

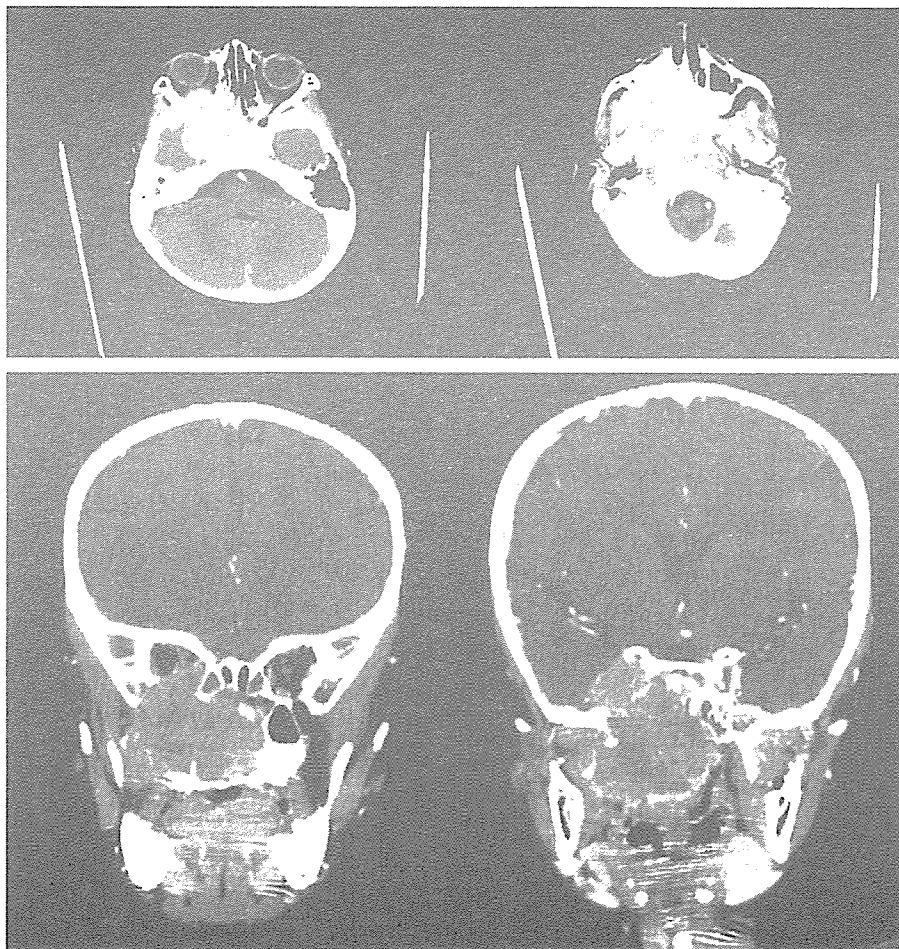
HE染色弱拡大

HE染色強拡大

免疫染色 Desmin (+)

a 病理組織像 (初診時生検時)

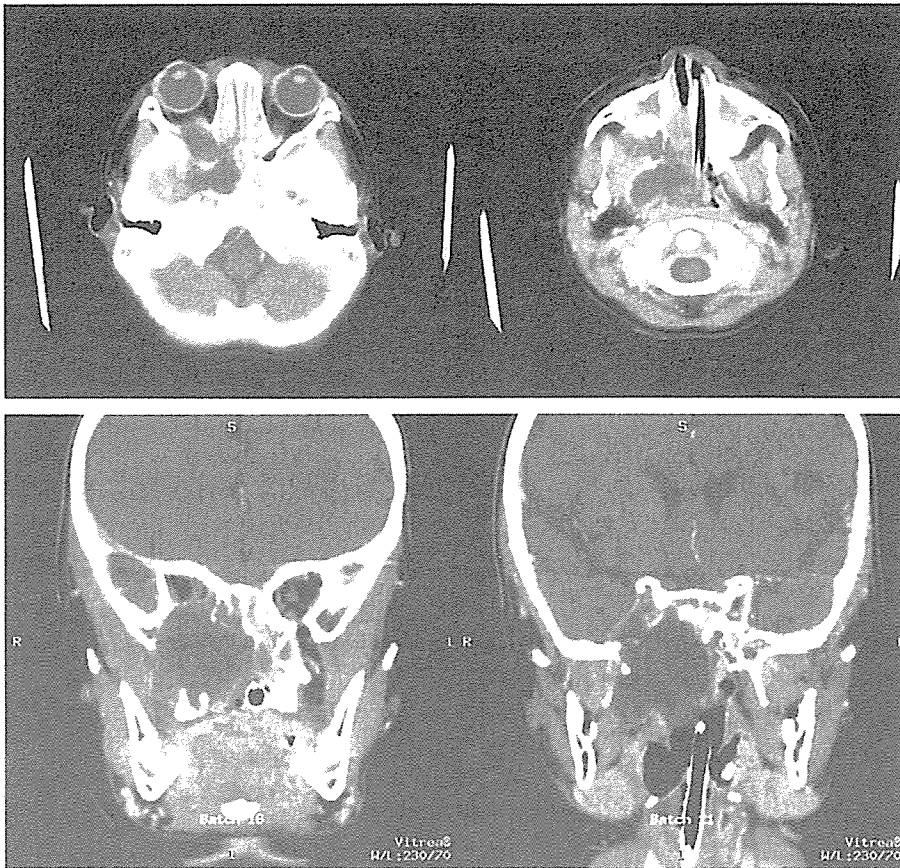
Rhabdomyosarcoma, embryonal type. 副鼻腔内腫瘍は類円形の異型核を有する細胞質の乏しい未熟な細胞のび漫性増殖よりなる。多数の核崩壊像を認めるほか、分裂像も散見される。免疫染色の結果はVimentin (+), Desmin (+), myoglobin (+), MyoD-1 (+), 横紋筋アクチン (-), S-100タンパク (±), MIC2 (-), NSE (-), synaptophysin (+), neurofilament (-), chromogranin (-).



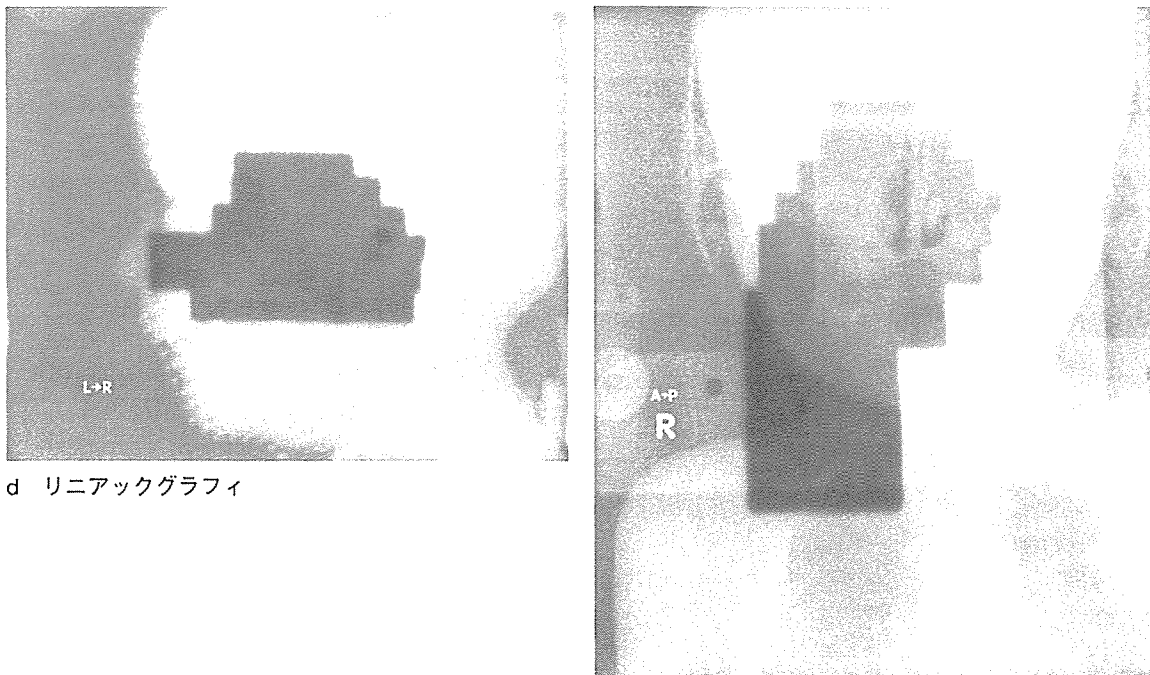
b 初診時造影CT

図3 横紋筋肉腫 (副鼻腔原発)。2歳9か月男児。stage 3, group III.

