

表2 GH 治療群と対照群の前思春期の身長 SDS を一致させたコントロールスタディー

	男子		女子	
	GH 治療群	対照群	GH 治療群	対照群
n	57	57	57	57
6 歳時または GH 治療開始時身長 SDS	-2.61 ± 0.39	-2.60 ± 0.39	-2.68 ± 0.47	-2.68 ± 0.49
成人身長 (cm)	159.8 ± 4.8	161.1 ± 5.1	147.4 ± 5.1	146.8 ± 4.4
成人身長 SDS	-1.90 ± 0.81	-1.66 ± 0.91	-2.11 ± 1.02	-2.21 ± 0.95
身長 SDS の変化	0.71 ± 0.77	0.94 ± 0.93	0.57 ± 0.85	0.47 ± 0.68

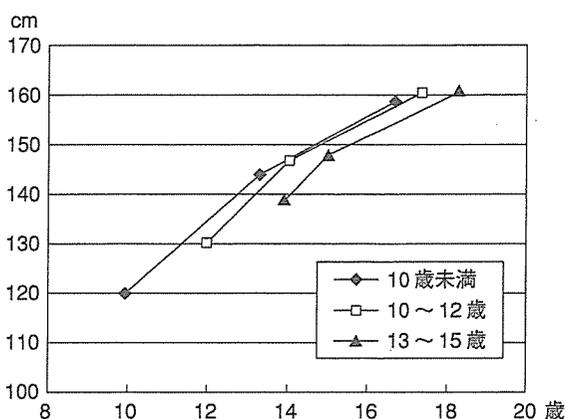


図1 治療開始年齢と思春期および成人身長

治療量を用いている限りにおいては、成人身長を改善しないと考えられた。

短期的には成長促進効果が認められるのに、成人身長に対する治療効果が認められない原因は、GH が思春期を早くするためと考えられる⁵⁾。成人身長が思春期開始時身長に強く相関があるということは、GHD、non-GHD 性低身長症において認められている。従って、成人身長を改善するためには、思春期開始時の身長を高くする必要があるが、現在の治療量では前思春期にそれだけの改善が見られない。図1は、成長科学協会のデータベースを解析したもので、男子において治療開始時が10歳未満、10~12歳、13~15歳のグループに分けそれぞれ治療開始時、思春期開始時、成人身長時の平均値をプロットした。治療開始時が早いほど思春期開始年齢が低く、思春期開始時身長が低い傾向が認められる。成人身長には、ほとんど差がみられない。GH治療が思春期を早めるということは、低い身長で思春期が始まるということで、GH治療により初期に認められた catch-up が相殺された形になり、思春期開始時身長という面からみると無治療群と差がなくなってしまうと考えられる。思春期開始から成人身長までの思春期の伸びは、我々のデータ^{6,7)}ではGH治療されたGHDも無治療のnon-GHD低身長児も差がないので、GH治療しても成人身長の改善が認められない。

2) 高用量の GH 治療が non-GHD 性低身長症において成人身長を改善するというエビデンス

表3に、海外での主な報告を示した⁸⁻¹³⁾。我が国の報告と欧米の報告と大きく異なるのは、治療量である。Leschekら¹⁰⁾は、プラセボコントロール群において、成人身長に有意な差があることを報告しており、少なくとも0.23 mg/kg/週以上の治療量であれば、成人身長に対する効果はあると考えられ、Witら¹³⁾も治療量と成人身長の改善は、用量反応性があることを述べている。

表3 欧米における non-GHD 性低身長症に対する GH 治療

	dose (mg/kg/week)	n	height SDS			AH-start
			at start	PAH	AH	
Wit 1999	0.19	53 (FSS)	-2.6		-1.9	0.7
	0.2	36 (NFSS)	-2.8		-1.3	1.5
Bernascovi 1997	0.21	71	-2.8	-1.7	-1.7	1.1
Leschek 2004	0.23	22	-2.7	-2.1	-1.77	0.93
	placebo	11	-2.8	-2.3	-2.34	0.46
Hintz 1999	0.3	57 (m)	-2.9	-2.5	-1.7	1.2
		23 (f)	-2.7	-2.6	-1.6	1.1
MaCaughey 1998	0.33	8 (f)	-2.5	-1.8	-1.1	1.4
Wit 2005	0.24	17	-3.26	-2.5	-1.69	1.55
	0.24 → 0.37	16	-3.08	-2.6	-1.48	1.5
	0.37	17	-2.88	-2.3	-1.12	1.76

FSS: 家族性低身長, NFSS: 非家族性低身長, AH: 成人身長, PAH: 予測成人身長, AH-start: 成人身長 SDS と治療開始時 SDS の差

4 本邦の患者に適用する際の注意点

我が国の高用量治療が認められていない現状では、GH 分泌能の正常な低身長児に対する GH 治療は、成人身長の改善には効果がないと結論せざるをえない。しかし、GH 治療の目的は成人身長の改善だけではなく、早期に正常身長に catch-up することによる QOL の改善にある。最終的に低く終わっても、小児期に少しでも正常身長の時期があった場合と、ずっと低いままであった場合と、QOL は異なると考えられる。この QOL に関する研究は少ないが、子宮内発育不全性低身長症の GH 治療におけるアンケートでは、低用量でも食欲の改善や低身長に対する悪口や、いじめの減少など日常生活における QOL の改善が認められている¹⁴⁾。しかし、高用量群に比べて少なく、治療効果と相関があると思われた。低身長における QOL は、調査票の確立と共に、今後の問題であり、臨床医が注意しておかなければいけない点である。

■文献■

- 1) 小松和男, 岡村敏弘, 高田五郎, 他. 前思春期低身長児または最終身長低身長者の縦

- 断的成長の解析. 第1編. 秋田県健常小児における検討. 日本小児科学会雑誌. 1997; 101: 610-6.
- 2) Kawai M, Momoi T, Yorifuji T, et al. Unfavorable effects of growth hormone therapy on the final height of boys with short stature not caused by growth hormone deficiency. *J Pediatr*. 1997; 130: 205-9.
 - 3) Kawai M, Momoi T, Yorifuji T, et al. Growth hormone treatment does not improve the final height of girls with short stature not caused by growth hormone deficiency. *Clin Pediatr Endocrinol*. 1998; 7: 93-8.
 - 4) Tanaka T, Fujieda K, Yokoya S, et al. No improvement of adult height in non-growth hormone (GH) deficient short children with GH treatment. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2006; 15: 15-21.
 - 5) Tanaka T, Yoshizawa A, Tanae A, et al. Relationships between puberty and growth at adolescence in growth-hormone-deficient males: Effect of growth hormone and of associated gonadal suppression therapy. *Horm Res*. 1990; 33 Suppl 4: 102-5.
 - 6) 田苗綾子, 堀川玲子, 日比逸郎, 他. 非内分泌性低身長小児における cyproterone acetate による最終身長改善の試み. *ホルモンと臨床*. 1998; 46 増刊 33: 13-7.
 - 7) Tanaka T. Combination treatment of GH and LHRH analog to increase pubertal growth for GHD children who enter puberty with short stature. *Clin Pediatr Endocrinol* 2005; 14 Suppl 24: 7-16.
 - 8) Wit J-M. Growth hormone treatment of idiopathic short stature in KIGS. In: Ranake MB, Wilton P, editors. *Growth hormone therapy in KIGS-10 years' experience*. Heidelberg: Johann Ambrosius Barth Verlag; 1999. p. 225-43.
 - 9) Bernasconi S, Street ME, Volta C, et al. Final height in non-growth hormone deficient children treated with growth hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997; 47: 261-6.
 - 10) Leschek EW, Rose SR, Yanovski JA, et al. Effect of growth hormone treatment on adult height in peripubertal children with idiopathic short stature: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 3138-9.
 - 11) Hints R, Attie KM, Baptista J, et al. Effect of growth hormone treatment on adult height of children with idiopathic short stature. *N Engl J Med*. 1999; 340: 502-7.
 - 12) McCaughey ES, Mulligan J, Voss LD, et al. Randomized trial of growth hormone in short normal girls. *Lancet*. 1998; 351: 940-4.
 - 13) Wit JM, Rekers-Mombarg LT, Cutler GB, et al. Growth hormone (GH) treatment to final height in children with idiopathic short stature: evidence for a dose effect. *J Pediatr*. 2005; 146: 10-1.
 - 14) Tanaka T, Matsuo N, Seino Y⁴, et al. Growth-promoting and psychological effects of high-dose growth hormone treatment in children with intrauterine growth retardation. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2000; 9: 7-17.

