal rhabdoid tumors with second primary brain tumors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 648-50
- 大植孝治, 窪田昭男, 川原央好, ほか. 出生前診断された腫瘍性病変の治療方針. *小児がん* 2004; 41: 805-9
- Bernardi BD, Balwierz W, Bejent J, et al. Epidural compression in neuroblastoma: Diagnostic and therapeutic aspects. *Cancer Lett* 2005; 228: 283-99
- Granata C, Fagnani AM, Gambini C, et al. Features and outcome of neuroblastoma detected before birth. *J Pediatr Surg* 2000; 35: 88-91
- Mentzel T, Calonje E, Nascimento AG, et al. Infantile hemangiopericytoma versus infantile myofibromatosis. Study of a series suggesting a continuous spectrum of infantile myofibroblastic lesions. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 922-30
- Variend S, Bax NM and van Gorp J. Are infantile myofibromatosis, congenital fibrosarcoma and congenital haemangiopericytoma histogenetically related? *Histopathology* 1995; 26: 57-62
- Ferrari A, Casanova M, Bisogno G, et al. Hemangiopericytoma in pediatric ages: a report from the Italian and German Soft Tissue Sarcoma Cooperative Group. *Cancer* 2001; 92: 2692-8
- Rodriguez-Galindo C, Ramsey K, Jenkins JJ, et al. Hemangiopericytoma in children and infants. *Cancer* 2000; 88: 198-204
- Ferrari A, Casanova M, Bisogno G, et al. Rhabdomyosarcoma in infants younger than one year old: a report from the Italian Cooperative Group. *Cancer* 2003; 97: 2597-604
- Ragab AH, Heyn R, Tefft M, et al. Infants younger than 1 year of age with rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1986; 58: 2606-10
- Sotelo-Avila C, Gonzalez-Crussi F, Starling KA. Wilms' tumor in a patient with an incomplete form of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatrics* 1980; 66: 121-3
- Steenman M, Westerveld A, Mannens M. Genetics of Beckwith-Wiedemann syndrome-associated tumors: common genetic pathways. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 1-13
- Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, et al. Germ-line and acquired mutations of *INI1* in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 74-9



ELSEVIER

Single nucleotide polymorphism array analysis to predict clinical outcome in neuroblastoma patients[☆]

Eiso Hiyama^{a,b,*}, Hiroaki Yamaoka^a, Arata Kamimatsuse^a, Yoshiyuki Onitake^a, Keiko Hiyama^c, Masahiko Nishiyama^c, Taijiro Sueda^a

^aDepartment of Pediatric Surgery, Hiroshima University Hospital, Hiroshima University, Hiroshima, 734-8551, Japan

^bNatural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University, Hiroshima, 734-8551, Japan

^cTranslational Cancer Research, RIRBM, Hiroshima University, Hiroshima, 734-8551, Japan

Index words:

Neuroblastoma;
Mass screening;
Genetic alteration;
Microarray;
Prognosis

Abstract

Purpose: Neuroblastoma (NB) is a heterogeneous tumor and demonstrates favorable or unfavorable outcomes. In Japan, a nationwide NB mass screening (MS) had been performed on 6-month-old infants for approximately 20 years, which might have detected almost all NB including regressing/maturing tumors. To clarify the heterogeneity of this tumor, we examined genetic alterations in the representative cases using genomewide microarrays.

Methods: Genomic DNA was extracted from 198 NB tissue samples and paired blood samples including 76 MS-detected cases and analyzed by single nucleotide polymorphism arrays.

Results: The single nucleotide polymorphism array classified the genetic aberrations into 4 types: whole gain/loss type, partial gain/loss type, *MYCN*-amplified type, and silent type. Most MS-detecting cases belonged to the whole gain/loss type, whereas unfavorable cases who died of disease showed partial gain/loss, *MYCN*-amplified, or silent types.