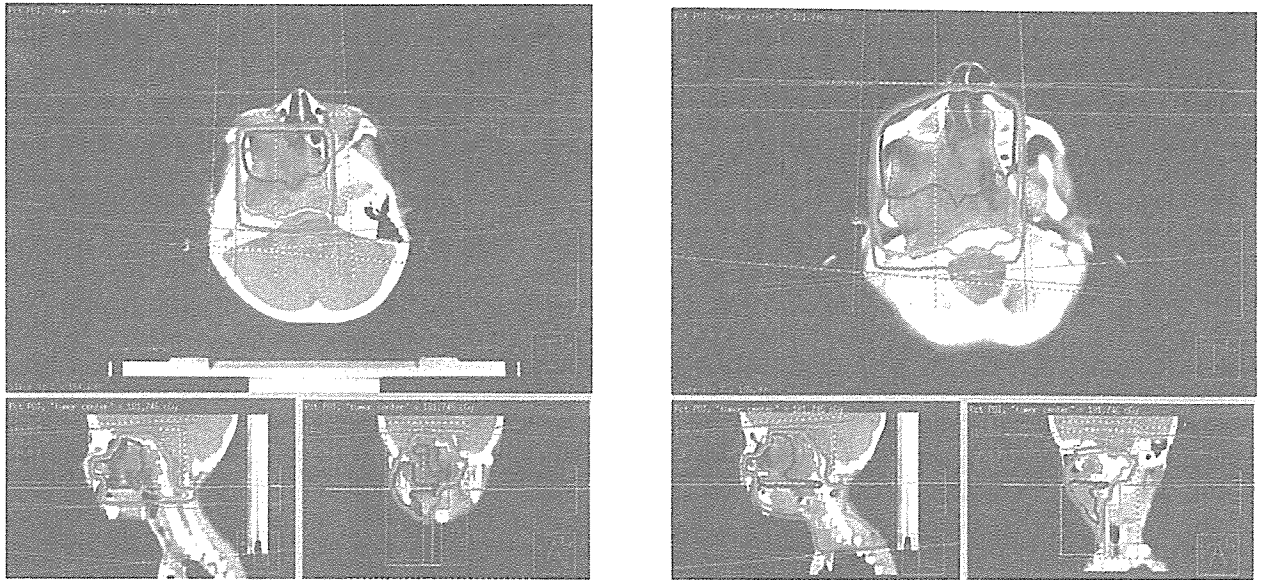
鼻閉、右眼瞼下垂、右眼球突出にて近医入院。CT, MRIにて頭蓋底を破壊する上咽頭・副鼻腔腫瘍を認め、第12日目担当センター転院。生検施行しrhabdomyosarcoma, embryonal typeと診断された(a)。CT施行(b)後放射線治療開始し、化学療法IRS-IV regimen46 (VIE)を同時併用。照射開始6日目CTでは腫瘍に低吸収域が出現している(c)。これは、神経障害の回復を目指す緊急照射の効果を表現している。鼻腔原発巣には前後左右4門、右頸部には前後2門とし、原発巣へは50.4Gy、右頸部には27Gyの照射を行った(d, e)。化学療法12クール終了後、highMEC+THP-ADR前処置による自家末梢血幹細胞移植施行し、腫瘍は縮小し瘢痕組織を認めるのみとなった(f)。



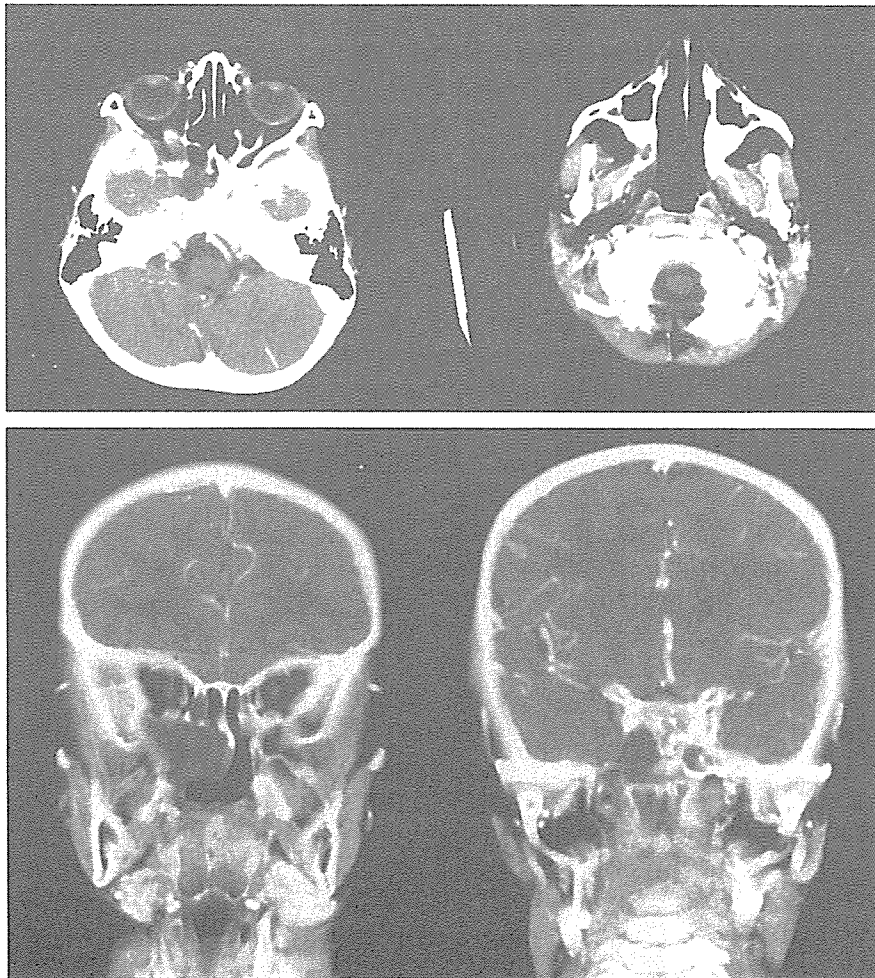
c 放射線治療6日後造影CT



d リニアックグラフィ



e. 放射線治療線量分布図



f 全治療終了後造影CT

参考文献

- 1) INT-0150/POG 9440/ CCG 4941. National Wilms' Tumor Study- 5: Therapeutic Trial and Biology Study.
- 2) D' Angelo GJ, Tefft M, Breslow N, et al. Radiation therapy of Wilms' tumor: Result according to dose, field, post-operative timing and histology. *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 1978; 4: 769-80.
- 3) Tournade MF, Com-Nougue C, de Kraker J, et al. Optimal duration of preoperative therapy in unilateral and nonmetastatic Wilms' tumor in children older than 6 months: results of the Ninth International Society of Pediatric Oncology Wilms' Tumor Trial and Study. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 488-500.
- 4) Green DM, Fernbach DJ, Norkool P, et al. The treatment of Wilms' tumor patients with pulmonary metastases detected only with computed tomography: a report from the National Wilms' Tumor Study. *J Clin Oncol.* 1991; 9: 1776-81.
- 5) Meisel JA, Guthrie KA, Breslow NE, et al. Significance and management of computed tomography detected pulmonary nodules: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999; 44: 579-85.
- 6) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会. 小児腫瘍組織分類図譜 第1編 小児肝癌, 腎芽腫, 神経芽腫群腫瘍. 金原出版; 1985. 45-64.
- 7) Shimada H, Umehara S, Monobe Y, et al. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer.* 2001; 92: 2451-61.
- 8) Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol.* 1993; 11: 1466-77.
- 9) Evans AE, Silber JH, Shpilsky A, et al. Successful management of low-stage neuroblastoma without adjuvant therapies: a comparison of two decades, 1972 through 1981 and 1982 through 1992, in a single institution. *J Clin Oncol.* 1996; 14: 2504-10.
- 10) Bradfield SM, Douglas JG, Hawkins DS, et al. Fractionated low-dose radiotherapy after myeloablative stem cell transplantation for local control in patients with high-risk neuroblastoma. *Cancer.* 2004; 100: 1268-75.
- 11) Castleberry RP, Kun LE, Shuster JJ, et al. Radiotherapy Improves the Outlook for Patients Older Than 1 Year With Pediatric Oncology Group Stage C Neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 1991; 9: 789-95.
- 12) Evans AE, August CS, Kamami N, et al. Bone marrow transplantation for high risk neuroblastoma at the Children's Hospital of Philadelphia: an update. *Med Pediatr Oncol.* 1994; 23: 323-7.
- 13) Haas-Kogan DA, Swift PS, Selch M, et al. Impact of radiotherapy for high-risk neuroblastoma: a Children's Cancer Group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003; 56: 28-39.
- 14) 正木英一. 特集 神経芽腫治療の進歩と問題点—症例から学んだ教訓を中心として—進行神経芽腫における術中照射療法. *小児外科.* 1995; 27: 557-63.
- 15) Haas-Kogan DA, Fisch BM, Wara WM, et al. Intraoperative radiation therapy for high-risk pediatric neuroblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 47: 985-92.
- 16) Wolden SL, Anderson JR, Crist WM, et al. Indications for radiotherapy and chemotherapy after complete resection in rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma studies I to III. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 3468-75.
- 17) Crist WM, Anderson JR, Meza JL, et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3039-102.
- 18) Regine WF, Fontanesi J, Kumar P, et al. Local tumor control in rhabdomyosarcoma following low-dose irradiation: comparison of group II and select group III patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 31: 485-91.
- 19) Raney RB, Anderson JR, Barr FG, et al. Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2001; 23: 215-20.
- 20) Crist W, Gehan EA, Ragab AH, et al. The Third Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *J Clin Oncol.* 1995; 13: 610-30.
- 21) Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 205-16.
- 22) Maini CL, Tofani A, Sciuto R, et al. Thallium-201 scintigraphy and chemotherapeutic response in rhabdomyosarcoma. *Clin Nucl Med.* 1994; 19: 607-10.