<田中敏章>

5

医師主導治験と企業治験

中村秀文

薬事法改正により医師主導治験が実施可能となり、治験調整医師として1件、治験事務局・治験審査委員会(Institutional Review Board ; IRB)事務局として2件の医師主導治験にかかわり、また平成18(2006)年度の実施に向けてさらに1件の治験立案にかかわっている。そこで筆者の小児治験にかかわってきた経験に基づき、医師主導治験の臨床試験実施計画書(プロトコル)と製薬企業主導治験や医師主導臨床試験のプロトコルとの違いについて、また治験審査の際の視点の違いなどについて述べてみたい。

◆◆◆医師主導治験と臨床試験◆◆◆

筆者は、基本的には、製薬企業主導治験、医師主導治験と臨床試験の間に大きな違いがあるべきものではないと考えている。わが国では、医師主導の臨床試験の質が必ずしも高くはなく、またデータマネジメントなどの品質管理も行われなかったが多かった。また、医学・薬学教育のなかで「臨床研究」についての教育がほとんど行われてこなかったために、臨床試験の考え方や方法論を十分に理解せずに、自己流で臨床試験を実施している医師も多い。このような状況のなか、わが国の医師主導の臨床試験の質は必ずしも高くないというのが現状であろう。

このような状況のなかで、新しく医師主導治験が実施可能になったものの、現場の医師の多くにはいまだに医師主導治験と、これまで行ってきた医師主導臨床試験の違いが十分に理解できていないものと想定される。確かにわが国の医薬品の臨床試験の実施の基準(Good Clinical Practice ; GCP)に関する省令

は、日米EU医薬品規制調和国際会議(The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ; ICH)-GCPと比較して、細かい規定が多すぎるとの批判はあるが、とはいえ医師主導治験に取り組むことは、質の高い臨床試験を実施するとはどういうことかを、身をもって体験し学ぶことができることを意味する。ぜひとも、リサーチマインドのある医師にはチャレンジしていただきたいと考えている。

◆◆◆医師主導治験プロトコル作成の際の留意点◆◆◆

医師主導治験では、医師が「自ら治験を実施する者」として、治験の立案、実施、解析など、すなわち通常は医師が経験することのない治験の入り口から出口に至るまでを主導して行うことになる。もちろんそのすべてを自力でできるはずもなく、多くの作業を外部機関などに委託することになる。プロトコル作成についてもメディカルライターに体裁を整えてもらったほうが、はるかに体裁の整った抜けのないプロトコルができる。

医師だけでプロトコルを作るのではなく、立案段階から生物統計家や薬物動態専門家などと相談し、さらに可能な限り早く治験コーディネーター(Clinical Research Coordinator ; CRC)などにも内容をチェックしてもらっておいたほうがよい。自主臨床試験のプロトコルと治験のプロトコルには、一般的にはその緻密さに大きな違いがあることが多い。主要評価項目をどう設定するか、その設定の妥当性は十分か、安全性評価の方法は妥

9

臨床試験プロトコル

当かなど、治験の骨格の一つひとつをとって、通常の臨床試験より細かい検討が必要である。筆者の経験でもたった1つの安全性評価項目のグレーディングを決定するためだけに2時間近い議論をしたこともある。とくにこれまでほとんど治験が実施されてこなかったような希少疾病などの領域では、評価方法の決定にはかなりの時間を費やす必要がある。国内外での過去の類似医薬品の治験や臨床試験のプロトコルが入手可能であればそれを参考にするとよいが、その際には海外での評価方法が国内でも利用可能であるか、バリデートされているかなどにも配慮が必要である。

医師主導の臨床試験と異なり、プロトコルは「作成した医師が理解できる(理解したつもりになっている?)」だけではだめで、他施設の医師やCRCなどの支援スタッフにも内容が十分に理解でき、流れが明確になっていなければ、いざ実施しても逸脱が多かったり、十分な評価ができなかったりと、問題が多発することが多い。医師主導臨床試験ではあまり気にとめないことが多いであろう、プロトコルと症例報告書(Case Report Form; CRF)の整合性のチェックも必ずやっておかなければならないし、モニタリングを実施するモニターの視点からのチェックも必要である。CRFの記載方法などが曖昧であると、あとでモニタリングの際にチェックが困難であったり、データマネージャーによるデータの処理が困難であったりする。

医師主導の臨床試験では、医師の医学的興味から仮説が立てられることも多いかもしれない。しかし、医師主導治験は「製薬企業による将来的な承認申請」を念頭において、既存の非臨床試験のデータや臨床試験・治験のデータを踏まえたうえで、どのような位置づけで医師主導治験を実施するかを十分に考えておかなければならない。医薬品の治験では、

薬物動態(吸収、分布、代謝、排泄)の情報とそれに基づく至適用量の判断も重要となる。用量設定が十分に行われていないと、十分な有効性が得られなかったり、副作用が頻発して評価を中止せざるをえなくなる可能性もでてくる。

医師主導治験を考える際には、省令GCPなど治験の前提となる法令はもちろん知っておかなければならないし、必要な支援体制も十分に考えておかなければならない。われわれの経験からすると、データマネジメント、モニタリング、統計の委託先は極力同一にしておいたほうが作業の連携が楽である。治験薬概要書などの情報提供、治験薬の提供、将来的な承認申請のことを考えると、製薬企業の開発・申請担当者とも密な連携をとるべきであることは、火を見るより明らかである。

◆ ◆ ◆ 医師主導治験で 試してみたいこと ◆ ◆ ◆

製薬企業主導の治験はある意味とても保守的である。かつてどこかの企業が申請の際に規制当局にこのような指摘をされたらしい、という過去の経験の積み重ねで、細かいところのチェックが厳しくなり、一方で新しい試みをするのはなかなか難しい。外資であれば、海外で実施されたのと同じ方法を国内にもちこむこともあるが、時に国内の臨床実態にそぐわないで、実施の際に現場が苦労することもある。

われわれ小児科の領域では希少疾病などほとんどこれまで日本で治験が実施されていない領域で、製薬企業が着手に尻込みするような治験に医師主導で取り組んでいることも多い。平成18(2006)年度には世界初のL-アルギニンのミトコンドリア脳筋症(Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episode; MELAS)の脳卒中様発作に対する適応について、その効果

と安全性の評価を行う予定である。これまで治験を実施したことのない領域では、その有効性評価方法などかなり試験的にならざるをえない。製薬企業の治験では、なかなかこのようなリスクをおかすことはできないが、医師主導治験であるからこそ試験的評価方法を試し、その方法論を将来的に製薬企業主導治験にも応用していくことができるのではないかと考えている。

医師主導治験

プロトコル概要

—クエン酸フェンタニルを例として—

筆者が治験調整医師をしているクエン酸フェンタニルの治験について、その概要を例として以下に示す。併用麻酔薬の投与量を細かく規定しすぎたなどの理由でかなり逸脱も多いが、大枠での有効性評価と安全性評価には大きな問題はないのではないかと考えている。平成17(2005)年12月に、症例登録は終了し、平成18(2006)年4月に症例検討会も終了、平成18(2006)年内の製薬企業による承認申請を目指している。

対象疾患：挿管、呼吸管理、全身麻酔のもとに、手術もしくは処置を受ける症例で、麻薬系鎮痛・鎮静薬の補助的投与が必要となる患者。硬膜外麻酔を行う患者は除く。

目的：新生児(低出生体重児を含む)から6歳以下の小児患者を対象として、クエン酸フェンタニルを全身麻酔時の鎮痛薬として使用した際の、至適投与量・有効性・作用時間の確認と、安全性の評価、また可能な限り薬物動態を検討する。さらに安全性については、年齢によって、とくに2歳以下(3歳未満)の児で3歳以上の小児に比べて大きな問題がないかの検討を行う。

治験デザイン：非対照、非盲検、多施設共同臨床試験

投与期間：術中の麻酔期間

術直後観察期間：抜管までの評価および抜管後15時間までの評価(ただし低出生体重児などで術後すぐの抜管が困難だった場合、手術室出室後15時間までの評価)

最終観察日：退院時もしくは退院後(術後3日から14日後)の調査(ただし低出生体重児などで術後すぐの抜管が困難だった場合、抜管後安定した状態での調査)

治験期間：手術前調査期：1日

治療期：手術期間のみ、原則として24時間以内

術後フォローアップ期：術後3～14日(ただし低出生体重児などで術後すぐの抜管が困難だった場合、抜管後安定した時点)

実施医療機関：多施設共同治験(大阪府立母子保健総合医療センター、北里大学病院、神戸大学医学部附属病院、国立成育医療センター、東京大学医学部附属病院、独立行政法人国立病院機構岡山医療センター)

被験者数：目標症例数：全体で120症例

- 1) 受胎後週数45週未満：全体で24症例
- 2) 受胎後週数45週以上、2歳以下(3歳未満)：全体で48症例
- 3) 3歳以上6歳以下(7歳未満)：全体で48症例

血中濃度測定症例数：

全体で1)群5症例以上、2)群10症例以上、3)群10症例以上を目標とし、可能な限り収集する。原則として投与後1時間～1時間30分の1点採血とする。検体量は全血で0.5mL程度(一回測定に血漿0.1mL必要)である。

主な組み入れ基準：

- 1) 入院患者で、挿管、呼吸管理、全身麻酔のもとに手術もしくは処置を受ける症例のうち、麻薬系鎮痛・鎮静薬の補助的投与が必要となる患者
- 2) 6歳以下(7歳未満)の症例
- 3) 同意：代諾者(保護者)から文書による承