Conclusions: Genomewide genetic analysis is useful to predict the outcome of patients. Although the cases whose tumors showed whole gain/loss may respond well to contemporary therapy, sparing intensive surgery, current therapeutic strategy may be insufficient for the subgroups with partial gain/loss, *MYCN*-amplified, or silent type. Validation of these results would provide new tools to predict clinical outcome of children with NB.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Presented at the 39th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, May 14–18, 2006, Taipei, Taiwan.

[☆] This study was supported by a grant-in-aid for a scientific research (16-Kodomo-012) from the Ministry of Health, Labour, and Welfare of the Government of Japan.

* Corresponding author. Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University, Hiroshima, 734-8551, Japan. Tel.: +81 82 257 5951; fax: +81 82 257 5416.

E-mail address: eiso@hiroshima-u.ac.jp (E. Hiyama).

Neuroblastoma (NB), one of the common malignant childhood tumors, arises from neuroblast cells derived from the neural crest and destined for the adrenal medulla and the sympathetic nervous system and affects approximately 1 in 7000 individuals [1]. It has been known for many years that NBs show remarkable biologic heterogeneity, resulting in favorable prognosis in some instances and unfavorable prognosis owing to aggressive growth despite multimodal

Table 1 Age at diagnosis and INSS

Age at diagnosis (mo)	MS cases (deceased)	Clinical cases (deceased)	INSS	MS cases (deceased)	Clinical cases (deceased)
0-5	0	19 (3)	1	30	10
6-11	65 (2)	8 (2)	2A	8	7 (2)
12-17	10	17 (7)	2B	10	13 (2)
18-23	1	28 (20)	3	15	36 (23)
24-35	0	26 (21)	4	5 (2)	49 (41)
36 and above	0	24 (17)	4S	8	7 (2)

therapy in other instances. Because more than 80% of NBs produce catecholamine metabolites (vanillylmandelic acid and homovanillic acid) that are detectable in the urine, and aggressive NBs usually occur after 1 year of age, a nationwide mass screening (MS) project intending to detect NBs at earlier stages was carried out in Japan between 1985 and 2003. Surprisingly, the incidence of this disease increased approximately 2-fold, whereas that of advanced NB in older patients did not change so much, indicating that a large number of NBs occur in infants without clinical detection and spontaneously regress or mature behind the scenes. Thus, this project to decrease the incidence of advanced NBs resulted in disappointment but gave us suggestive insights in solving the biologic problems in NB [2-4]. These phenomena raised the question whether advanced stage tumors develop from early stage tumors or represent a de novo subgroup. Transition from a favorable type to an unfavorable type has not been clearly evaluated but seems to occur rarely [5], suggesting that NB may consist of at least 2 distinct subtypes [6], which may be distinguishable by genetic characteristics.

To estimate the malignant grade and predict the biologic behavior of an individual tumor, we have proposed several prognosis-predicting markers, such as *MYCN* gene amplification, loss of chromosome 1p, loss of 11q, and gain of 17q, and DNA diploidy/tetraploidy [7]. However, each of these parameters appears to be insufficient to predict the prognosis of individual patient. Recently, microarray techniques have been developed and have rapidly become a fundamental tool in genomic research. Highly multiplexed microarray systems for single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping can genotype hundreds of thousands of SNPs at one time to detect gene dose imbalances in a whole genome [8,9]. This powerful tool permits detection of

genomic aberrations and maps these directly onto the sequence of the human genome.

In this study, to clearly divide NB cases into subtypes by the difference of genomic alterations, we applied the Affymetrix GeneChip Mapping 100K array set (Affymetrix, Inc, Santa Clara, Calif) to NBs detected by MS and by clinical symptoms.

1. Materials and methods

1.1. Samples

In Japan, approximately 5000 children, including 2500 MS-detected children, were registered between 1981 and 2004 in a database maintained by the Japanese Society of Pediatric Surgeons [10]. In the present study, genomic DNAs were extracted from 198 NB samples including 76 MS-detected cases. Ages at diagnosis and stages at surgery according to the International Neuroblastoma Staging System (INSS) are shown in Table 1. All patients were diagnosed as having NB between 1991 and 1998 at the Hiroshima University Hospital, Hiroshima, Japan, or affiliated hospitals, and most patients were treated according to the Japanese NB protocols for infants or advanced stage NB (A1, new A1, or A3) [11]. The follow-up period of all patients was more than 5 years. This research was approved by the ethical committee of the Hiroshima University (Hiro-Rin-20). Written informed consent for this research was obtained from parents of all patients. None of the patients had prior therapy before surgery or biopsy to obtain tumor specimens. Venous blood (5-7 mL) was taken from patients before surgery. Tumor DNA and constitutive DNA in each patient were extracted and purified using standard methods.