■ 特集 小児悪性腫瘍の治療成績はどこまで改善したか

日本における進行神経芽腫の治療成績

金子道夫* 平井みさ子

はじめに

小児の悪性腫瘍の治療法の多くは外国でのグループスタディの結果が優れていることから、ほぼそれを踏襲する形をとっている。それに対し進行神経芽腫は、1985年に厚生省班プロトコールとして独自の治療レジメンに基づいたグループスタディが行われ、その成績が優れていたことから、その後91プロトコールに改訂され、さらに98プロトコールとして現在に至っている。一方、米国ではChildren's Cancer Group (CCG) が85プロトコールのA1 regimenに類似した初期治療後に自家骨髄移植群と化学療法群にrandomizeし、さらに治療後に13 cis-RAの投与の有無で2度目のrandomizeを行うCCG 3891スタディを行い、自家骨髄移植+TBIと13 cis-RAの有用性を明らかにした。わが国でもこのようなきちんとしたrandomized clinical trialが遂行できるようその基盤作りを目指して、新たなプロトコール作成を施行中である。

I. 治療成績と問題点

1. 85プロトコール (JANB 85)

85プロトコールによる治療成績はこれまでにすでに数回発表し、ほぼfinalの報告が2003年Kanekoにより出された。85プロトコール治療患者の定期追跡調査は2003年10月をもって終了した。治療成績は、1歳以上の病期3の5年 progression free 生存率はほぼ75%、病期4の同5年生存率が32%、10年生存率が29%であった。これは85

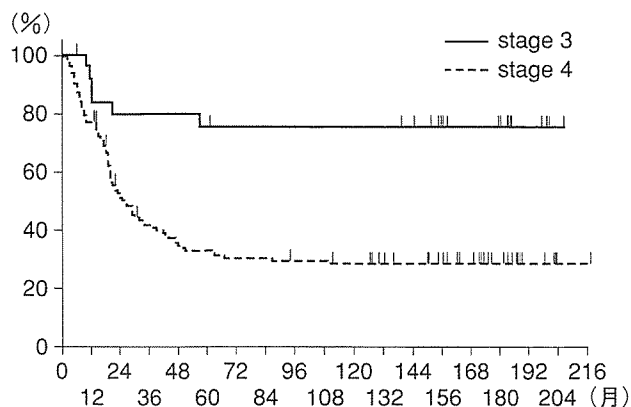


図1 85プロトコールによる病期3と病期4の治療成績

病期4は1歳未満の病期IVAと1歳以上の病期IVAおよびIVB。

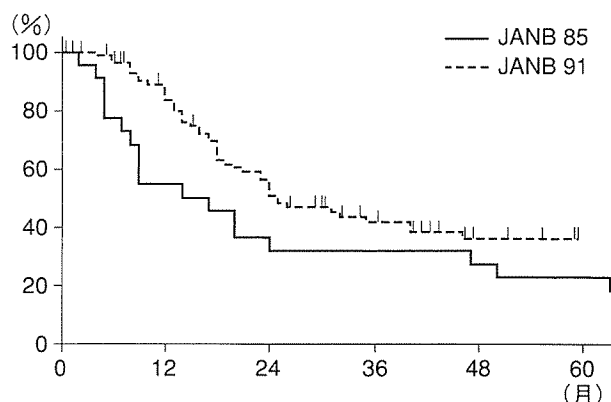


図2 85プロトコールとエンドキサンを増量した91プロトコールによるN-myc増幅のある病期4の治療成績の比較

有意に91プロトコールの治療成績が良好である。

プロトコールによる治療の開始前の治療成績に比べて飛躍的によくなった(図1)。

2. 91プロトコール (JANB 91) (図2)

1985年プロトコールの開始前にN-myc増幅

* 日本進行神経芽腫スタディグループ
筑波大学臨床医学系小児外科
[〒305-8575 つくば市天王台1-1-1]

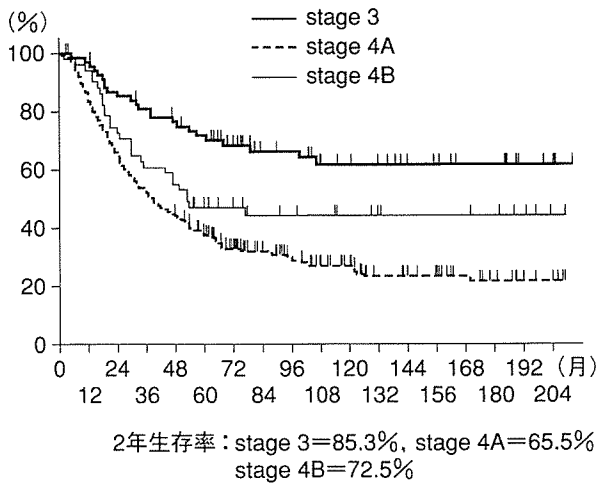


図 3 91 プロトコルによる 1 歳以上の病期別治療成績比較

日本分類の病期 IVB が有意に病期 IVA より治療成績がよいことは注目すべきと考えられる。

が神経芽腫の予後に密接に関連し、10 倍以上の N-myc 増幅症例では 2 年以内に全員死亡するとされた。91 プロトコルでは進行症例の 30% 以上を占める N-myc 増幅例の治療成績改善を目指した。すなわち、進行例全例に治療開始前生検を義務づけ、N-myc 増幅症例では 2 クール目から cyclophosphamide を倍量にした 91 A 3 レジメンを初期治療に取り入れることにした。また、この頃より多くの施設で幹細胞移植が可能となったので、N-myc 増幅例では自家幹細胞移植を施行するコースが推奨された。N-myc 非増幅例には 85 A 1 の vincristine を etoposide に変更した 91 A 1, いわゆる new A 1 を初期治療とすることにした。その結果、病期 4 の relapse free survival は 85 プロトコルでは治療開始後 1 年が 56% であったのに対し、91 プロトコルでは 82%, 3 年のそれが 85 プロトコルでは 33% に対し、91 プロトコルでは 41% と有意に向上した(図 3)。すなわち、N-myc 増幅が致死的であるとされたのが、85 プロトコルでも長期生存例が得られたこと、それが初期治療の強化によりさらに向上したことがこのスタディで示された。一方、N-myc 非増幅例では初期治療はわずかの改変に止まったが、幹細胞移植による大量化学療法を施行される症例が増加した。しかし、治療成績は 85 プロト

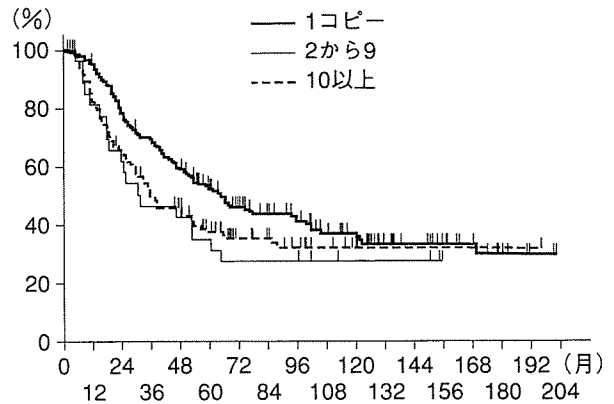


図 4 N-myc コピー数による病期 3, 4 の治療成績比較

増幅は 10 倍以上とされてきたが、2~9 コピーも治療成績は良くない。

コルと 91 プロトコルでほとんど差がなく、治療成績向上はなされなかった。さらに 91 プロトコルで N-myc 増幅例と非増幅例の治療成績を比較すると、増幅例のほうがわずかに治療成績が低いものの、両者間に有意な治療成績の差はなくなった。

これまで、N-myc 増幅腫瘍は「Southern 法で 10 倍以上の増幅がみられたもの」というのが一般に受け入れられていた。N-myc 遺伝子の発現のほうがもっと良く予後を予測できるのではないかと研究が行われたが、発現より増幅の有無が重要であることが判明した。一方、FISH 法の登場により、これまで N-myc 増幅 2~9 倍とされた「非増幅例」の中になら増幅例が含まれていることも判明した。最近、85 プロトコルと 91 プロトコルで治療された 1 歳以上の病期 3, 4 の進行例で N-myc 増幅のコピー数と治療成績を比較すると N-myc コピー数 2~9 倍と報告のあった患児の治療成績は増幅例と全く同じであった(図 4)。N-myc 2~9 倍と報告された中間群では FISH 法や定量的 PCR 等で N-myc コピー数を再確認すべきである。この群は増幅が強く疑われると言ってよい。

91 プロトコル以降幹細胞移植症例が急増したが、移植症例では幹細胞採取のため、初期治療のコース数を少なくしたり、幹細胞が採取できるように CDDP の減量や他の regimen の挿入など

初期治療の violation が多くなった。また、幹細胞移植に伴う合併症や採取できずに合併症の多い同種移植が施行されたため、91 プロトコールでは CCG 3891 のような幹細胞移植による治療成績向上を明らかにすることはできなかった。

3. 98 プロトコール

91 プロトコールによるグループスタディの結果、

1) N-myc 増幅症例に対して初期治療を dose escalation することにより、治療成績の向上が得られたこと。

2) N-myc 非増幅例では、初期治療を 91 A 1 にしても治療成績の向上が得られなかったこと。

3) 幹細胞移植による治療の導入で初期治療が軽減される傾向にあったこと。

を踏まえて、98 プロトコールでは、

① N-myc 増幅の有無にかかわらず、初期治療は 91 A 3 を基本にした 98 A 3 を当初から 6 コース施行する。

② ifosphamide の有効性と安全性を評価するため N-myc 増幅例では初期治療の 4 コース目に ifosphamide を含んだ regimen を用意する。

③ 初期治療 4 コース開始時点で治療効果を判定し、それにより以後の治療を変える。

④ N-myc 非増幅の病期 3 には幹細胞移植を含んだ治療は行わない。

などを骨子とした 98 プロトコールが作成され、現在スタディが行われている。まだ、スタディ途中であるので、詳細な解析結果を発表できる段階ではない。しかし、98 プロトコールから得られた

教訓を基に現在きちんとしたデータセンターを置いた施設限定型の第 2 相臨床試験を走らせることができるようにプロトコールを作成中である。ここでは、プロトコール改訂作業の基礎データとなった解析結果の一部を報告し、98 プロトコールによる進行神経芽腫治療の成果と問題点を明らかにする。