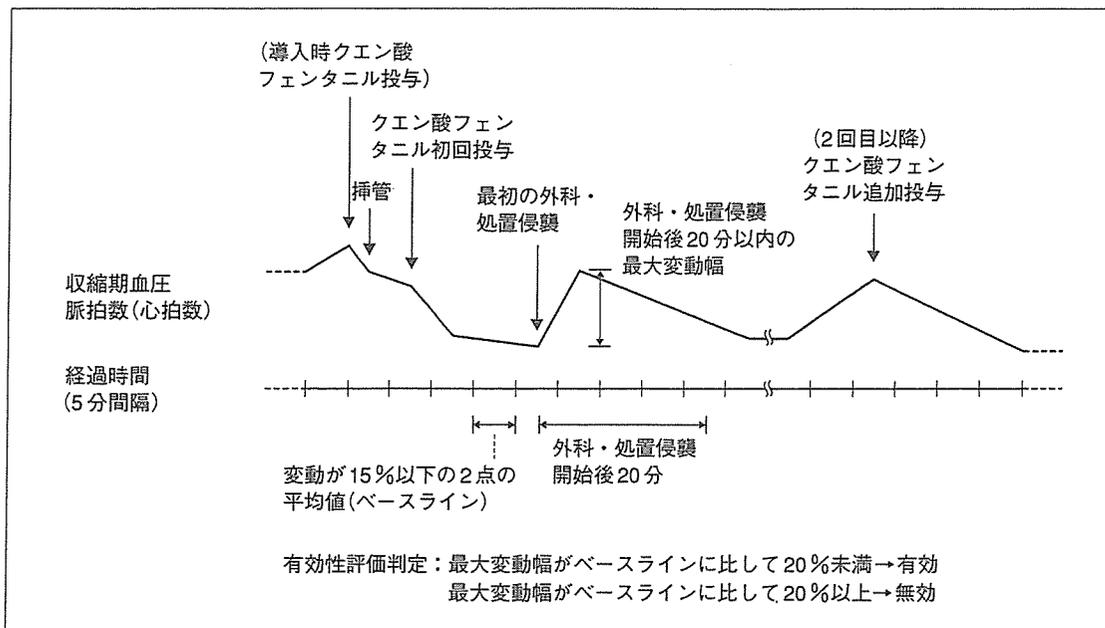


図1 模式図

諾(インフォームド・コンセント)が得られた児

治験薬の投与方法：

初回投与：本治験における初回投与は、気管内挿管後の最初のクエン酸フェンタニル投与と規定し、導入時の気管内挿管前のクエン酸フェンタニル投与は初回投与とはしない。クエン酸フェンタニルは、場合により導入時の気管内挿管の前にクエン酸フェンタニルとして0.02～0.1 mL/kg(フェンタニルとして1～5 μg/kg)を、また麻酔導入後、手術開始約10分前に導入時の投与量と合わせてクエン酸フェンタニルとして0.04～0.3 mL/kg(フェンタニルとして2～15 μg/kg)を投与する。クエン酸フェンタニルは原液をそのまま、あるいは1アンプル(2 mL)をブドウ糖液などで5～20 mLに希釈し、側管からゆっくり投与後、輸液を数 mL 流す(時間としてトータル30秒から1分かける)ことにより確実に血管内に全薬液が入るようにする。

追加投与：投与については、医師の裁量により行い、その根拠を記載する。一度の投与量はクエン酸フェンタニルとして0.02～0.2 mL/kg(フェンタニルとして1～10 μg/kg)とする。希釈および投与方法は初回投与時と同様とする。

有効性の評価項目：

主要評価項目：挿管後のクエン酸フェンタニル初回投与後の最初の外科・処置侵襲開始後20分以内の最大変動を示す収縮期血圧、脈拍数(心拍数)を指標とした医師の総合判定(有効または無効)

副次評価項目：挿管後のクエン酸フェンタニル初回投与後の最初の外科・処置侵襲開始後20分以内の最大収縮期血圧、脈拍数(心拍数)の変動率からの判定(図1)

収縮期血圧による有効率(%)

$$= (\text{クエン酸フェンタニル初回投与後の収縮期血圧平均値からの最大変動率が切り捨て} + 20\% \text{未満の症例数}) / (\text{クエン酸フェンタニル初回投与後に} 5 \pm 2 \text{分間隔で隣接する時}$$

表 1 治験スケジュール(観察・検査スケジュール)

	術前	術中	術後	
			抜管後次の日の診察 まで/手術室出室後 次の日の診察まで	最終観察日 (フォローアップ)
診察	●	○	●	●
同意取得	●	—	—	—
選択・除外基準確認	●	—	—	—
被験者背景の確認	●	—	—	—
登録	●	—	—	—
治験薬投与	—	●	—	—
併用薬・併用療法の確認	●	●	●	●
収縮期血圧	●	●	●	●
脈拍数(心拍数)	●	●	●	●
心電図	—	●	—	—
SpO ₂	—	●	—/●	—
ETCo ₂	—	●	—	—
体温	●	●	—	●
呼吸数	●	—	●/—	●
自覚症状・他覚所見	●	●	●	●
臨床検査 血液学的検査	○	—	—	○
血液生化学検査	○	—	—	○
尿検査	○	—	—	○
血中薬物濃度測定用採血 (クエン酸フェンタニル 初回投与後1~1.5hr)	—	◇	—	—

「術前」は手術室に入る前まで、「術中」は手術室に滞在している期間、「術後」は手術室を退出した時点以降とする。
 ●：必須実施事項，○：必要に応じて実施，◇：代諾者(保護者)の同意のもと，可能な限り実施

9
臨床試験プロトコル

点の収縮期血圧の変動率が切り捨て±15%以内となった症例数) × 100

クエン酸フェンタニル初回投与後の収縮期血圧平均値：挿管後，クエン酸フェンタニル初回投与後に5±2分間隔で隣接する2時点の収縮期血圧の切り捨て算術平均値

安全性の評価項目：

治験薬投与開始後から術後15時間まで：
 因果関係を否定できない有害事象(自覚症状・他覚所見などの発現または悪化，

臨床検査値異常変動)の発現頻度
 治験薬投与開始後からフォローアップまで：亜急性の有害事象(肝機能障害，腎機能障害を明らかに疑わせる所見など)
 観察・検査スケジュール：表1を参照

◆◆◆ 医師主導治験の
審査の際の留意点 ◆◆◆

製薬企業の治験では，その道のプロが半年近くをかけて入念にプロトコルを練り，社内でのIRBで承認され，さらに治験届を提出し，大きな問題点については規制当局のチェック

を受けたものが施設に提出される。その意味では、すでにかなり完成度が高いプロトコルが治験実施医師の元に届けられ、IRBの審査にかけられることになる。一方、医師主導治験では、省令GCPに準拠した治験というものに慣れていない医師が中心となってプロトコルを作成しており、しかも各参加施設のIRBで承認された後に治験届が提出されることになる。したがって、治験審査の際には、「すでに完成しているはずのもの」と安心して審査資料に目を通すのではなく、資料の隅々まで漏れがないか、またとくに治験の科学性・倫理性について問題がないか、適切に評価が可能であるかなどを検討する必要がある。

医師主導治験では、プロトコルやCRFなどの版管理なども各施設で適切に行わなければならない。版管理を厳重に行っておかないと「最新版」ではない古い版で審査が行われてしまうことなども起こりうる。さらに治験薬概要書などについても十分に目を通しておく必要がある。われわれが実際に経験した事例としては、製剤の安定性試験の結果が掲載されていないまま審査にかけられたことがあり、IRBからの指示で、安定性試験の結果を盛り込んだうえで再度諮られたことなどもある。

われわれが関与している医師主導治験は、すべて日本医師会治験促進センターからの研究費によって実施されている。しかし、それ以外の財源による医師主導治験もありうるわけであり、医師主導治験の審査においては、その財源がどうなっているか、実施者との関係はどうなっているか(実施者が利益をこうむることがありうるかなど)についても慎重に審議されるべきであろう。

また、製薬企業の治験では当たり前のように整備されているデータマネジメント、モニタリング、統計、メディカルライティング、監査、プロジェクトマネジメントなどについても、体制が整備され確実に実施されなければ、治験を円滑にすすめることは難しい。自ら治験を実施する者である治験責任医師が十分に治験の内容や実施体制を理解しており、またCRCなどによる支援体制が十分であることを入念に検討する必要がある。

医師主導治験について、そのプロトコルの臨床試験や製薬企業主導治験との違い、作成上の留意点、審査の際の留意点などについて概説した。現状では、まだ手探り状態で、その実施にかなりの困難を伴う医師主導治験であるが、医薬品開発の新しい道筋として、一刻も早く体制整備がすすむことを祈っている。

Improved Outcome in the Treatment of Pediatric Multifocal Langerhans Cell Histiocytosis

Results from the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 Protocol Study

Akira Morimoto, MD¹
 Satoshi Ikushima, MD²
 Naoko Kinugawa, MD³
 Eiichi Ishii, MD⁴
 Urara Kohdera, MD⁵
 Masahiro Sako, MD⁶
 Junichiro Fujimoto, MD⁷
 Fumio Bessho, MD⁸
 Keizo Horibe, MD⁹
 Yukiko Tsunematsu, MD¹⁰
 Shinsaku Imashuku, MD¹¹
 for the Japan Langerhans Cell
 Histiocytosis Study Group

¹ Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto, Japan.

² Division of Pediatrics, Saiseikai Kyoto-fu Hospital, Kyoto, Japan.

³ Department of Pediatrics, Showa University School of Medicine, Tokyo, Japan.

⁴ Department of Pediatrics, Saga University, Saga, Japan.

⁵ Division of Pediatrics, Nakano Children's Hospital, Osaka, Japan.

⁶ Division of Pediatrics, Osaka General Medical Center, Osaka, Japan.

⁷ Division of Developmental Biology and Pathology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan.

⁸ Department of Pediatrics, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan.

⁹ Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan.

¹⁰ Department of Strategic Medicine, Division of Pediatric Oncology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan.