1.2. Affymetrix platform

Array experiments were done according to the standard protocols for Affymetrix GeneChip Mapping 100K arrays [12]. Briefly, total genomic DNA was digested with a restriction enzyme (*Xba*I or *Hind*III), ligated to an appropriate adapter for each enzyme, and subjected to polymerase chain reaction amplification. After digestion with DNase I, the polymerase chain reaction products were labeled with a biotinylated nucleotide analogue using

Table 2 Pattern of genetic alterations in NB

Pattern	Total cases (deceased)	MS cases (deceased)	Aneuploid cases
W	58 (2)	52	52
P	52 (20)	7	9
M	39 (34)	4 (2)	11
S	49 (16)	13	5
Total	198 (72)	76 (2)	77

terminal deoxynucleotidyl transferase and hybridized to the 100K SNP array [13]. This 100K microarray set consists of 2 microarrays: the 100K *Xba*I microarray genotyping 58,960 SNPs and the *Hind*III microarray genotyping 57,244 SNPs, covering 92% of the genome with an SNP for every 100 kb. The 100K SNP arrays were scanned with the Affymetrix GeneChip Scanner 3000 using GeneChip Operating System 1.2 (Affymetrix). Genotype calls and intensity of the SNP probes were processed by GeneChip DNA Analysis Software. Individual SNP copy numbers and chromosomal regions with gains or losses were evaluated with the Affymetrix GeneChip Chromosome Number Tool 2.0.

1.3. DNA ploidy

Frozen samples were cut into small pieces with scissors. Suspensions of single nuclei were prepared using the detergent-trypsin procedure of Vindelov et al [14] and stained with propidium iodide (Becton Dickinson, Mountain View, Calif). Measurement of DNA cellular content was performed using the FACScan or FACS caliber flow cytometer (BD, Franklin Lakes, NJ). The DNA index (DI) was determined by calculating the ratio of the modal channel number for tumor G0/G1-phase cells to that for normal diploid cells. Hence, the DI of diploid NB cells was 1.0; tumors with a distinct population with DI higher than 1.0 were defined as aneuploid.

1.4. Statistical analysis

Tests of association were performed with the use of Fisher's Exact test. Survival curves were constructed according to the methods of Kaplan and Meier [15], and comparisons of the survival curves were performed with a 2-sided log-rank test.

2. Results

Good hybridization signal intensities were obtained, and genotype calls were obtained for more than 95% SNPs on all *Xba*I and *Hind*III microarrays. This confirms that the assay was performed correctly, and that no sample contamination occurred. The loci with allelic imbalance

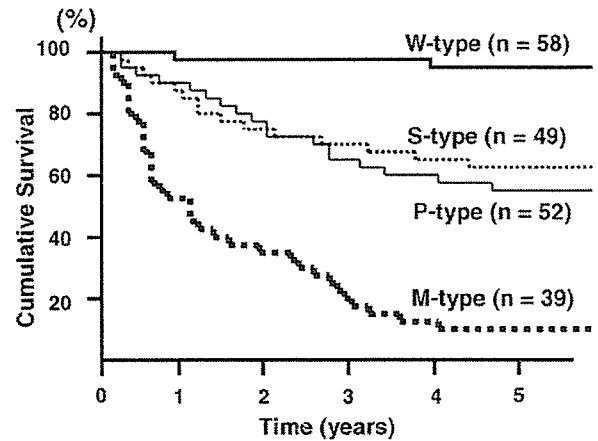


Fig. 1 Kaplan-Meier cumulative survival spots for patients with NB. Survival curves of the cases with W-type, P-type, M-type, and S-type NBs. The survival of patients with W-type tumors showed significantly better than others ($P < .001$), whereas those with M-type tumors showed significantly worse than others ($P < .001$). The survival rates of patients with P-type or S-type tumors were intermediate.