98 プロトコールの適格症例として 2003 年 3 月までに登録されたのは 136 例であった。病期別の progression free survival を図 5 に示した。病期 3 は 16 例、4 が 116 例で、病期 3 の症例数が少なく、その治療成績もこの時点では不良である。しかし、病期 4 は 2 年生存率 65%、3 年生存率は 51% と満足すべき結果が得られている。再発・再燃は 6 カ月頃かみられ 2 年半の間、ほぼ一定の比率でみられた。初期治療に対する反応では (2002

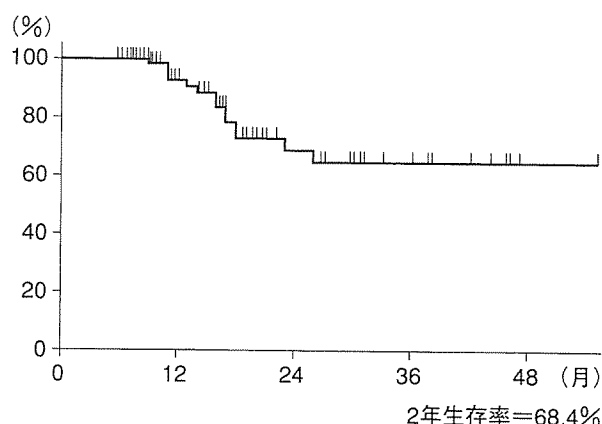


図 5 幹細胞移植を施行した病期 4 患者の治療成績 3 年生存率で 60% を超えていることは注目に値する。

表 初期治療 (化学療法) 成績, 2002 年 3 月

	計	生存例 (適格)	腫瘍死 (脱落)	腫瘍死 (初回)	治療死	移植関連死
・CR	36	27	3	1		5
・VGPR	10	6	1	2		1
・PR	42	28	7	1	2	4
・NC	6	3			3	
・PD	1		1			
・CR → PD	0					
・PR → PD	1	1				
・記載なし	16	16				
合計	112	81	12	4	5	10

年3月集計)記載のあった96例中、36例が完全寛解、10例がVGPR(very good partial response)、42例がPRで著効率37.5%、奏効率は92.7%で、初期治療に対する効果としては優れたものと考えられた。ただ、第1クールで5例の非腫瘍死がみられたのがこの奏効率を悪化させた大きな原因と考えられた(表)。4例中2例がRS肺炎、1例がアスペルギルス肺炎、他の1例が敗血症であった。1例は生後7カ月でA1を施行、他は2歳以上で98A3が投与された。現在1コース目の治療レジメンを検討中である。

98A3は骨髄抑制、腎毒性のため5コース目からは規定の4週ごとに施行することが困難になる。そのため、6コース施行されない症例がある。6コース施行したのが33例に対し、5コースにしたものが25例、4コースが24例であった。副作用のためCDDPを減量したり、CBDCAに変更された症例も少なからずあり、また、副作用防止のため予め変更する施設もみられた。クレアチニンクリアランスでみた腎毒性は、投与回数が増えるにつれ増加した。初期治療の腎障害はそれに続く幹細胞移植による合併症にも大きな影響を与え、TBIを含む前処置ではとくに注意が必要と考えられるので、現在98A3の投与クール数、CDDPの投与量、期間延長の許容範囲を中心に初期治療の検討が行われている。これまで進行神経芽腫の治療はdose escalationにより治療効果を挙げてきたが、98A3は、dose intensityが非常に高いので、治療効果も強いが副作用により多くの症例でプロトコルドおりの遂行が困難であるのが明らかになった。そのため効果をできるだけ犠牲にしないで多くの症例に、ほとんどの施設で遂行可能な、すなわちprotocol violationを最小限にした有効なプロトコルにすべく改訂中である。

幹細胞移植に伴う合併症や移植関連死に91プロトコル以来悩まされてきた。98プロトコルではこれまで13例の移植関連死が報告されたが、そのうち3例はpreconditioning中に死亡した。移植後に死亡した10例のうち同種移植が7例を占めた。同種移植になる理由は骨髄転移などの遠隔転移の残存か、あるいは幹細胞が十分採取できないためと考えられる。これも初期治療をどうす

るかと密接な関連があり、その視点でも初期治療を再検討中である。

移植にまで到達した患者についてその予後を見ると、病期4の症例で治療開始後2年の生存率が65%、3年以降が60%と良好である。この成績をみると、いかに腫瘍をコントロールして幹細胞移植までもってくるか、そして幹細胞移植をいかに安全に施行するかが治療成績向上に重要であるかが理解できよう。98プロトコルの症例解析では幹細胞移植前の腫瘍の状態がVGPR、PRでも治療成績は良好で、むしろCRの症例よりよい程である。この点をもっと科学的に解析するには治療効果の評価をどうするかが重要であり、また何をもって腫瘍残存と判定したかの解析が重要で今後の課題である。

N-myc増幅と予後に関しては現時点でコピー数別の3群間で治療成績に全く違いは認められない。これが、N-myc増幅群に対するifosphamideを含んだDレジメンによるかどうかは今後の検討課題である。

おわりに

これまでの日本進行神経芽腫グループスタディの結果を報告した。その治療法は我が国独自のものであり、その成績は決して欧米の結果にひけを取らない。しかし、これを胸を張って国際的に報告できるかと自問すると、データの質、プロトコル違反など現時点の国際レベルからみて沢山の問題が含まれている。優れた治療法による優れた治療成績として国際的な標準治療たるべく目標を掲げるならば、国際基準に基づくグループスタディが必須である。現在はその好機と考えているので、データセンターの基盤のもとにきちんとした臨床試験を行わなくてはならないし、そうしなくては社会も患者様も許してはくれない時代である。

文 献

- 1) Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al : Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med

- 341 (16) : 1165-1173, 1999
- 2) Sawaguchi S, Kaneko M, Uchino J, et al : Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy : A report from the Study Group of Japan. *Cancer* **66** : 1879-1887, 1990
 - 3) Iwafuchi M, Utsumi J, Tsuchida Y, et al : Evaluation of patients with advanced neuroblastoma more than 5 years after initiation of intensive Japanese protocol : A report of the Study Group of Japan for Advanced Neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* **27** (6) : 515-520, 1996
 - 4) Kaneko M, Tsuchida Y, Uchino J, et al : Treatment results of advanced neuroblastoma with the First Japanese Study Group Protocol. *J Pediatr Hematol/Oncol* **21** (3) : 190-197, 1999
 - 5) Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H, et al : Intensified chemotherapy increases the survival rates in stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. *J Pediatr Hematol/Oncol* **24** (11) : 613-621, 2002
 - 6) Suita S, Zaizen Y, Kaneko M, et al : What is the benefit of aggressive chemotherapy for advanced neuroblastoma with N-myc amplification? : A report from the Japanese Study Group for the treatment of advanced neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* **29** (6) : 746-750, 1994
 - 7) Kawa K, Ohnuma N, Kaneko M, et al : Long-term survivors of advanced neuroblastoma with MYCN amplification : A report of 19 patients surviving disease-free for more than 66 months. *J Clin Oncol* **17** (10) : 3216-3220, 1999
 - 8) Ohnuma N, Takahashi H, Kaneko M, et al : Treatment combined with bone marrow transplantation for advanced neuroblastoma : An analysis of patients who were pretreated intensively with the protocol of the Study Group of Japan. *Med Pediatr Oncol* **24** (3) : 181-187, 1995

Results of Treatment of Advanced Neuroblastoma with Japan Advanced Neuroblastoma (JANB) Protocols

MICHIO KANEKO, MISAKO HIRAI

Department of Pediatric Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

Key words : Advanced neuroblastoma, Chemotherapy, Group study, Clinical trial, MYCN amplification.

Jpn. J. Pediatr. Surg., 36(1) ; 79~83, 2004.

Treatment results of advanced neuroblastoma treated with JANB protocols are described. The first study, conducted from 1985 to 1991, marked an innovative advance in the treatment of cases of advanced neuroblastoma with extremely dismal prognosis. Progression-free survival rates of patients with stage 4 neuroblastoma at 5 and 10 years after initiation of the therapy were 32% and 29%, respectively, with the JANB 85 protocol. MYCN amplified advanced neuroblastoma, which was considered uniformly fatal, became a curable disease with the JANB 91 protocol. Now treatment with 98 A 3 regimen as an induction chemotherapy followed by high-dose chemotherapy for stage 4 neuroblastoma is under way. Progression-free survival for patients with stage 4 disease who receive megatherapy rescued by stem cell transplant is approximately 60% 3 years after initiation of chemotherapy.