¹¹ Division of Pediatrics, Takasago-Seibu Hospital, Takasago, Japan

BACKGROUND. The treatment outcome of multifocal childhood Langerhans cell histiocytosis (LCH) has not been satisfactory and has resulted in poor therapeutic responses with high mortality and a high incidence of reactivation with late sequelae. To overcome these issues, the Japan LCH Study Group-96 (JLSG-96) protocol was conducted prospectively from 1996 to 2001 in Japan.

METHODS. Newly diagnosed children with multifocal LCH were classified into 2 groups: a single-system multisite (SS-m) group and a multisystem (MS) group. All patients initially were treated on Protocol A, which consisted of 6 weeks of induction therapy with combined cytosine arabinoside, vincristine (VCR), and prednisolone (PSL) followed by 6 months of maintenance therapy. Patients who had a poor response to the induction of Protocol A were switched to a salvage regimen (Protocol B), which consisted of an intensive combination of doxorubicin, cyclophosphamide, VCR, and PSL.

RESULTS. In total, 91 patients were treated, including 32 patients in the SS-m group and 59 patients in the MS group. At the median 5-year follow-up, 96.9% of patients in the SS-m group and 78.0% of patients in the MS group had good response status. Diabetes insipidus developed in 3.1% of patients in the SS-m group and in 8.9% of patients in the MS group. The overall survival rate at 5 years for the SS-m and MS groups was 100% and 94.4% \pm 3.2%, respectively.

CONCLUSIONS. The JLSG-96 protocol attained very low mortality for pediatric patients with multifocal LCH. *Cancer* 2006;107:613-9.

© 2006 American Cancer Society.

KEYWORDS: Langerhans cell histiocytosis, chemotherapy, reactivation, mortality.

Langerhans cell histiocytosis (LCH) occurs primarily in childhood and is a rare clonal disorder of Langerhans cell proliferation, which is among the antigen-presenting cells that originate in bone marrow.¹ LCH develops as unifocal lesions (28%) or multifocal lesions (72%) at various sites, such as bone, skin, lymph nodes, liver/spleen, thymus, central nervous system (CNS), etc.² Multifocal

The authors thank the many physicians who participated in the Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 study, Professor Tohru Sugimoto for promoting their research activities, and Yasuko Hashimoto for her excellent secretarial assistance.

Address for reprints: Akira Morimoto, MD, Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural

University of Medicine, Graduate School of Medical Science, 465, Kajii-cho, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan; Fax: (011) 81 752521399; E-mail: akira@koto.kpu-m.ac.jp

Received January 12, 2006; revision received February 27, 2006; accepted March 2, 2006.

LCH lesions occur as a single-system multisite (SS-m) type or as a multisystem (MS) type.

LCH can be managed by observation or local therapy in patients who have unifocal LCH with generally excellent outcomes; however, systemic chemotherapy is required for patients who have multifocal LCH lesions, which includes corticosteroids, vinblastine (VBL), vincristine (VCR), etoposide (VP-16), 6-mercaptopurine (6-MP), methotrexate (MTX), cytosine arabinoside (Ara-C), or a combination of these drugs.³ In the literature, 5 reports are available that deal with therapeutic trials (treatment studies) in >50 patients with LCH who had multifocal disease.⁴ In those studies, the median survival rate was 80% (range, from 71% to 93%),⁵⁻⁹ and the median survival rate among patients who had organ dysfunction was especially low (from 34% to 62%) in 3 early reports.⁵⁻⁷ Furthermore, a retrospective epidemiologic survey that was performed in Japan from 1986 to 1990² revealed that nearly 20% of patients with multifocal LCH died. These results clearly indicate the need for better clinical trials. However, the optimal drug treatment combination and the optimum length of the treatment remain to be determined. In particular, low induction rates and high recurrence rates after initial treatment are associated with a poor prognosis in patients with multifocal LCH.^{8,9} In addition, late sequelae, such as diabetes insipidus (DI), orthopedic complications, CNS disorders, or secondary leukemia associated with VP-16, also become major problems during or after systemic chemotherapy.¹⁰⁻¹²

To overcome these unfavorable and unsatisfactory treatment results in pediatric patients with multifocal LCH, the Japan LCH Study Group (JLSG) conducted a prospective, multicenter cooperative protocol (JLSG-96) for these patients in Japan. The protocol confirmed that the outcome of pediatric patients with multifocal LCH can be improved by treatment with multidrug, intensified chemotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Patients

In total, 96 Japanese children of age <15 years with newly diagnosed, multifocal LCH were registered consecutively for treatment on the JLSG-96 protocol between 1996 and 2001. Diagnoses were confirmed by histopathologic findings in affected organs, which were positive for either S-100, or CD1a antigen, or both. The patients were divided into 2 an SS-m group and an MS group. The SS-m type was defined as multiple affected lesions in only a single organ, and the MS type was defined as multiple affected lesions in several organs. Bone lesion(s) accompanied by adja-

TABLE 1
Patient Characteristics

Characteristic	SS-m group	MS group
No. of patients	32	59
Male:female ratio	15:17	30:29
Age at diagnosis, y		
Median	2.3	0.9
Range	0.3-11	0-15
Follow-up, y		
Median	5.2	5.0
Range	2.9-8.4	2.8-8.1
Involved organs (no. of patients)		
Skin	1	48
Bone	29	39
Hematopoietic system*	0	27
Liver/spleen*	0	23
Lymph nodes	2	21
Lungs*	0	16
Thymus	0	6
Pituitary stalk	0	3
No. of patients with risk organ involvement (%)	0	41 (69.5)

SS-m indicates single-system multisite lesions; MS, multisystem lesions.

* Risk organ involvement was defined as follows: for the liver/spleen, hepatomegaly or splenomegaly judged on clinical findings (≥ 3 cm under the costal margin) with or without functional impairment; for the lungs, the presence of characteristic findings on a chest computed tomography (CT) scan with or without respiratory symptoms; and, for the hematopoietic system, the presence of cytopenia in the peripheral blood (as defined by Lahey¹³) with or without bone marrow changes.

cent soft tissue were defined as a single organ. Risk organ involvement was defined as follows: for the liver/spleen, hepatomegaly or splenomegaly judged on clinical findings (≥ 3 cm under the costal margin) with or without functional impairment; for the lungs, the presence of characteristic findings on a chest computed tomography (CT) scan with or without respiratory symptoms; and, for the hematopoietic system, the presence of cytopenia in the peripheral blood (as defined by Lahey¹³) with or without bone marrow changes.

Of 96 registered patients, 5 patients were excluded because of protocol violations (2 patients), misdiagnosis (1 patient), missing follow-up data (1 patient), or death before the initiation of treatment (1 patient); thus, 91 patients were eligible for the study, including 32 patients with SS-m type lesions (SS-m group) and 59 patients with MS type lesions (MS group). Characteristics of these 91 patients are shown in Table 1. The median age at diagnosis was 2.3 years in the SS-m group and 10 months in the MS group. In the SS-m group, 29 patients (93.5%) had bone lesions, 2 patients had lymph node lesions, and 1 patient had skin lesions. In the MS group, skin was the most commonly involved organ in 48 patients (81.4%), followed by bone in 39 patients (66.1%). Three patients (5.1%) had DI at diagnosis. Two-thirds of patients (69.5%) in the MS

TABLE 2
Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 Protocol

Protocol A (induction and maintenance therapy for newly diagnosed patients)

Induction Arm A

Ara-C, VCR, and PSL (AraVP)

Ara-C (100 mg/m² per day as a 6-h drip) on Days 1-5

VCR (0.05mg/kg per day IV) on Day1

PSL (2 mg/kg per day orally) on Days 1-5

Every 2 wk × 3 courses

Maintenance Arm A

a) AraVP

Ara-C (150 mg/m² per d as a 2-h drip) on Day 1

VCR (0.05mg/kg per d IV) on Day1

PSL (2 mg/kg per d orally) on Days 1-4

b) MTX and PSL

MTX (1 mg/kg per d IV) on Day1

PSL (2 mg/kg per d orally) on Days 1-3

Alternate every 2 wk (a,b,a,b) for 6 mo

Protocol B (salvage therapy for poor responders to Induction Arm A)

Induction Arm B

ADR, CPM, VCR, and PSL

ADR (35 mg/m² per d IV) on Day 1

CPM (10 mg/kg per d IV) on Days 1-5

VCR (0.05 mg/kg per d IV) on Day 1

PSL (2 mg/kg per d orally) on Days 1-5

Every 2 wk × 3 courses

Maintenance Arm B

a) ADR, VCR, and PSL

ADR (35 mg/m² per d IV) on Day 1

VCR (0.05 mg/kg per d IV) on Day1

PSL (2 mg/kg per d orally) on Days 1-5

b) MTX and PSL

MTX (3 mg/kg per d as a 1-h drip) on Day1

PSL (2 mg/kg per d orally) on Days 1-3

c) CPM, VCR, and PSL

CPM (10 mg/kg per d IV) on Day 1

VCR (0.05 mg/kg per d IV) on Day1

PSL (2 mg/kg per d orally) on Days 1-5

Alternate every 2 wk (a,b,c,b,a,b,c,b) for 6 mo

Ara-C indicates cytosine arabinoside; VCR, vincristine; PSL, prednisolone; IV, intravenous; MTX, methotrexate; ADR, doxorubicin; CPM, cyclophosphamide.

group had risk organ involvement. The patients were followed for a median of 5 years (range, 2.8–8.4 years).