were determined for all chromosomes in each case. A case of whole chromosomal gain/loss was determined when SNP signals in each chromosome were gain (upward signals) or loss (downward signals). Such chromosomal aberrations were defined as W type. On the other hand, a case of partial chromosomal gain/loss in several chromosomes was defined as P type. In other instances, we defined M type as the cases with *MYCN*-amplified tumors. These tumors showed 1 or several amplicons including *MYCN* region. In 198 cases examined, 39 (19.6%) showed *MYCN* amplification. Two or more amplicons in 2p region were detected in 23 cases. Finally, the remaining cases that had no large chromosomal aberrations were defined as S type (silent). All tumors belonged to one of these 4 types (Table 2). In 58 W-type tumors, 52 were MS-detected tumors and only 2 cases showed unfavorable outcome. On the other hand, in 52 P-type tumors and 39 M-type tumors, most cases were detected by clinical symptoms. And the outcome of the patients with M-type tumors was very poor and those with P- or S-type tumors were intermediate.

Then, we analyzed the well-known chromosomal abnormalities in this series (Table 3). Large deletion in chromosome 1p was detected in 36 samples (18%), including the common region of deletion at 1p36 [16]. There was a significant association between 1p loss and *MYCN* amplification (M type) ($P < .001$). On the other hand, 2q gain and loss of 11q were detected in 29 samples (15%) and showed significant association with P type ($P < .001$). Partial gain of 17q was detected in 53 cases (27%), including both P-type and M-type tumors. There were significant correlations between each of these chromosomal aberrations and poor prognosis ($P < .01$).

We also examined the correlation between these genetic alterations and DNA ploidy. In 58 W-type tumors, 52 (90%)

Table 3 Chromosome 1p loss, 11q loss, and 17q gain in each pattern of genetic alterations in NB

Pattern	1p loss*	2p gain	11q loss	17q gain
W (n = 58)	0	0	0	0
P (n = 52)	3	29	27	32
M (n = 39)	33	—	2	21
S (n = 49)	0	0	0	0
Total (deceased)	36 (35)	29 (17)	29 (18)	53 (34)

* This deletion was defined as the large deletion of 1p including 1p32-36.

showed aneuploid, whereas 25 (18%) of other type tumors showed also aneuploidy. Thus, incidence of aneuploidy was significantly higher in the W-type tumors, but the data of DNA ploidy were not always compatible with those of SNP array.

The median follow-up period in the series of patients examined was 82 months (range, 1-186 months). Kaplan-Meier event-free survival curves of all patients (Fig. 1) show that the 5-year event-free survival rate in the patients with W-type tumors was 88%, which was significantly better than the remaining cases.

3. Discussion

Clinical, biologic, and genetic observations have clearly demonstrated that NB encompasses several different diseases [6,7]. An Affymetrix platform to survey genome-wide genetic alterations revealed that more than 4 subtypes exist in 1 disease entity of NB. And W-type tumor is rare in the elder patients but accounts for more than half of MS-detected tumors, including most of the regressing/maturing tumors. Because the outcome of the patients with W-type tumor is excellent regardless of stages of tumor, these W-type tumors are considered as regressing/maturing NBs. Thus, the treatment strategies for W-type tumors should be less aggressive to minimize side effects. In the remaining 3 types, in which most patients had been diagnosed by clinical symptoms, *MYCN*-amplified tumors showed poorest prognosis, whereas the other 2 types showed intermediate mortality rates. Among the well-known chromosomal alterations, 1p loss was frequently detected in M type, whereas 2p gain and 11q loss were in P type. Gain of 17q was detected in both M and P types. These results are consistent to the previous reports that demonstrated these chromosomal aberrations as prognosis-associated factors [17-23]. This platform successfully evaluated these alterations at once.