神経芽腫の治療

金子 道夫 平井みさ子 筑波大学臨床医学系小児外科

要旨

乳児期神経芽腫は良好な治療成績であることが、乳児神経芽腫全国統一プロトコールによる前方視的スタディで明らかにされ、治療による死亡や後障害をきたさないよう治療の軽減がなされた。一方、進行神経芽腫では、まず85プロトコールで進行例に有効性の高いレジメンが開発された。91プロトコールでは、N-myc増幅例で増量した初期治療で治療成績の向上が得られた。98レジメンでは、プロトコールどおりに完遂することが困難なことが少なからずあり、現在データセンターを基盤にしたきちんとした第二相臨床試験としてプロトコールが検討されている。

Key Words

advanced neuroblastoma
infantile neuroblastoma
group study
N-myc amplification
hematopoietic stem cell transplantation

はじめに

神経芽腫は小児固形腫瘍としてもっとも頻度が高く、予後がきわめて不良な疾患とされてきたが、1歳未満での生存例が知られ、自然退縮も観察されていた。そこで、わが国では1985年から生後6カ月でマス・スクリーニング（以下、マスと略す）が施行された。その結果、患者総数は2倍以上となったが、その中にかなりの自然退縮例が観察されたこと、欧米での試験的導入の結果、マスは神経芽腫の死亡率を下げないと報告されたことから、わが国の神経芽腫マスは2004年3月で休止することになった。マス導入後の進行神経芽腫総数は当初期待されたほどには減少せず、進行例に対してはグループスタディが行われ成果をあげた。

本稿では、進行神経芽腫を中心にこれまでの成果と今後の展望を述べる。具体的な治療レジメンはすでに報告したので、それを参照されたい。

乳児神経芽腫および限局性神経芽腫

1. マス発見症例

小児がん学会神経芽腫委員会の平成15年11月の報告¹⁾では、1976～2001年にマスで発見された神経芽腫は2,393例で、最近では毎年160

～180名が発見され、5,000～6,000人に1名の発見率であった。病期は予後良好とされるI, II, IV Sが全体の76%を占めた。マス発見例では病期IIIの治療成績もよいことから良好群はほぼ95%を占める。N-myc検索を行った1,875例のうち3倍以上増幅は35例(1.9%)であった。

治療は後述するグループスタディ「1歳未満で発見された神経芽腫治療プロトコール」の結果などから、軽減化の方向に進んでいる。予後報告のあった2,113例のうち生存は2,080例(97.6%)ときわめて良好であった。しかし、死亡33例の内訳をみると腫瘍死はわずか6例で、16例が治療関連死、3例が二次がんが原因の死亡であった。また、腎機能低下や腎消失など後障害の報告もみられた。

2. 乳児神経芽腫の治療

当初は病期Iでも化学療法が施行され、手術でリンパ節郭清が多く行われていたが、治療拒否から自然退縮が観察された症例の報告など、これまでの神経芽腫とは異なる生物学的特性が広く認識された。そこで、1994年に適正な治療を明らかにすることを目的に乳児神経芽腫全国統一プロトコールが前方視的手法で開始された。N-myc増幅のない病期Iは手術のみ、IIは化学療法なしと術後James (regimen A) のrandomize, 病期IIIの手術可能例では術後regimen AとBのrandomizeという、わが国としては画期的なrandomized clinical trial (以下、RCTと略す)を行った。スタディが終了した1998年5月までに238例の有効登録症例があり、死亡例は8例、再発した症例は9例であった。このtrialから病期Iのみでなく病期IIでも術後化学療法は不要との結論が得られた²⁾。

そこで、1998年5月からさらに治療を軽減したプロトコールにてRCTが行われている。おもなターゲットは病期IIIに術後化学療法が必要か否かの検討、および骨転移のない病期4の治療軽減が可能か否かの検討である。2001年6月の

集計では有効登録数195例、うちマス症例が165例であった。2例に腎消失、3例に腎萎縮がみられた。病期I, 2A, 2Bの112例は全例生存中で、術後化学療法は必要ないことが再確認された。一方、病期3は21例と少数であったこと、RCTであったにもかかわらず術後化学療法ありが13例、なしが8例と症例数が異なることなど問題点が指摘された。結論は得られていないが、病期3でもN-myc増幅がなければ、後療法は必要ない可能性が十分ある。

筑波大学はマスが開始された1985年以来、乳児例には腫瘍摘出とリンパ節生検のみの手術に止め、手術した37例のうち仙骨部亜鈴型の1例に骨髄再発がみられたが、現在まで全例腫瘍なく生存、腎はすべて温存され、治療合併症は、まったくみられない。

乳児期でも4A症例およびN-myc増幅症例は、後述する進行神経芽腫プロトコールで治療が行われ、月齢に応じて化学療法剤が減量される。1985年プロトコール(JANB85)、1991年プロトコール(JANB91)での治療成績を図1に示した。N-myc増幅のない病期IV Aの5年、10年生存率が80%を超えているのは驚異的で、この群は新たな予後因子を明らかにできれば、さらに減量が可能であろう。乳児期は化学療法・手

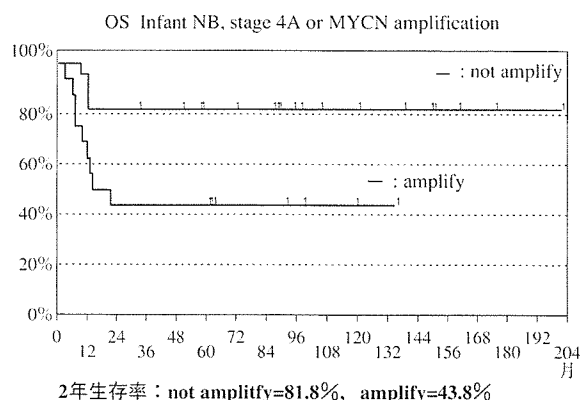


図1 N-myc増幅の有無による乳児期進行神経芽腫の治療成績
病期IV AにもかかわらずN-myc非増幅の神経芽腫の治療成績はきわめてよい

術とも合併症や後障害をきたしやすい患者群であり、かつ症例数が少ないので全国的な治療研究が必要である。

3. 限局性神経芽腫

わが国では、乳児神経芽腫と進行神経芽腫に対してグループスタディが行われているが、1歳以上の病期Ⅰ、Ⅱでは全国規模の治療研究は行われていない。小児外科学会悪性腫瘍委員会による1991～1995年治療開始症例の集計では1歳以上の病期Ⅰ、Ⅱ症例は81例、そのうち5年以上生存例は55例で治療成績は満足できない。欧米の報告の多くは、このような限局性神経芽腫は手術による摘出のみでよいという考えであるが、わが国では治療内容や治療成績はほとんど判明していない。この患者群はエアポケットに落ちたような感があり、神経芽腫全体を考えた包括的な治療研究グループの構築が必要である。

進行神経芽腫

進行神経芽腫に対して厚生省班研究の一環として、わが国独自の治療レジメンにより1985年から全国規模のグループスタディが施行され、その治療成績は国際的にも高く評価されている。

1. 85 プロトコール (JANB85) JANB: Japan Advanced Neuroblastoma Study

それまでの局所療法重視から、強い初期治療で転移巣をコントロールし、原発巣の縮小をはかるという基本方針の大きな転換を行った。初期治療は大量 cyclophosphamide と新しい薬剤である CDDP、THP-ADR を組み合わせた。この初期治療の効果はめざましく、進行神経芽腫にとどまらず、難治性の小児固形腫瘍に広く用いられた。85 プロトコールによる治療成績は、2003年 Kaneko によりほぼ final の報告として出された⁶⁾。治療成績は、1歳以上の病期Ⅲの5年 progression free 生存率がほぼ75%、病期Ⅳが同5

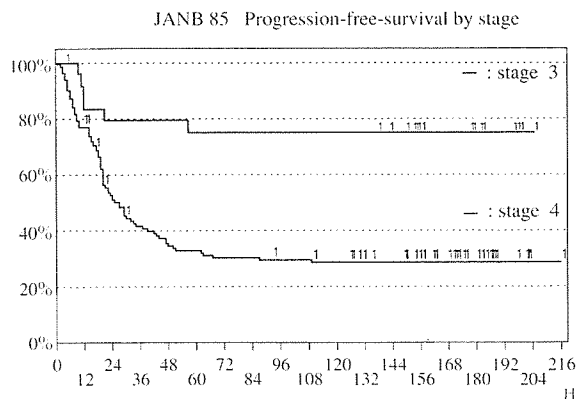


図2 85年プロトコールによる進行神経芽腫の治療成績
病期ⅣでPFSが約30%にみられるのは画期的であった

年生存率32%、10年生存率29%であった。これは85プロトコールによる治療の開始前の治療成績に比べて飛躍的に向上した(図2)。また、当時絶対的予後不良因子とされたN-myc増幅症例にも多くの治癒例がみられた^{4,6)}。

2. 91 プロトコール (JANB91)

91プロトコールでは、進行症例の30%以上を占めるN-myc増幅例の治療成績改善をめざした。全例に治療開始前生検を義務づけ、第一クールは全例に91A1レジメンいわゆるnew A1を施行した。N-myc判明後、増幅症例では第二クール目からcyclophosphamideを倍量にした91A3レジメンで、その後の初期治療を行うこととした。また、N-myc増幅例に幹細胞移植を施行するコースを推奨した。N-myc非増幅例には85A1のvincristineをetoposideに変更した91A1を初期治療とすることにした。その結果、1歳以上、病期Ⅳのrelapse free survival (RFS)は85プロトコールでは治療開始後1年で56%であったのに対し、91プロトコールでは82%、3年のRFSが前者では33%に対し、後者では41%と有意に向上した(図3)。すなわち、初期治療の強化によるN-myc増幅症例の治療成績の向上がこのスタディで示された。N-myc非増幅例に対する初期治療は僅かの改変に止まったが、幹細胞移植による大量化学療法を施行される症

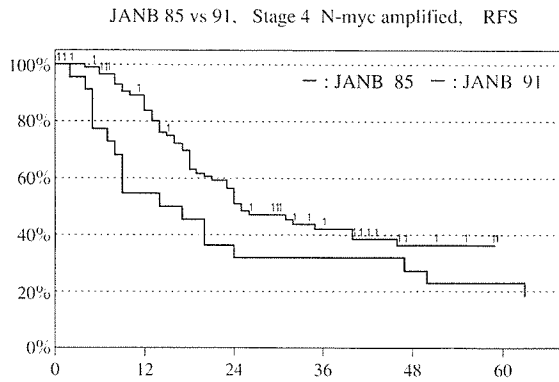


図3 初期治療強化により N-myc 増幅症例の治療成績が有意に向上した

例が増加した。しかし、治療成績は85プロトコールと91プロトコールでほとんど差がなく、初期治療の有用性が改めて示された。また、91プロトコールで N-myc 増幅例と非増幅例の治療成績を比較すると、増幅例のほうがわずかに治療成績が低いものの、両者間に有意な治療成績の差はなく、少なくとも進行例での N-myc 増幅の予後因子としての有用性は小さくなった。