Treatment Protocols

All patients were treated initially on Induction Arm A, which consisted of a 6-week treatment with combined Ara-C, VCR, and prednisolone (PSL) followed by 6 months on the Maintenance Arm A regimen (combined Ara-C, VCR, PSL, MTX, and PSL) for a total treatment duration of 30 weeks (Table 2). The patients who demonstrated a poor response in Induction Arm A were switched to a salvage regimen, Induction Arm B, which consisted of a 6-week, intensive combination of combined doxorubicin (ADR), cyclophosphamide (CPM), VCR, and PSL followed by 6 months on the Maintenance Arm B regimen (alternating between

combined ADR, VCR, PSL, combined MTX, PSL and combined CPM, VCR, PSL every 2 weeks). For patients who were switched to Arm B, the total duration of therapy was 36 weeks, and the cumulative dose of ADR was set at 210 mg/m².

Evaluation Criteria

Treatment response was evaluated 6 weeks after the start of induction therapy in all patients. A good response (GR) at the 6-week evaluation was defined as the disappearance of signs or symptoms of disease except for radiologic findings of bone lesions (because the complete resolution of bone lesions at this point is not possible), a partial response (PR) was defined as regression >50% of signs or symptoms of disease without organ dysfunction and new lesions, a non-response (NR) was defined as regression <50% of signs or symptoms of disease with or without organ dysfunction and the absence of new lesions, and progressive disease (PD) was defined as progression in the signs or symptoms of disease and/or the appearance of new lesions. A GR and a PR to the Induction Arm A regimen were considered responses, and a NR and a PD were considered poor responses. A physician-in-chief at each institute evaluated the treatment response according to the protocol definition. However, when the evaluator had difficulty, the chairman of the study center (S.I.) was consulted to make a final determination. Reactivation was defined as the appearance of new lesions or enlargement of old lesions. At the end of Maintenance Arm A or Arm B therapy, patients were classified with an insufficient response if they did not obtain a GR. Events were defined at the time points of poor response to induction therapy, insufficient response, reactivation, secondary malignancy, and death.

Statistical Analyses

Event-free survival (EFS) and overall survival (OS) were estimated by using Kaplan–Meier analysis, with the results presented as rates (%) ± standard error, and risk factors were compared by using the log-rank test. To compare prognoses between patients with or without risk organ involvement, the Fisher exact test was employed. *P* < .05 was considered statistically significant.

RESULTS

Treatment outcomes for patients in the SS-m group are shown in Figure 1. A GR was obtained with the Induction Arm A regimen in all but 1 patient (96.9%). This exceptional patient, who had NR, attained a GR with the Induction Arm B regimen. Two patients had reactivation during Maintenance Arm A treatment,

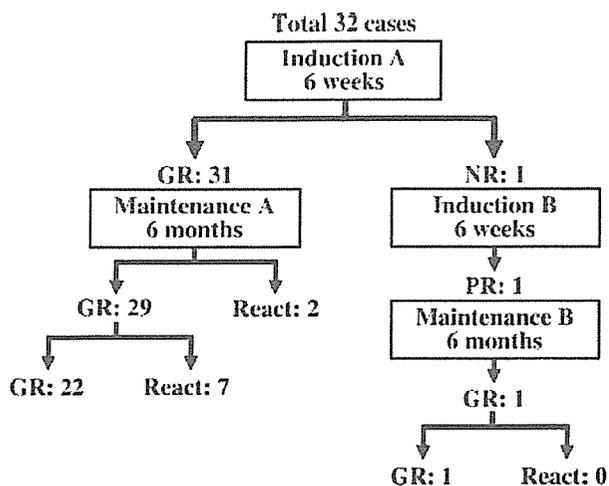


FIGURE 1. Treatment outcomes are illustrated for pediatric patients with single-system, multisite Langerhans cell histiocytosis. React indicates reactivation; GR, good response; NR, nonresponse; PR, partial response.

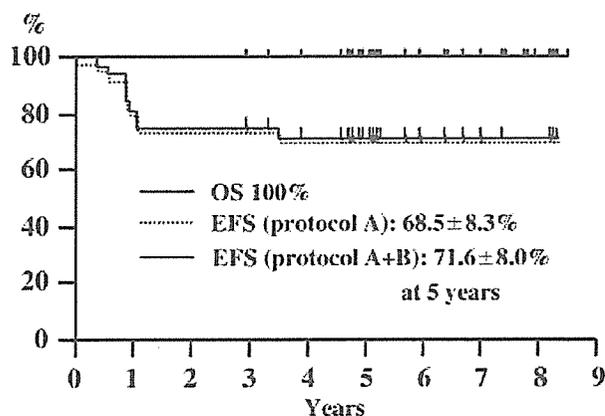


FIGURE 2. Survival is illustrated for 32 pediatric patients with single-system, multisite Langerhans cell histiocytosis. OS indicates overall survival; EFS, event-free survival.

and 7 patients had reactivation off therapy. The 5-year OS rate was 100%, and the 5-year EFS rate was 68.5% ± 8.3% in patients who received the Arm A protocol alone and 71.6% ± 8.0% in patients who received the Arm A and Arm B protocols combined (Fig. 2).

Treatment outcomes for patients in the MS group are shown in Figure 3. Forty-five of 59 patients (76.3%) had a GR/PR with the Induction Arm A regimen. Among those 45 patients, 8 patients were switched to other treatment regimens at the end of or before the completion of Maintenance Arm A treatment because of reactivation or insufficient response, whereas 37 patients (62.7%) attained a GR at the end of Maintenance Arm A treatment. Finally, 17 patients (28.8%)

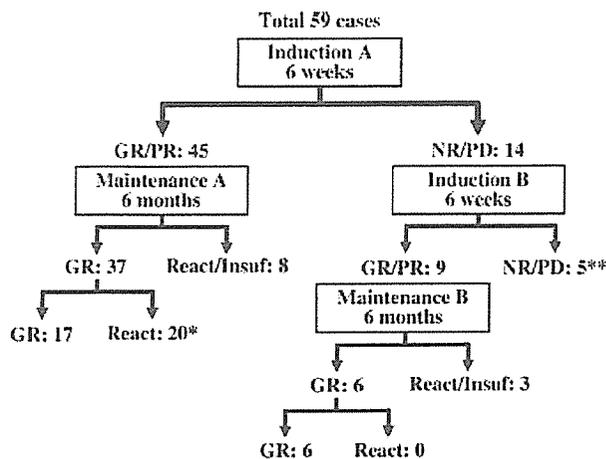


FIGURE 3. Treatment outcomes are illustrated for pediatric patients with multisystem Langerhans cell histiocytosis. React indicates reactivation; Insuf, insufficient response; GR, good response; PR, partial response; NR, nonresponse; PD, progressive disease. A single asterisk indicates that 1 patient died of LCH, and double asterisks indicate that 2 patients died of LCH.

maintained a GR, whereas the remaining 20 patients had reactivation off therapy. Among those 20 patients, the time from the initiation of treatment to first reactivation ranged from 9 months to 30 months (median, 13 months), the number of reactivations ranged from 1 to 4 (median, 1.5 reactivations), and the most frequently reactivated organ was bone (55%), followed by skin (45%), and pituitary gland (25%). The Induction Arm B regimen was employed as treatment for the majority of these patients. Table 3 shows that, in 14 poor responders to the Induction Arm A regimen, 9 patients (64.3%) subsequently had a GR/PR to the Induction Arm B regimen. Among those 9 patients, 3 patients had reactivation or insufficient response during Maintenance Arm B, and 6 patients attained and maintained a GR. Of the 5 patients who did not respond even to the Induction Arm B regimen, 2 patients were rescued with cord blood stem cell transplantation, and 3 patients received treatment with alternative combination chemotherapy, including 1 patient who was rescued and 2 patients who died of disease. Taken together, a GR at any point of the clinical course was documented in 53 patients (89.8%) in the MS group. Among those 53 patients, 24 patients (45.3%) experienced ≥1 episode of reactivation. The 5-year OS rate was 94.4% ± 3.2%, and the 5-year EFS rate was 28.8% ± 5.9% in patients who received the Arm A protocol alone and 39.0% ± 6.3% in patients who received the Arm A and Arm B protocols combined (Fig. 4). In patients who had risk organ involvement, the initial response rate to Induction Arm A and the incidence of attaining a GR were low compared

TABLE 3
Characteristics and Outcomes of Poor Responders to Induction Arm A

Patient no.	Age, Years	Involved organs*	Response to induction B	Response to maintenance B	Further treatment and response	Outcome and survival, months
117	0.4	S, LN, <u>L/S</u> , <u>Lu</u> , <u>H</u>	PD	—	VBL/VP-16/PSL (PD)	D (5)
64	0.8	<u>L/S</u> , <u>H</u>	PD	—	CBSCT (GR)	A (≥66)
49	1.1	S, B, LN, <u>L/S</u> , <u>H</u>	NR	—	CSA/ADR/CPM/VCR/PSL (PD)	D (8)
46	0.3	S, <u>Lu</u>	NR	—	VBL/ADR/VP-16/PSL (GR)	A (≥77)
116	0.5	S, B, LN, T, <u>L/S</u> , <u>Lu</u> , <u>H</u>	NR	—	CBSCT (GR)	A (≥41)
70	0.8	S, B, <u>H</u>	PR	Insuf	VBL/MTX/6MP/PSL (PR)	A (≥64)
90	5.2	T, <u>Lu</u>	PR	React	VBL/MTX/6MP/PSL (PR)	A (≥59)
93	2.0	S, <u>L/S</u> , <u>H</u>	PR	React	VBL/MTX/6MP/PSL (GR)	A (≥64)
45	0.3	S, B, LN, <u>Lu</u>	PR	GR	—	A (≥77)
91	0.3	S, B, <u>Lu</u>	PR	GR	—	A (≥61)
51	0.7	S, B, LN, <u>L/S</u> , <u>H</u>	GR	GR	—	A (≥74)
107	15.0	B, LN	GR	GR	—	A (≥45)
122	2.3	S, B, <u>Lu</u> , <u>H</u>	GR	GR	—	A (≥38)
126	2.2	S, B, <u>Lu</u> , <u>H</u>	GR	GR	—	A (≥37)

S, skin; LN, lymph node; L/S, liver/spleen; Lu, lung; H, hematopoietic system; PD, progressive disease; VBL, vinblastine; VP16, etoposide; PSL, prednisolone; D, died; CBSCT, cord blood hematopoietic stem cell transplantation; GR, good response; A, alive; NR, nonresponse; CSA, cyclosporine A; ADR, doxorubicin; CPM, cyclophosphamide; VCR, vincristine; B, bone; T, thymus; PR, partial response; Insuf, insufficient response; MTX, methotrexate; 6MP, 6-mercaptopurine; React, reactivation.