In the partial gain/loss tumors and silent tumors mainly diagnosed by clinical symptoms, 30% to 40% of the patients showed poor prognosis. There is a possibility that critical genetic alterations that determine a malignant grade of tumors may exist in small lesions, especially in silent type of tumors. The genome-wide gene expression profile is one of the most promising tools to reveal such critical genes. We are now analyzing the combination of genetic alterations and gene expression profiles in these tumors [24,25]. These studies might point out the key genes as candidates of risk assessment markers as well as therapeutic targets in NB.

Acknowledgements

The authors acknowledge Ikuko Fukuba of N-BARD and Emi Fukuda of the Department of Surgery, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima,

Japan, for technical assistance. We thank the Committees on Tumor Registration, Japanese Society of Pediatric Surgeons, and Japanese Society of Pediatric Oncology for providing the registered data or NB patients. And we also thank the research project for evaluating the efficacy of Japanese MS system in Health and Labour Science Research Grants for Research on Children and Families funded by Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (H16-KODOMO-012) for critical discussion on these data.

References

- [1] Young JL, Ries LG, Silverberg E, et al. Cancer incidence, survival, and mortality for children under 15 years of age. *Cancer* 1987;56: 598-602.
- [2] Schilling FH, Spix C, Berthold F, et al. Neuroblastoma screening at one year of age. *N Engl J Med* 2002;346:1047-53.
- [3] Woods WG, Gao RN, Shuster JJ, et al. Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 2002;346:1041-6.
- [4] Yamamoto K, Ohta S, Ito E, et al. Marginal decrease in mortality and marked increase in incidence as a result of neuroblastoma screening at 6 months of age: cohort study in seven prefectures in Japan. *J Clin Oncol* 2002;20:1209-14.
- [5] Nishihira H, Toyoda Y, Tanaka Y, et al. Natural course of neuroblastoma detected by mass screening: a 5-year prospective study at a single institution. *J Clin Oncol* 2000;18:3012-7.
- [6] Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203-16.
- [7] Hiyama E, Hiyama K. Molecular and biological heterogeneity in neuroblastoma. *Current Genomics* 2005;6:319-32.
- [8] Wong KK, Tsang YT, Shen J, et al. Allelic imbalance analysis by high-density single-nucleotide polymorphic allele (SNP) array with whole genome amplified DNA. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e69.
- [9] Maris JM, Hii G, Gelfand CA, et al. Region-specific detection of neuroblastoma loss of heterozygosity at multiple loci simultaneously using a SNP-based tag-array platform. *Genome Res* 2005;15: 1168-76.
- [10] Hayashi Y, Hiyama E, Tajiri T. Report from committee on tumor registration, Japanese Society of Pediatric Surgeons. *J Jap Soc Pediatr Surg* 2006;42:61-72.
- [11] Kaneko M, Tsuchida Y, Uchino J, et al. Treatment results of advanced neuroblastoma with the first Japanese study group protocol. Study group of Japan for treatment of advanced neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999;21:190-7.
- [12] Yuan E, Haghighi F, White S, et al. A single nucleotide polymorphism chip-based method for combined genetic and epigenetic profiling: validation in decitabine therapy and tumor/normal comparisons. *Cancer Res* 2006;66:3443-51.
- [13] Kennedy GC, Matsuzaki H, Dong S, et al. Large-scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol* 2003;21:1233-7.
- [14] Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. Detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983;3:323-7.
- [15] Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistical Association* 1958;53: 457-81.
- [16] Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, et al. Biological characteristics of neuroblastoma with partial deletion in the short arm of chromosome 1. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:67-74.
- [17] Guo C, White PS, Weiss MJ, et al. Allelic deletion at 11q23 is common in *MYCN* single copy neuroblastomas. *Oncogene* 1999; 18:4948-57.
- [18] Plantaz D, Vandesompele J, Van Roy N, et al. Comparative genomic hybridization (CGH) analysis of stage 4 neuroblastoma reveals high