主として技術的側面から N-myc 増幅腫瘍は「Southern 法で10倍以上の増幅がみられたもの」とされた。一方、FISH法により、これまで N-myc が2～9倍とされた「非増幅例」の中に、かなり増幅例が含まれていることも判明した。そこで、85プロトコールと91プロトコールで治療された1歳以上の病期Ⅲ、Ⅳの進行例で、N-myc 増幅のコピー数と治療成績を比較すると N-myc コピー数2～9倍の患児の治療成績は増幅例とほぼ同じであった。N-myc 2～9倍と報告された中間群では、FISH法や定量的PCRなどでより正確な N-myc コピー数を再確認する必要があるといえる^{4)~7)}。

91プロトコール以降幹細胞移植症例が急増したが、移植症例では移植の完遂のため、初期治療のコース数を少なくしたり、幹細胞が採取できるように CDDP の減量や ICE をはじめとするほかの regimen の挿入など、初期治療の violation が多くなった。また、幹細胞移植に伴う合

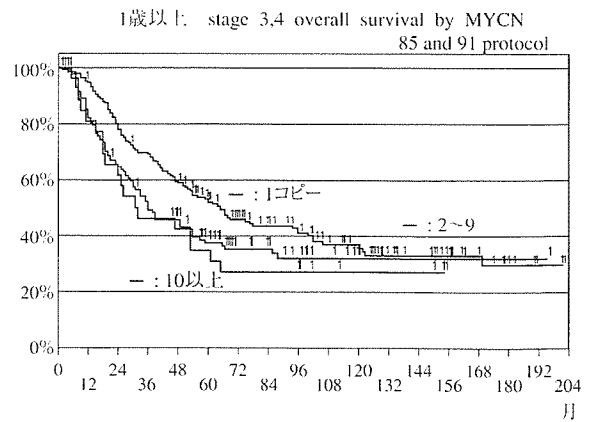


図4 これまで N-myc 増幅は10コピー以上とされたがそれ以下でも治療成績は不良である

併症や、幹細胞が十分採取できず合併症の多い同種移植が施行された症例もみられた。そのようなことが影響して、91プロトコールでは CCG3891³⁾ のような幹細胞移植による治療成績向上を明らかにできなかった^{4)~10)}。

3. 98プロトコール

91プロトコールによるグループスタディの結果をふまえて、

① N-myc 増幅の有無にかかわらず、初期治療は91A3を基本にした98A3を当初から6コース施行する。

② ifosphamide の神経芽腫の初期治療における有効性と安全性を評価するため N-myc 増幅例では初期治療の4コース目に ifosphamide を含んだ regimen を用意する。

③ 初期治療4コース開始時点で治療効果を判定し、それにより以後の治療を変える。

④ N-myc 非増幅の病期Ⅲには幹細胞移植を含んだ治療は行わない。

などを骨子とした98プロトコールが作成され、現在スタディが行われている。まだ、スタディ途中であるので、詳細な解析結果を発表できる段階にない。しかし、98プロトコールから得られた教訓を基にきちんとしたデータセンターを置いた施設限定型の第二相臨床試験を走らせるためのプロトコールを作成中である。こ

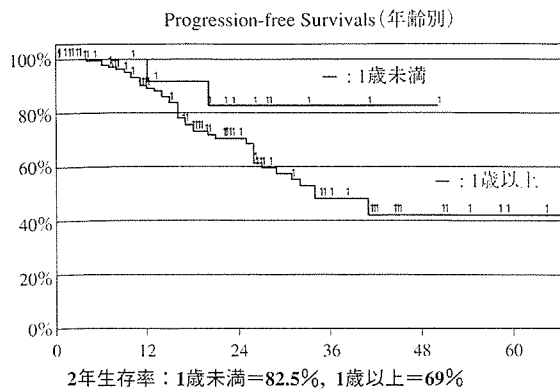


図5 98プロトコルの2003年9月現在の治療成績
(詳細は未発表)

ここでは、その中で基礎データとなった解析結果の一部を報告し、98プロトコルによる進行神経芽腫治療の成果と問題点を明らかにする。

98プロトコルで2003年9月までに登録されたのは、163例でこのうち適格例は147例であった。年齢別の progression free survival を図5に示した。病期3は17例、4が127例で、病期3の症例数が少なく、治療成績もこの時点では不良である。しかし、病期4は2年生存率70%、3年生存率は51%と満足すべき結果が得られている。再発・再燃は6カ月頃かみられ2年半の間、ほぼ一定の比率でみられた。初期治療に対する反応では(以下、2002年3月集計)記載のあった96例中、36例がCR、10例がVGPR (very good partial response)、42例がPRで著効率37.5%、奏効率は92.7%で、初期治療に対する効果としては優れたものと考えられた。ただ、第一クールで5例の非腫瘍死がみられたのがこの奏効率を悪化させた大きな原因と考えられた。5例中2例がRS肺炎、1例がアスペルギルス肺炎、ほかの2例が敗血症であった。

現在、改訂プロトコルで、1コース目の治療レジメンを検討中である。98A3は骨髄抑制、腎毒性のため4～5コース目頃からは規定の4週ごとの施行が困難になる。そのため、規定の6コースが施行されない症例があり、6コース施行が33例に対し、5コースが25例、4コースが

24例であった。副作用のためCDDPを減量したり、CBDCAに変更された症例も少なからずあり、また、副作用防止のため当初から減量変更する施設もみられた。クレアチニークリアランスでみた腎毒性は、投与回数が増えるにつれ増加した。初期治療での腎障害はそれに続く幹細胞移植による合併症にも影響を与え、total body irradiation (以下、TBIと略す)を含む前処置ではとくに注意が必要と考えられるので、現在、第一クールのレジメン、98A3の投与クール数、CDDPの投与量、期間延長の許容範囲を中心に初期治療の検討が行われている。これまで進行神経芽腫の治療はdose escalationにより治療効果をあげてきた。98A3はdose intensityが非常に高いので、治療効果も強いが副作用により多くの症例でプロトコルどおりの遂行が困難であった。できるだけ効果を犠牲にしないで、多くの症例、ほとんどの施設で遂行可能な、すなわち protocol violation の出にくい有効なプロトコルにすべく改訂中である。91プロトコル以来、幹細胞移植に伴う合併症や移植関連死に悩まされてきた。98プロトコルでは2003年9月までに14例の移植関連死が報告されたが、そのうち3例はpreconditioning中に死亡した。移植後に死亡した11例のうち同種移植が8例を占めた。同種移植になる理由は骨髄転移などの遠隔転移の残存か、幹細胞が十分採取できないためと考えられる。これも初期治療改訂と密接な関連があり、その視点でも初期治療を再検討中である。

移植まで到達した患者の予後を見ると、病期4の症例で治療開始後2年の生存率が65%、3年以降が60%と良好である。この成績を見ると、いかに腫瘍をコントロールして幹細胞移植までもってくるか、そして幹細胞移植をいかに安全に施行するか治療成績向上に重要であるかが理解できよう。また、TBIを併用するかは意見の分れるところである。TBI以外の治療要素

が異なるので単純な比較はできないが98 プロトコール患者の治療成績を TBI のあるなしで分けると、現時点では TBI の施行症例の治療成績がやや勝るものの、 $p = 0.89$ でまったく有意差はない¹¹⁾。

4. CPT-11 の第一相臨床試験^{12) 13)}

神経芽腫をはじめとする小児の難治性固形腫瘍の治療成績向上は、これまで主として化学療法法の intensification が行われ、成果をあげてきた。進行神経芽腫では、85 プロトコールに cyclophosphamide の大量療法が取り入れられた。同時に新規の抗腫瘍薬、とくに抗腫瘍メカニズムの異なる抗腫瘍薬の開発とその臨床応用はきわめて重要である。85 プロトコールでは CDDP がこれにあたる。しかし、その後は従来の薬剤の derivative は開発されたものの新規なもの開発はきわめて少ない。その中で注目されたのが CPT-11 とタキソールである。筆者は神経芽腫のみならず、横紋筋肉腫や PNET など、ほかの難治性腫瘍にも CPT-11 にはきわめて有用であることをヌードマウスを用いた *in vivo* の実験で明らかにした。その臨床導入を 98 プロトコールの目標にしたが、新規薬剤の導入はそのころからきわめて厳格になり、小児に対して第一相試験から行うことが要求され、現時点でも第二相試験止まりで、まだ本格的な臨床応用は図られていない。第一相試験は 50 mg/m^2 から 3 日間投与 4 週おきの 2 クールで開始された。最終的には 200 mg/m^2 まで投与が行われ、 180 mg/m^2 3 日間が MTD と決定された。dose limiting toxicity は下痢と骨髄抑制であった。

一方、フランスの Vassal らは 3 週ごとの 2 時間静注法で、小児での MTD は 600 mg/m^2 とした。さらに、米国の Furman らは 5 日間連続投与を 2 週施行し、1 週休むというスケジュールで第一相試験を行い、MTD を 20 mg/m^2 とした。われわれは CPT-11 を初期治療に組むべく、4 週ごとの投与方法とした。薬剤の特徴から 3 ~ 7 日