* Underlines indicate risk organs.

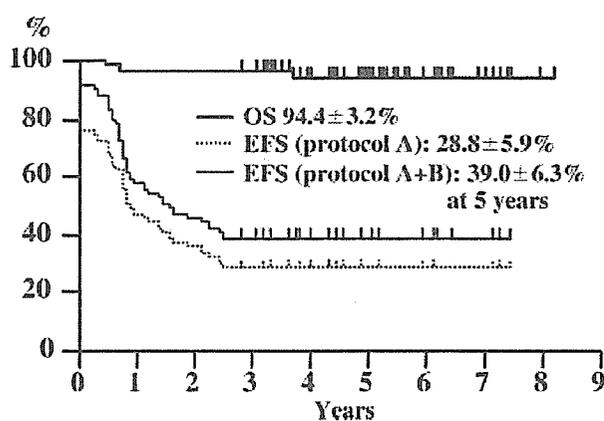


FIGURE 4. Survival is illustrated for 59 pediatric patients with multisystem Langerhans cell histiocytosis. OS indicates overall survival; EFS, event-free survival.

with patients who did not have risk organ involvement (response to Induction Arm A: 28 of 41 patients vs. 17 of 18 patients, respectively; $P = .044$; GR: 35 of 41 patients vs. 18 of 18 patients, respectively; $P = .16$). However, the 5-year OS rate and the incidence of reactivation or DI were similar between the patients with and without risk organ involvement ($91.6\% \pm 4.7\%$ vs. 100% , respectively; 14 of 35 patients vs. 10 of 18 patients, respectively, and 3 of 41 patients vs. 3 of 18 patients, respectively), whereas 5-year OS rate was relatively better for responders than for poor responders to the Induction Arm A regimen ($97.1\% \pm 2.9\%$ vs. $85.7\% \pm 9.4\%$, respectively; $P = .065$).

In the current study, no patients developed serious treatment-related toxicity that required discontinuation of the protocol, and no patients developed secondary malignancies. At the last follow-up, 31 of 32 patients in the SS-m group (96.9%) were classified with a GR, and the remaining patient was classified with stable but active disease off therapy. Conversely, 46 of 59 patients in the MS group (78.0%) were classified with a GR, 10 patients (16.9%) were classified with stable but active disease (3 patients on therapy and 7 patients off therapy), and the remaining 3 patients (5.1%) died of progressive disease. Two of those deaths occurred in patients who were poor responders to the Induction Arm A regimen (see Table 3, Patients 117 and 49). The remaining patient, who was age 8 months and had hematologic involvement at onset, initially had a GR to the Induction Arm A regimen and then had reactivation to bone 2.4 years after onset. Although he was treated with the Induction Arm B regimen, he died of multiple organ failure in association with subsequent hematologic and hepatic involvement. DI developed as long-term sequelae after diagnosis in 1 patient (3.1%) in the SS-m group and in 5 patients (8.9%) in the MS group. In total, DI was noted in 9 of 91 patients (9.9%), including 1 patient in the SS-m group and 8 patients in the MS group. Degenerative CNS disease developed in 3 patients, including 1 patient in the SS-m group and 2 patients in the MS group. Details on these patients were published previously.¹⁴

DISCUSSION

Our therapeutic results appear to be comparable to those from 2 protocol studies in pediatric patients with LCH that were published previously: the Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Leukaemieforschung Histiocytosis X (DAL-HX)-83/90 protocol study and the LCH-I protocol study. The former was a nonrandomized protocol in which patients who had single-system and multisystem LCH received combined VBL, VP-16, and PSL for 12 months,^{8,15} and the latter was a 6-month randomized study in patients who had multisystem LCH that compared the efficacy of VBL and VP-16.⁹ The intensity of the induction therapy regimen was greater in the DAL-HX study than in the LCH-I study. To our knowledge, the JLSG-96 study is the first prospective, nonrandomized clinical trial in Japan for pediatric patients with multifocal LCH. This trial consisted 7.5 months of treatment on an induction regimen of combined Ara-C, VCR, and PSL, which was used previously in a Dutch study,¹⁶ in association with a combination of ADR, CPM, VCR, and PSL as the salvage regimen. We chose these drug combinations, because we expected to obtain better response rates by avoiding VP-16, which is associated with a potential leukemogenic adverse effect. The disease extent categories and response criteria that were used for analysis in the current study were almost identical to those used in the 2 studies described above.^{8,9}

The outcomes of our patients in the SS-m who were treated on the JLSG-96 protocol were comparable to the results achieved in the DAL-HX study (Table 4).¹⁵ The initial response rates and the incidence of developing DI after diagnosis were similar in both studies. None of the patients who had multifocal bone disease died. However, the reactivation rates were relatively higher in our JLSG-96 study than in the DAL-HX study (28.1% vs. 17.6%, respectively), which may be associated with the shorter treatment duration in our study (7.5 months vs. 12 months, respectively). In our study, 7 of 29 patients (24.1%) had reactivations, mostly occurring within 6 months off therapy (Fig. 2). Because of the high reactivation rates, our most recent protocol (JLSG-02) employs a longer treatment duration of 1 year.

Conversely, the outcomes among patients in our MS group who were treated on JLSG-96 were comparable with both the DAL-HX study⁸ and the LCH-I study⁹ (Table 4). The rates of initial response and a GR status at last follow-up in our study were as high as those rates in the DAL-HX study but were better than those rates in the LCH-I study. The incidence of developing DI after diagnosis was approximately 10% in all 3 studies. However, the mortality rate (5.1%) was significantly lower in our study compared with

TABLE 4
Comparison of Treatment Results for Pediatric Patients with Langerhans Cell Histiocytosis

Variable	SS-m group		MS group		
	DAL-HX*	JLSG-96	DAL-HX	LCH-I	JLSG-96
No. of patients	34	32	63	143	59
Median age at diagnosis, y	3.9	2.3	0.9	1.5	0.9
Duration of therapy, mo	12	7.5	12	6	7.5
Initial response rate (%) [†]	94.1	96.9	79.4	53.1	76.3
Reactivation after CR (%) [‡]	17.6	28.1	30.0	50.0	45.3
Status at last follow-up (%)					
CR [‡]	ND	96.9	79.4	54.5	78.0
Non-CR	ND	3.1	1.6	25.2	16.9
Deaths	0	0	19.0	20.2	5.1
Survival (%)					
Responders	—	—	94.0	93.4	97.1
Others	—	—	30.8	64.2	85.7
Developed DI after diagnosis (%)	2.9	3.1	11.9	14.2	8.9
Secondary malignancy (%)	0	0	0	1.4	0
Follow-up (median years)	8.7	5.2	7.5	4.9	5.0

SS-m indicates single-system multisite lesions; MS, multisystem lesions; DAL-HX, German-Austrian Langerhans Cell Histiocytosis X Study; JLSG-96, Japan Langerhans Cell Histiocytosis Study Group-96 Protocol; LCH-I, Langerhans Cell Histiocytosis Study I; CR, complete response; ND, not described; DI, diabetes insipidus.

* Patients with multifocal bone disease were extracted.

[†] Evaluation at 6 weeks of initial therapy.

[‡] A CR was defined as no active disease in the DAL-HX and LCH-I studies and as a good response in the JLSG-96 study.

the rates in the DAL-HX and the LCH-I studies (approximately 20%), which were similar to the historic Japanese data.²

The lower mortality rate in our study cannot be explained by a greater proportion of low-risk patients, because the majority of patients in our study were younger (median age, 0.9 years) than patients in the other studies and had risk organ involvement. When the outcomes of patients who had risk organ involvement were analyzed, initial response rates to Induction Arm A and the incidence of attaining a GR were low, but the survival rate was similar to that of the patients without risk organ involvement, indicating that these high-risk patients subsequently were rescued by salvage therapy in our study.

Response to the initial 6 weeks of therapy reportedly is an important indicator of survival,^{9,17} and >90% of responders by 6 weeks survived in all 3 studies, whereas most of the patients who died were poor

responders at 6 weeks (9 of 12 patients in the DAL-HX study, 24 of 29 patients in the LCH-1 study, and 2 of 3 patients in the current JLSG-96 study). Increasing the response rate at the induction of treatment and the prompt rescue of poor responders to initial therapy are imperative to improve therapeutic results for pediatric patients with multifocal LCH. We applied our Arm B protocol—a salvage regimen—for such poor responders. This rescue protocol resulted in the survival of 12 of 14 poor responders (85.7%) in our JLSG-96 study. In contrast, 30.8% and 64.2% of poor responders survived in the DAL-HX and LCH-1 studies, respectively. Thus, our very low mortality rates appear to result at least in part from the high response rates to the Induction Arm A regimen and the high rescue rates with the Arm B regimen.