- frequency of 11q deletion in tumors lacking MYCN amplification. *Int J Cancer* 2001;91:680-6.
- [19] Gilbert F, Feder M, Balaban G, et al. Human neuroblastomas and abnormalities of chromosomes 1 and 17. *Cancer Res* 1984;44:5444-9.
- [20] Breen CJ, O'Meara A, McDermott M, et al. Coordinate deletion of chromosome 3p and 11q in neuroblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;120:44-9.
- [21] Donti E, Longo L, Tonini GP, et al. Cytogenetic and molecular study of two human neuroblastoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 1988;30:225-31.
- [22] Lastowska M, Cotterill S, Pearson AD, et al. Gain of chromosome arm 17q predicts unfavourable outcome in neuroblastoma patients. U.K. children's cancer study group and the U.K. Cancer Cytogenetics Group. *Eur J Cancer* 1997;33:1627-33.
- [23] Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, et al. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005;353:2243-53.
- [24] Hiyama E, Hiyama K, Nishiyama M, et al. Differential gene expression profiles between neuroblastomas with high telomerase activity and low telomerase activity. *J Pediatr Surg* 2003;38:1730-4.
- [25] Hiyama E, Hiyama K, Yamaoka H, et al. Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. *Pediatr Surg Int* 2004;20:33-8.

MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma detected by mass screening

T Iehara^{*,1}, H Hosoi¹, K Akazawa², Y Matsumoto¹, K Yamamoto³, S Suita⁴, T Tajiri⁴, T Kusafuka⁵, E Hiyama⁶, M Kaneko⁷, F Sasaki⁸, T Sugimoto¹ and T Sawada¹, Committee of Neuroblastoma in the Japanese Society of Pediatric Oncology⁹

¹Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi-Hirokoji Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan; ²Department of Medical Informatics, Niigata University Medical Hospital, Asahimachi-dori 1-754, Niigata 951-8520, Japan; ³Saitama Children's Medical Center, Division of Hematology/Oncology, Iwatsuki, Saitama 339-0077, Japan; ⁴Department of Pediatric Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan; ⁵Department of Pediatric Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka 565-0871, Japan; ⁶Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University, Hiroshima 734-8551, Japan; ⁷Department of Pediatric Surgery, University of Tsukuba, Tsukuba 305-0005, Japan; ⁸Pediatric Surgery, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

MYCN is the most powerful prognostic factor in cases of older children. However, how MYCN is related to the prognosis of infantile cases is not clear. A mass screening program was carried out by measuring urinary catecholamine metabolites (VMA and HVA) from 6-month-old infants. Of 2084 cases detected by the screening program, MYCN amplification (MNA) was examined by Southern blot analyses in 1533 cases from 1987 to 2000. Of the 1533 cases examined, 1500 (97.8%) showed no MNA, 20 cases (1.3%) showed MNA from three to nine copies, and 13 (0.8%) cases showed more than 10 copies. The 4-year overall survival rates of these three groups (99, 89 and 53%, respectively) were significantly different ($P < 0.001$), indicating that MYCN copy number correlates with the prognosis. Cases with MNA more than 10 copies were more advanced than those without amplification (stage III, IV vs I, II, IVs; $P < 0.001$). Patients with MNA more than 10 copies had significantly higher serum levels of neuron-specific-enolase (NSE) and ferritin than non-amplified patients ($P = 0.049$, $P = 0.025$, respectively). MYCN amplification was strongly correlated with a poor prognosis in infantile neuroblastoma cases. Therefore, for the selection of appropriate treatment, an accurate determination of MNA is indispensable.