以上の連続投与が望ましいと思われ、経口投与や持続注入したほう効果が高いとされる。現在横紋筋肉腫を対象に土田らが、小児の肉腫を対象に牧本らが、それぞれ医師主導型第二相臨床試験を開始しようとしている。

おわりに

進行神経芽腫のスタディグループのレジメンは、わが国独自のものであり、その成績は決して欧米の結果にひけを取らない。しかし、これを胸を張って国際的に報告できるかと自問すると、データの質、プロトコール違反など現時点の国際レベルからみて、たくさん問題が含まれている。優れた治療法による優れた治療成績として国際的な標準治療たるべく目標を掲げるならば、国際基準に基づくグループスタディが必須である。現在 98 プロトコールを基礎とした新たな第二相臨床試験を開始すべく金子班、牧本班が連携して作業を進めている。protocol violation なしにきちんとした臨床試験ができれば、わが国の治療成績は、新たな治療薬の導入がなくとも十分向上すると確信しており、全国の小児腫瘍医の協力に期待している。

●文 献

- 1) 小児がん学会神経芽腫委員会報告：平成 13 年度神経芽細胞腫マスの報告。2003 年 11 月
- 2) 家原知子, 杉本 徹, 水田祥代・他：乳児神経芽腫における治療の軽減。小児外科 33 (11) : 1221-1227, 2001
- 3) Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC et al.: Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med 14:341 (16) : 1165-1173, 1999
- 4) Sawaguchi S, Kaneko M, Uchino J et al.: Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy: A report from the

- Study Group of Japan. Cancer 66:1879-1887, 1990
- 5) Iwafuchi M, Utsumi J, Tsuchida Y et al.: Evaluation of patients with advanced neuroblastoma more than 5 years after initiation of intensive Japanese protocol: A report of the Study Group of Japan for Advanced Neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 27 (6) : 515-520, 1996
 - 6) Kaneko M, Tsuchida Y, Uchino J et al.: Treatment results of advanced neuroblastoma with the First Japanese Study Group Protocol. J Pediatr Hematol/Oncol 21 (3) : 190-197, 1999
 - 7) Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H et al.: Intensified chemotherapy increases the survival rates in state 4 neuroblastoma with MYCN amplification. J Pediatr Hematol/Oncol 24 (11) : 613-621, 2002
 - 8) Suita S, Zaizen Y, Kaneko M et al.: What is the benefit of aggressive chemotherapy for advanced neuroblastoma with N-myc amplification?: A report from the Japanese Study Group for the treatment of advanced neuroblastoma. J Pediatr Surg 29 (6) : 746-750, 1994
 - 9) Kawa K, Ohnuma N, Kaneko M et al.: Long-term survivors of advanced neuroblastoma with MYCN amplification: A report of 19 patients surviving disease-free for more than 66 months. J Clin Oncol 17 (10) : 3216-3220, 1999
 - 10) Ohnuma N, Takahashi H, Kaneko M et al.: Treatment combined with bone marrow transplantation for advanced neuroblastoma: An analysis of patients who were pretreated intensively with the protocol of the Study Group of Japan. Med Pediatr Oncol 24 (3) : 181-187, 1995
 - 11) 平井みさ子, 金子道夫: 98 プロトコールによる進行神経芽腫の治療成績の解析 2003. 年度第2回金子班班会議報告, 2003
 - 12) Mugishima H, Matsunaga T, Yagi K et al.: Phase I study of irinotecan in pediatric patients with malignant solid tumors. J Pediatr Hematol/Oncol 24 (2) : 94-100, 2002
 - 13) 金子道夫, 麦島秀雄, 松永正訓・他: 小児に対するCPT-11 (irinotecan) の第1相臨床試験. 小児外科 33 (11) : 1166-1173, 2001

著者連絡先

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1
 筑波大学臨床医学系小児外科
 金子道夫

第28回日本小児皮膚科学会・学術大会のお知らせ

会 期 平成16年5月29日(土)～30日(日)
 会 場 ビッグパレットふくしま
 福島県郡山市安積町日出山字北千保19-8
 会 頭 金子史男(福島県立医科大学医学部皮膚科)
 副会頭 鈴木 仁(福島県立医科大学医学部小児科)
 連絡先 〒960-1295 福島県福島市光が丘
 福島県立医科大学医学部皮膚科学教室 中村晃一郎
 TEL 024-547-1309(直通) FAX 024-548-5412
 e-mail: jspd-office@umin.ac.jp
 HP: http://square.umin.ac.jp/shouni28/

Expression of the Human Telomerase Reverse Transcriptase in Pheochromocytoma and Neuroblastoma Tissues

KAZUMASA ISOBE, TORU YASHIRO*, SAKIE OMURA, MICHIO KANEKO**, SETSUKO KANEKO**, HIROSHI KAMMA***, ICHIRO TATSUNO#, KAZUHIRO TAKEKOSHI, YASUSHI KAWAKAMI AND TOSHIAKI NAKAI

Department of Clinical Pathology, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan

**Department of Breast-Thyroid Endocrine Surgery, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan*

***Department of Pediatric Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan*

****Department of Pathology, Institute of Basic Medical Science, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575, Japan*

#Department of Clinical Cell Biology, Graduate School of Medicine, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuou-ku, Chiba 260-8655, Japan

Abstract. In an effort to clarify the role of telomerase in the pathogenesis of pheochromocytomas and neuroblastomas, and to test whether its component could serve as a marker of malignancy, we measured telomerase reverse transcriptase (TERT) mRNA in 31 human pheochromocytoma tissue samples (5 malignant, 23 benign and 3 suspected malignant) and 16 neuroblastoma tissues (9 unfavorable and 7 favorable). All cases were classified by both the clinical course and histopathological examination. Malignancy was defined as the presence of metastasis and/or extensive local invasion. TERT mRNA was determined by nested PCR and a real-time PCR system (LightCycler). By nested PCR methods, 5 of the 5 malignant pheochromocytoma samples were positive (sensitivity = 100%), and 21 of 23 benign pheochromocytoma samples were negative (specificity = 91%) in pheochromocytomas. Four out of five malignant tumors were positive for either hTERT expression or Ki-67/MIB-1 immunoreactivity. In the neuroblastoma tissues, 9 of the 9 unfavorable samples were positive (sensitivity = 100%), and only 2 of 7 favorable samples were negative (specificity = 29%). We also determined the expression of the hTERT mRNA by real-time PCR to quantitate the mRNA. The mean values of hTERT mRNA by real time PCR in benign and malignant pheochromocytomas were 2 and 26 arbitrary units (AU), respectively. The difference was not significant by the U-test. The mean values of hTERT mRNA in favorable and unfavorable neuroblastoma were 203 and 497 AU, respectively. This difference was also not significant (U-test). N-Myc mRNA expression correlated with the expression of hTERT mRNA in the neuroblastoma samples ($r = 0.534$, $p = 0.0317$). Thus, hTERT mRNA might be a potential marker for estimating the malignancy of pheochromocytomas and neuroblastomas.

Key words: hTERT, mRNA, Malignancy, Pheochromocytoma, Neuroblastoma

(Endocrine Journal 51: 47–52, 2004)

TELOMERASE is a ribonucleoprotein complex that extends and maintains the telomeres by the addition of telomeric repeats to the ends of linear chromosomes. The human telomerase complex includes telomerase RNA (hTR), human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and a number of associated proteins. hTR

acts as a template for the telomeric repeat synthesis, and hTERT has reverse transcriptase activity [1, 2]. It has been suggested that telomerase activity may be a useful marker in cancer diagnosis because it can be detected in approximately 85% of the most common cancers [3, 4]. Moreover, telomerase activity is a useful indicator for determining the degree of malignancy in several tumors. For example, in meningiomas and similar tumors, it is difficult to distinguish benign tumors from malignant ones by histopathological examinations [5, 6]. In these tumors, the levels of telomerase activity correlate with the prognosis of

Received: July 22, 2003

Accepted: October 6, 2003

Correspondence to: Dr. Kazumasa ISOBE, Department of Clinical Pathology, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, 305-8575, Japan

the patients.

hTR is sometimes expressed in cells without telomerase activity; in contrast, the degree of telomerase activity correlates with the expression of hTERT. Thus, most somatic human cells lack telomerase activity because they do not express the hTERT gene, but most cancer cells express hTERT [7]. Therefore, detection of hTERT mRNA expression by RT-PCR analysis is also useful for cancer diagnosis.

Pheochromocytomas are tumors arising most often from the adrenal medulla. There is no tumor excretory profile that is predictive of malignancy. Reliable prediction of malignant behavior on the basis of histopathology is also notoriously difficult. DNA ploidy can be a helpful indicator, although aneuploidy *per se* is not considered to be a specific marker of malignancy. Mutations in the p53 gene have been reported to occur frequently in cases of benign pheochromocytoma [8]. Kinoshita *et al.* and Kubota *et al.* [9, 10] reported that analysis of telomerase activity is a powerful tool for the diagnosis of malignant pheochromocytoma. On the other hand, Bamberger *et al.* [11] reported that telomerase activity may not be a suitable marker for malignancy in the adrenal gland.

Neuroblastoma is an embryonic tumor of neuroectodermal cells derived from the neural crest and destined for the adrenal medulla and sympathetic nervous system. Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumor in children. Its biological behavior is notoriously unpredictable and comprises a spectrum ranging from spontaneous regression to rapid metastatic spread. Hiyama *et al.* [12] reported the clinical utility of telomerase as a prognostic marker in neuroblastoma.

In this report we present our study of the expression of the hTERT mRNAs in pheochromocytoma and neuroblastoma tissues.