Some aspects of our the current results were unsatisfactory, namely, the low EFS rate (<40%) and the high reactivation rate (45.3%) in the MS group. To improve the quality of life for pediatric patients with LCH, we have modified our treatment protocol. Our ongoing protocol (JLSG-02) has been revised as follows; first, we have increased the initial dosage of PSL (2 mg/kg per day continuously for 4 weeks) from that in the JLSG-96 protocol (2 mg/kg per day for 5 days every 2 weeks); second, we added cyclosporine A to the Arm B Induction regimen for patients with PD; and third, we extended the treatment duration from 7.5 months to 1 year. Because rescuing patients with PD who have MS-type LCH is crucial for improving their survival rate, experimental trials that include more aggressive therapy, such as combination chemotherapy with 2-chlorodeoxyadenosine and high-dose Ara-C¹⁸ or hematopoietic stem cell transplantation with myeloablative or reduced intensity conditionings,^{19,20} must be carried out carefully. These therapies should be incorporated into future protocols for patients with refractory and progressive LCH in well designed, large-scale clinical studies.

REFERENCES

- Laman JD, Leenen PJ, Annels NE, Hogendoorn PC, Egeler RM. Langerhans-cell histiocytosis 'insight into DC biology.' *Trends Immunol.* 2003;24:190–196.
- Imashuku S, Ikushima S, Hibi S, Todo S. Langerhans cell histiocytosis and hemophagocytic syndrome in Japan; epidemiological studies. *Int J Pediatr Hematol Oncol.* 1994;1:241–246.
- Gadner H, Ladisch S. The treatment of Langerhans cell histiocytosis. In: Weitzman S, Egeler RM, editors. *Histiocytic Disorders of Children and Adults; Basic Science, Clinical Features and Therapy.* Cambridge: Cambridge University Press; 2005:229–253.
- Donadieu J, Egeler RM, Pritchard J. Langerhans cell histiocytosis: a clinical update. In: Weitzman S, Egeler RM, editors. *Histiocytic Disorders of Children and Adults; Basic Science, Clinical Features and Therapy.* Cambridge: Cambridge University Press; 2005:95–129.
- Lahey ME. Histiocytosis X—comparison of three treatment regimens. *J Pediatr.* 1975;87:179–183.
- Ceci A, de Terlizzi M, Colella R, et al. Langerhans cell histiocytosis in childhood: results from the Italian Cooperative AIEOP-CNR-H.X '83 study. *Med Pediatr Oncol.* 1993;21:259–264.
- Gadner H, Heitger A, Grois N, Gatterer-Menz I, Ladisch S. Treatment strategy for disseminated Langerhans cell histiocytosis. DAL HX-83 Study Group. *Med Pediatr Oncol.* 1994;23:72–80.
- Minkov M, Grois N, Heitger A, Potschger U, Westermeier T, Gadner H. Treatment of multisystem Langerhans cell histiocytosis. Results of the DAL-HX 83 and DAL-HX 90 studies. DAL-HX Study Group. *Klin Padiatr.* 2000;212:139–144.
- Gadner H, Grois N, Arico M, et al., Histiocyte Society. A randomized trial of treatment for multisystem Langerhans' cell histiocytosis. *J Pediatr.* 2001;138:728–734.
- Haupt R, Nanduri V, Calevo MG, et al. Permanent consequences in Langerhans cell histiocytosis patients: a pilot study from the Histiocyte Society-Late Effects Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2004;42:438–444.
- Grois N, Prayer D, Prosch H, Lassmann H, CNS LCH Cooperative Group. Neuropathology of CNS disease in Langerhans cell histiocytosis. *Brain.* 2005;128(Pt 4):829–838.
- Egeler RM, Neglia JP, Arico M, et al. The relation of Langerhans cell histiocytosis to acute leukemia, lymphomas, and other solid tumors. The LCH-Malignancy Study Group of the Histiocyte Society. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1998;12:369–378.
- Lahey E. Histiocytosis X—an analysis of prognostic factors. *J Pediatr.* 1975;87:184–189.
- Imashuku S, Ishida S, Koike K, et al., Japan LCH Study Group. Cerebellar ataxia in pediatric patients with Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004;26:735–739.
- Titgemeyer C, Grois N, Minkov M, Flucher-Wolfram B, Gatterer-Menz I, Gadner H. Pattern and course of single-system disease in Langerhans cell histiocytosis data from the DAL-HX 83- and 90-study. *Med Pediatr Oncol.* 2001;37:108–114.
- Egeler RM, de Kraker J, Voute PA. Cytosine-araboside, vincristine, and prednisolone in the treatment of children with disseminated Langerhans cell histiocytosis with organ dysfunction: experience at a single institution. *Med Pediatr Oncol.* 1993;21:265–270.
- Minkov M, Grois N, Heitger A, Potschger U, Westermeier T, Gadner H, DAL-HX Study Group. Response to initial treatment of multisystem Langerhans cell histiocytosis: an important prognostic indicator. *Med Pediatr Oncol.* 2002;39:581–585.
- Bernard F, Thomas C, Bertrand Y, et al. Multi-centre pilot study of 2-chlorodeoxyadenosine and cytosine arabinoside combined chemotherapy in refractory Langerhans cell histiocytosis with haematological dysfunction. *Eur J Cancer.* 2005;41:2682–2689.
- Suminoe A, Matsuzaki A, Hattori H, Ishii S, Hara T. Unrelated cord blood transplantation for an infant with chemotherapy-resistant progressive Langerhans cell histiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2001;23:633–636.
- Steiner M, Matthes-Martin S, Attarbaschi A, et al. Improved outcome of treatment-resistant high-risk Langerhans cell histiocytosis after allogeneic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36:215–225.

4カラーデジタルフローサイトメーターを用いた
小児白血病マーカー中央診断の試み

塩沢裕介, 北村紀子, 竹野内寿美, 田口智子
大喜多肇, 林 泰秀, 小原 明, 花田良二
土田昌宏, 藤本純一郎, 清河信敬

CYTOMETRY RESEARCH

Vol.16-2 (Sep, 2006) 別刷

原 著

4カラーデジタルフローサイトメーターを用いた 小児白血病マーカー中央診断の試み

塩沢裕介^{1,2,3)}, 北村紀子^{1,2)}, 竹野内寿美^{1,2)}, 田口智子^{1,2)}
 大喜多肇¹⁾, 林 泰秀^{4,5)}, 小原 明^{4,6)}, 花田良二^{4,7)}
 土田昌宏^{4,8)}, 藤本純一郎^{1,4)}, 清河信敬^{1,2)}

A trial of central diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia with 4-color digital flow cytometer

Yusuke Shiozawa M.D., Ph.D.^{1,2,3)}, Noriko Kitamura Ph.D.^{1,2)}, Hisami Takenouchi Ph.D.^{1,2)},
 Tomoko Taguchi M.D., Ph.D.^{1,2)}, Hajime Okita M.D., Ph.D.¹⁾, Yasuhide Hayashi M.D., Ph.D.^{4,5)},
 Akira Ohara M.D., Ph.D.^{4,6)}, Ryoji Hanada M.D., Ph.D.^{4,7)}, Masahiro Tuchida M.D., Ph.D.^{4,8)},
 Junichiro Fujimoto M.D., Ph.D.^{1,4)}, Nobutaka Kiyokawa M.D., Ph.D.^{1,2)}

¹⁾ Department of Developmental Biology, National Research Institute for Child Health and Development

²⁾ Central Diagnosis Center, Tokyo Children's Cancer Study Group

³⁾ Department of Pediatrics, Juntendo University School of Medicine

⁴⁾ Tokyo Children's Cancer Study Group

⁵⁾ Gunma Children's Medical Center

⁶⁾ Department of Blood Transfusion, Toho University Omori Medical Center

⁷⁾ Department of Hematology and Oncology, Saitama Children's Medical Center

⁸⁾ Ibaraki Children's Hospital

Aim. We are in charge of the central diagnosis and cell preservation as a part of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment study in Tokyo Children's Cancer Study Group. It is necessary to diagnose with a minimal quantity of specimen, to preserve leukemic cells effectively as possible. Therefore a diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia by four-color analysis with digital flow cytometer has been examined.

Methods. We examined cell markers of childhood acute lymphoblastic leukemia cells by four-color analysis using digital flow cytometers. We selected the monoclonal antibodies for the diagnosis based on the recommendation of Japan Pediatric Lymphoma Study Group and made out a panel of antibodies which enable us to confirm aberrant antigen-expressions on the leukemic cells.

Results. Four colors that we used in this study were fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, phycoerythrin-cyanin 5.1, and phycoerythrin-cyanin 7. The most of childhood acute lymphoblastic leukemia cases could be diagnosed without CD45-gating. List mode compensation was useful to re-investigate specimens which was difficult to re-examine, because there were very few.

Discussion. Four-color analysis using digital flow cytometer is useful to save precious specimen of childhood acute lymphoblastic leukemia. We are intending to perform five-color analysis with CD45-gating as a next step.