British Journal of Cancer (2006) 94, 1510–1515. doi:10.1038/sj.bjc.6603149 www.bjcancer.com

Published online 2 May 2006

© 2006 Cancer Research UK

Keywords: neuroblastoma; infant; MYCN; mass screening

Neuroblastoma (NB) is characterized by heterogeneous tumours, some of which regress spontaneously while others proliferate and progress (D'Angio *et al*, 1971; Evans *et al*, 1971; Look *et al*, 1991). The prognosis for NB in infants is much more favourable than it is in older children. In 1973, the Mass Screening Program for Neuroblastoma (MSPN) was commenced for the early detection of NB in children living in Kyoto, Japan. A nationwide MSPN for 6-month-old infants began in 1985 (Sawada *et al*, 1984). The latter MSPN revealed incidences of infantile NB in the early stages and good biological prognostic factors of tumours increased (Hachitanda *et al*, 1994; Sawada *et al*, 1998). However, it has been argued that MSPN might result in the overdiagnosis of tumours, because some of the tumours might spontaneously regress (Yamamoto *et al*, 2002; Honjyo *et al*, 2003). And, the researcher has concluded that the screening was ineffective, because clustered randomized trials have not shown that screening led to a significant reduction in mortality rate from NB (Woods *et al*, 2002; Kerbl *et al*, 2003). Consequently,

criticism has arisen that MSPN might detect only redundant tumours with good prognostic factors. Actually, the prognosis in most NB cases detected by MSPN has proved to be good. However, some cases detected by MSPN have poor prognostic factors resulting in relapsed disease (Kusafuka *et al*, 1995). Moreover, there are reports that the good prognosis has been obtained by early treatment in infantile NB cases with poor prognostic factors (Kusafuka *et al*, 1995; Tanaka *et al*, 1998).

Although MYCN is well known to be the most powerful prognostic factor in noninfantile cases of NB, how MYCN is related to the prognosis of infantile cases, especially those discovered by MSPN, is not clear. Therefore, we assessed MYCN amplification (MNA) in infantile cases. If the prognoses of infantile NB cases detected by mass screening and MNA correlate strongly, it is necessary to evaluate MNA to decide on the appropriate treatment for these cases.

PATIENTS AND METHODS

Analysis of urine catecholamine

Kits for screening children for urinary catecholamines were provided to the parents at public health centres throughout Japan

*Correspondence: Dr T Iehara; E-mail: iehara@koto.kpu-m.ac.jp

⁹For more details of Committee of Neuroblastoma in the Japanese Society of Pediatric Oncology see Appendix A1

Received 19 December 2005; revised 27 March 2006; accepted 5 April 2006; published online 2 May 2006

when they brought their child in for a health checkup at 3 months of age. Urine was collected by parents at home and sent to screening centres by mail. Urine samples were assayed for vanillyl-mandelic acid (VMA) and homovanillic acid (HVA) by high-performance liquid chromatography (HPLC). When children's urinary levels of either VMA or HVA were >2.5 s.d. above normal, the child was given clinical examinations for NB at a hospital. The normal range was based on levels in healthy infants of an age-matched (Sawada, 1988).

Patient population

Between April 1987 and March 2000, the population of the target infants was 17 139 975. Of this number, 14 496 103 (84.6%) were screened for elevated catecholamine levels. Of this number, 2084 children were diagnosed as having NB based on urinary catecholamine levels and were registered with the Committee of Neuroblastoma in the Japanese Society of Pediatric Oncology.

Staging The extent of the disease was evaluated according to the Evans's stage classification (Evans *et al.*, 1971). The International Staging System (INSS) (Brodeur *et al.*, 1993) had not yet been introduced when the MSPN began.

Biological features The prognosis and clinical features of these cases were evaluated on the basis of the MNA. MYCN amplification in tumour samples was detected using a Southern blot analysis with MYCN second-exon probe according to standard procedures (Brodeur *et al.*, 1984). Although cases with 10 copies or more of the MYCN gene are classified into the high-risk group in Japan (Kaneko *et al.*, 2002), in this study the MYCN gene was considered amplified if there were more than three copies.

Registry

The hospitals reported the cases to the registration centre within 2 years of the findings of elevated catecholamine levels in the screening process. The hospital reported the outcome of each case 5 years after the initial diagnosis of NB. However, the outcome of the cases diagnosed between 1999 and 2000 has been 2 years since the appearance of disease.

Statistical analysis

The Kaplan-Meier product limit method was used to estimate the event-free survival (EFS) and overall survival (OS) from the time of diagnosis of NB. The log-rank test was performed to compare the OS probabilities between subgroups of patients. The differences between dichotomous variables were analysed by χ^2 test when samples were of sufficient size. The two-tailed *t*-test was carried out to compare the distributions of continuous variables. A two-tailed *P*-value of <0.05 was considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Of 1533 infants with elevated urinary catecholamine levels that were examined for MNA, 33 (2.2%) had tumours with MNA. Of these 33 cases, 20 had MNA values from three to nine copies of the MYCN gene (Table 1). Seventy-seven percent of cases with no MNA had early stage (stages I, II and IVs) tumours. Thirteen cases had more than 10 copies. Of these, only 30% had early stage tumours. The cases without MNA had significantly higher percentage of early stage tumours than cases with MNA over 10 copies ($P < 0.001$) (Table 2).

Treatment and survival rates in patients with MNA

All of the 13 cases with MNA of more than 10 copies received megatherapy with stem cell transplantation and radiotherapy. Six of these cases died. None of 20 cases with MNA from three to nine copies received the megatherapy with stem cell transplantation. Sixteen of the 20 cases received mild chemotherapy, and four cases received only surgical resection without chemotherapy. Only two of the 20 cases died (Table 1). Case 15 had the unresectable tumour of stage III and died of progressive disease although he had received chemotherapy. Case 30 had the resectable tumour with MYCN 3 copies by the Southern blot analysis and was not classified into the high-risk group. At 3 months after the operation, this patient had relapse with bone and bone marrow metastasis and died of progressive disease. The primary tumour was judged MYCN amplification by the FISH method that was performed after the relapse.

Outcome

Of the 2084 cases that were detected NBs by the screening programme, only 15 cases (0.7%) died within 5 years. OS was 99%. Three-year EFS was 99% for cases without MNA ($n = 1500$), 88% for cases with MNA from three to nine copies ($n = 20$), and 46% for cases with MNA over 10 copies ($n = 13$) ($P < 0.001$) (Figure 1). The 4-year OS rate was 99% for cases without MNA, 89% for cases with MNA from three to nine copies and 53% for cases with MNA over 10 copies ($P < 0.001$). In the cases with MNA over 10 copies, all of the five cases except one died of progressive disease, though they were received chemotherapy.

Characteristics of patients with and without MNA

Table 2 lists the clinical and biological characteristics of patients with and without MNA. The cases with MNA (>10 copies) were found more frequently in advanced stages (stages III and IV), than the cases without MNA (69 and 23%, respectively; $P < 0.001$). Of the cases with MNA (>10 copies), a significantly higher percentage of primary tumours was found in the adrenal glands (92%) than in those without MNA (51%; $P = 0.002$). The patients with MNA (>10 copies) had significantly higher serum levels of neuron-specific enolase (NSE) and ferritin than the patients without MNA ($P = 0.049$, $P = 0.025$, respectively). Although the patients with MNA (>10 copies) had significantly higher urinary levels of HVA than the patients without MNA ($P = 0.008$), there was no difference in urinary levels of HVA ($P = 0.985$).

Characteristics of patients with MNA

The right side of Table 2 shows clinical and biological characteristics of 33 cases with MNA more than three copies. Patients in advanced stages (stage III and IV) had significantly poorer prognoses (3-year EFS; 58.3%) than those in early stages (stage I, II and IVs) (3-year EFS; 93.3%) ($P = 0.021$). The patients with primary tumours found in the adrenal gland had significantly poorer prognoses (3-year EFS; 68%) than those with the tumours at other sites (3-year EFS; 100%) ($P = 0.021$). The group with high serum levels of NSE also had a significantly poorer prognosis than the group with low levels of NSE ($P = 0.0005$). However, urinary levels of VMA and HVA, and serum levels of ferritin, did not correlate with clinical outcomes ($P = 0.364$, 0.478 and 0.174, respectively).

DISCUSSION

It is well known that the prognosis for NB in infants is good. Indeed, the prognosis for NB detected by the Japanese MSPN was excellent, with 98% survival. Although most of the cases detected