¹⁾ 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部

²⁾ TCCSG (東京小児がん研究グループ) 中央診断センター

³⁾ 順天堂大学医学部 小児科

⁴⁾ TCCSG (東京小児がん研究グループ)

⁵⁾ 群馬県立小児医療センター

⁶⁾ 東邦大学医学部大森病院 輸血部

⁷⁾ 埼玉県立小児医療センター 血液・腫瘍科

⁸⁾ 茨城県立こども病院

受付日：平成18年6月5日 受理日：平成18年6月22日

Keyword: Flow cytometry; Multi-color analysis;
Childhood acute lymphoblastic leukemia.

はじめに

2004年12月より開始された東京小児がん研究グループ (Tokyo Children's Cancer Study Group, TCCSG) の小児急性リンパ芽球性白血病 (Acute Lymphoblastic Leukemia, ALL) に対する多施設共同治療研究第16次案 (TCCSG ALL L04-16) では、診断の施設間格差を標準化する目的で白血病の細胞マーカーの中央診断を行っている。また、余剰検体を今後の白血病研究に有効活用することを目的に、インフォームド・コンセントを得た上での細胞保存も開始された。この中央診断と細胞保存のセンターとしての役割を、国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部が担当している。なるべく多くの細胞を保存することを優先し、かつ中央診断として十分な項目を検査するためには、必要最小限の検体量で効率的に細胞マーカー診断を行う必要がある。

そこで、われわれは、デジタルフローサイトメーター (DG-FCM) を用いた4カラー解析での細胞マーカー解析の有用性について検討した。

方 法

白血病細胞株、健常人および小児ALL症例の血液あるいは骨髓検体に対し、fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), PE-cyanin 5.1 (PC-5) またはallophycocyanin (APC), PC-7を用いた4カラー染色を行い、DG-FCM EPICS® XL™ (BECKMAN COULTER, Miami, FL) および Cytomics™ FC500 (BECKMAN COULTER) を用いて解析した。

モノクローナル抗体 (monoclonal antibody, MoAb) のパネルは Japan Pediatric Lymphoma Study Group (JPLSG) “小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化ワーキング・グループ” の推奨検査項目を基本に、その他有用と考えられる抗体を追加、選択した。蛍光補正を容易にするため、原則的に各組にB-lineage, T-lineage, Myeloid-lineage, と非-lineage, 各1項目ずつを組み合わせて、小児で最も頻度が高いB-precursor ALLを想定して作成した (Table 1)。aberrantな抗原の発現が確認可能なMoAbの組み合わせを考慮し、minimal residual disease (MRD) 検出も視野に入れた。一部の項目についてはクローンや標識の違いによる検出率の差について比較するため、複数の抗体を併用した。

Table 1

	FITC		PE		PC5		PC7	
Cell surface								
細胞表面								
1	IgG1	BC IM0639	IgG1	BC IM731585	IgG1	BC IM6607012	PC7	BC IM6607012
2	kappa (Poly)		lamda (Poly)		CD19	DK TC051	CD45	BC IM3548
3	CD99	BD 555688	CD7	BC 6603822	CD33	BC IM2647	CD19	BC IM4249
4	CD65	BC IM1854	7.1	BC IM3454	HLA-DR	BC IM2657	CD34	BC A07509
5	CD66C	BC IM2099	CD13	BC 6602999	CD24	BC IM2645	CD7	BC IM3195
6	mue (Poly)	DK F0058	CD56	BC IM2073	CD10	BC IM2721	CD20	BC IM3629
7	gamma (Poly)	DK F0056	CD22	BC IM1835	CD15	BC IM2641	CD5	BC IM3444
8	CD49d	BC IM1404	CD18	BC IM1570	CD4	BC IM2636	CD8	BC 6607102
9	CD49e	BC IM1854	CD29	BC 6604169	CD1a	BC IM3910	CD3	BC IM3195
10	CD44	BC IM1219	CD45RA	BC IM1834	TCR-g/d	BC IM2662	CD14	BC A22331
11	CD58	BC IM1218	CD10	BC IM1915	CD38	BC IM2651	CD11b	BC IM3195
12	CD11b	BC IM0530	C42b	BC IM1447	CD244	BC IM2658	CD16	BC 6607118
13	CD134	DK RF170	Glycophorin A	BC 6607000	CD64	BC IM3655		
14	CD62L	BC IM1231	CD27	BC IM2578	TCR a/b	BC IM2661	CD61	BC IM3716

Cytoplasmic
細胞質内 (Pharmingen, Fix/Permを使用)

21	IgG1	BC IM0639	IgG1	BC IM731585	IgG1	BC IM6607012	FITC	BC IM6607012
22	TdT	DK F7139	MPO	BD 341642	CD79a	BC IM3456	CD3	BC 6607100
23	mue	BD 555782	CD179a (HSL96)					
24	Pre-BCR (HSL2)		CD22	DK R7061				

HSL2およびHSL96は、東京医科歯科大学大学院医学総合研究科・免疫アレルギー学分野 鳥山一先生から分与いただいたものを精製、蛍光標識して用いている。

BC, Beckman Coulter社、BD, Becton Dickinson社、DK, Dako社

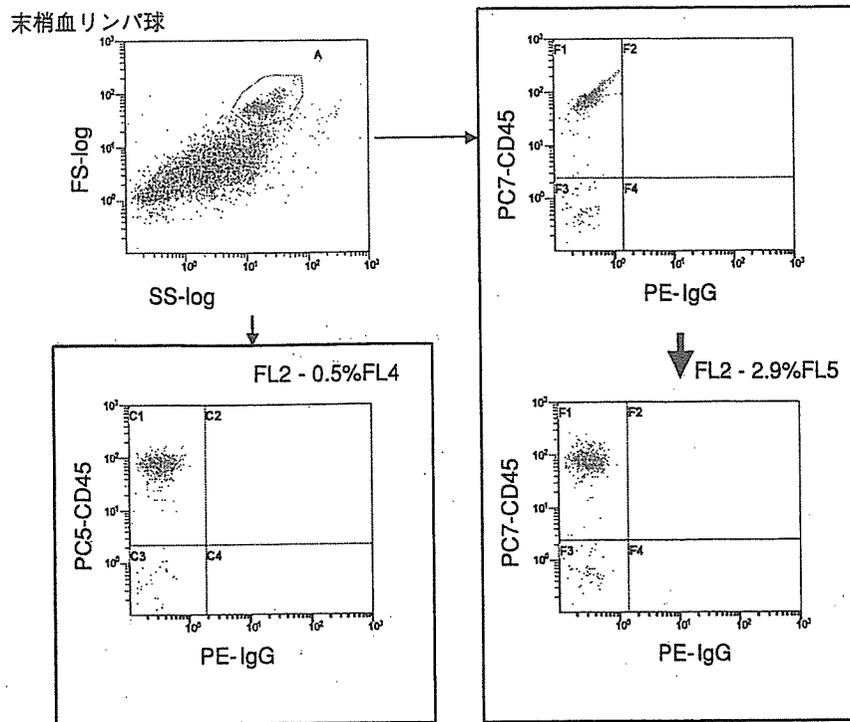


Figure 1 タンデム色素のPEチャンネルへの漏れ込み
 FC500を用いて、PEをドナーとするタンデム色素、PC5とPC7のPEチャンネルへの漏れ込みについて検討した。いずれも、若干の補正が必要であった。

CD45-gatingに関しては、1) 同じ検体量でなるべく多項目を検査するため、2) 通常各施設の検査ではCD45-gatingを行っているのだからこれと比較することが可能であること、等の理由により基本的に用いなかった。

また、診療施設から中央診断への検体の送付、余剰検体の保存については、関係各施設の倫理委員会の承認後、L04-16に登録する際に本人あるいは保護者のインフォームド・コンセントを得た上でやっている。

結 果

染色色素の選択

PEをドナーとするタンデム色素のPEチャンネルへの漏れ込みについて、比重遠心法により分離した健常人末梢血単核球をそれぞれの蛍光色素で標識した抗CD45抗体で染色して検討した。蛍光の他のチャンネルへの漏れ込みは、測定条件やPhoto multiplier tube (PMT) の性能に大きく依存すると考えられる。今回の検討では、XLで測定した場合、現在の使用条件においては、PC-5のPEへの漏れ込みはほとんど認められなかったが、PC-7のPEへの漏れ込みは補正が必要で

あった。FC500で測定した場合には、PC-5のPEへの漏れ込みについても若干補正が必要であった (Figure 1)。phycoerythrin-Texas Red (ECD) は、PE以外にも、他のチャンネルへの漏れ込みが強く、抗体の組み合わせによっては、蛍光補正が難しい場合があった。

PC-5とAPCの比較を行った。CD3およびCD19について、同一クローンの抗体をそれぞれの色素で標識したもので同一の健常人末梢血単核球検体を染色し、FC500を用いて蛍光強度の比較を行ったが、PC-5とAPCでほぼ同等の蛍光強度が得られた。以上の結果に基づいて、シングルレーザーで行える簡便性からPC-5を標準的に採用し、これにFITC、PE、PC-7を加えた4色を選択した。

症例の解析

標準的な2カラー染色、あるいはCD45-gatingを加えた3カラー染色による解析ですでに診断のついている小児白血病検体を用いて、4カラー染色による染色性を比較検討した。同じ抗原に対する抗体であっても、用いるクローンによっては反応性が大きく異なる場合も想定される。しかし、同一クローンを用いた場合で