Materials and Methods

Tissue samples

Freshly excised samples of pheochromocytoma tissues and neuroblastic tumors were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

A total of 31 pheochromocytoma tissues (5 malignant, 23 benign, and 3 suspected malignant) and 16 neuroblastoma tissues (9 unfavorable and 7 favorable)

were obtained. All cases were classified by the clinical course and the histopathological examination as reported by Linnolia *et al.* [13]. Malignancy was defined as the presence of metastasis and/or extensive local invasion. A signed informed consent was obtained from patients wanting to participate in the study. This study was approved by the ethics committee of the Medical Faculty of Tsukuba University, Tsukuba, Japan.

The no. 5 sample of pheochromocytomas was diagnosed as malignant by the clinical course after the detection of hTERT mRNA. Cases 6, 7 and 8 are suspected malignant based on pathological criteria, but they did not have metastases during the study period.

Two regions of the samples were assayed by nested PCR.

RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from frozen tumor samples by the guanidine thiocyanate-phenol-chloroform method, using isogen reagent (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan). Total RNA (1 μg) was used for the synthesis of single-strand complementary DNA (cDNA) with random primer and reverse transcriptase (Takara, Tokyo, Japan) in a total volume of 20 μl , and then 1 μl was used as a template for PCR. The primers used in this study for hTERT mRNA are shown in Table 1. As positive controls for PCR, the primers for GAPDH were used. For hTERT, nested PCR methods were performed with the inner primers. The designed primers are as reported by Nakamura *et al.* [2]. The thermal cycler profile consisted of an initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles with a 30 s denaturation at 94°C , a 30 s annealing of primers at 55°C , and 60 s extension at 72°C . The second steps

Table 1. Primers and probes used in this study

Name	Sequence (5'-3')
hTERT-of	AGC CAG TCT CAC CTT CAA CCG C
hTERT-or	GGA GTA GCA GAG GGA GGC CG
hTERT-if	GCT GGG AGG AAC ATG CGT CG
hTERT-ir	GGG AGG CCG TGT CAG AGA TG
N-Myc-891F	CGA CCA CAA GGC CCT CAG TA
N-Myc-1031R	ACA GCC TTG GTG TTG GAG GA
N-Myc-probe	5'-FAM-TCA TCT GAA TCG CTC AGG GTG TCC T3'-TMR

of nested PCR for hTERT were performed using 1 μ l of products from the first PCR according to the same program. After PCR, 5 μ l aliquots of the products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide.

Quantitation of hTERT mRNA

The numbers of hTERT (+ α + β) mRNA molecules were determined using 0.05–0.1 μ g of total RNA from each sample by real-time RT-PCR using the LightCycler and LightCycler TeloTAGGG hTERT Kit from Roche Molecular Biochemicals according to the manufacturer's instructions. The primers and fluorescent probes in this assay are designed so that only the potentially functional + α + β form of hTERT is measured. The assay allows determination of the relative telomerase expression levels by comparing them to the expression level of the housekeeping gene porphobilinogen deaminase (PBGD). The unit shows hTERT mRNA expression divided by PBGD mRNA expression.

Quantitation of N-Myc mRNA

The PCR reaction mixture was prepared using a Taqman PCR master reagent kit (PE Applied Biosystems, CA) according to the manufacturer's instructions. The thermal cycling protocol was 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, which was followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Thermal cycling, fluorescence detection, and data analysis were performed on the ABI PRISM 7700 Sequence Detector using the software provided with the instrument. The sequences of synthetic oligonucleotide primers and probe are shown in Table 1. The expression of N-Myc mRNA was normalized by the expression of the housekeeping gene GAPDH. For GAPDH detection, we used Taqman GAPDH Detection Reagents (PE Applied Biosystems, CA).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analyses of the proportion of Ki-67/MIB-1 immunoreactive cells were performed using a Simple-stain method (Nichirei, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. Paraffin sections 5 μ m thick were incubated overnight at +8°C with monoclonal antibodies against Ki-67 (clone MIB-

1, diluted 1:200; Immunotech, Marseille, France). To intensify the immunoreaction, the sections were autoclaved at 121°C for ten minutes. Known positive samples of breast cancer tissue were included as positive controls.

The proliferative activity, given as the percentage of Ki-67/MIB-1 immunoreactive cells, was calculated with the aid of an 10 \times 10-square ocular grid. To estimate the cell density of each tumor section, the total number of cells (positive and negative) was counted in one row of the grid (10 squares) and multiplied by 10. Then the total number of immunoreactive cell nuclei was recounted at 10 different locations in the areas with the highest proliferative activity.

Statistical analysis

Statistical significance was determined by the Mann-Whitney U-test and Pearson's correlation test. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

hTERT mRNA expression in pheochromocytomas

The tumor weights or sizes, malignancy, the expressions of hTERT mRNA and Ki-67 and follow up periods in 31 pheochromocytomas are listed in Table 2.

By the nested PCR methods, 5 of the 5 malignant samples were positive (sensitivity = 100%), 21 of 23 benign samples were negative (specificity = 91%) for hTERT mRNA detection.

We also determined the expression of the hTERT mRNA by real-time PCR. The mean values of hTERT mRNA by real time PCR in benign and malignant pheochromocytomas were 2 and 26 AU, respectively. The difference was not significant by the U-test.

MIB-1/Ki-67 Immunoreactivity in pheochromocytomas

All of the benign and suspected malignant tumors showed <1% proliferative activity, as measured by Ki-67/MIB-1 staining (Table 2). Four of 4 tumors classified as malignant showed \geq 1% proliferative activity. However, strongly increased proliferative activity was observed in only one sample.

Table 2. Expression of hTERT mRNAs in the 31 pheochromocytomas

No.	Age/Sex	Diagnosis	weight (g) or size (cm)	pathology	hTERT mRNA	Ki-67	Follow-up (mo)	Relapse location
1	15/M	pheo	39 g, 5 × 4 × 3.5 cm	M	+	1%	death	local recurrence
2	27/M	pheo	193 g	M	+	5%	death	liver, bone
3	51/M	para	φ2 cm	M	+	22%	death	liver
4	76/M	pheo	φ4 cm	M	+	ND	death	local recurrence
5	61/F	pheo	700 g, 12.5 × 10 × 11 cm	?	+	7%	73	liver
6	48/M	para, vRH	5.5 × 5.0 × 3.0 cm	?	-	<1%	83	
7	49/M	pheo	643 g, 11.0 × 7.5 × 3.5 cm	?	+	<1%	35	
8	33/F	pheo	16 g, 3.6 × 4.0 × 2.5 cm	?	-	<1%	27	
9	72/M	pheo	53 g, φ3.5 cm		-	<1%	56	
10	62/F	pheo	5 × 5.5 × 6 cm		+	<1%	116	
11	55/M	pheo	18.5 g, 4.0 × 2.2 cm		-	<1%	61	
12	37/F	MEN IIA	7 × 4 × 3 cm		-	<1%	76	
13	70/M	pheo, diabetes	5 × 4 × 3 cm		-	<1%	37	
14	49/F	pheo, hypertension	5.5 × 5.0 × 4.5 cm		-	<1%	45	
15	33/F	para	φ2 cm		-	<1%	30	
16	24/M	para	58 g, 7.5 × 6.5 × 2.5 cm		-	<1%	128	
17	47/M	para, diabetes	5 × 6 cm		-	<1%	49	
18	50/F	pheo	120 g, 7.5 × 5.0 × 4.5 cm		-	<1%	86	
19	61/F	pheo	30 g, 5.0 × 3.5 × 4.0 cm		-	<1%	78	
20	23/F	pheo	17 g, 2.8 × 3.0 × 2.5 cm		-	<1%	70	
21	58/M	pheo	57 g, 2.6 × 4.3 × 5.8 cm		+	<1%	70	
22	61/M	pheo	4.5 × 2.5 × 3.5 cm		-	<1%	68	
23	36/F	pheo	3 × 3 × 2 cm		-	<1%	50	
24	30/F	pheo	80 g, 4 × 5 × 6 cm		-	<1%	50	
25	28/M	pheo	50 g, 3.5 × 5.3 × 4.0 cm		-	<1%	41	
26	49/M	para	49 g, 3.0 × 3.6 × 4.0 cm		-	<1%	41	
27	51/M	pheo	5 × 5 × 6 cm		-	<1%	39	
28	67/M	pheo	18g, 3.3 × 2.5 × 2.8 cm		-	<1%	29	
29	42/F	pheo			-	<1%	24	
30	30/M	pheo, diabetes	7.5 × 6.0 × 3.8 cm		+	<1%	24	
31	41/M	pheo, hyperlipidemia	18 g, 4.0 × 3.0 × 2.5 cm		-	<1%	23	

pheo = pheochromocytoma; para = paraganglioma; vRH = von Recklinghausen disease; M = malignant; ND = not done

hTERT mRNA expression in neuroblastomas

Age at diagnosis, status, Shimada classification, the expressions of hTERT mRNA and its isoforms, and N-myc mRNA in 16 neuroblastomas are listed in Table 3. Eight of 9 unfavorable neuroblastomas were diagnosed in patients older than one year.

By the RT-PCR methods, 9 of the 9 malignant samples were positive (sensitivity = 100%), and only 2 of 7 benign samples were negative (specificity = 29%) in the neuroblastoma tissues we examined.

We also determined the expression of the hTERT mRNA by real-time PCR in the samples. The mean values of hTERT mRNA by real time PCR in benign and progressive neuroblastoma were 203 and 497 AU, respectively. This difference was not significant (U-test).

N-Myc gene amplification is a prognostic marker [14], so we examined the correlation between the expressions of N-Myc mRNA and hTERT mRNA. The N-Myc mRNA expression correlated with hTERT mRNA expression ($r = 0.534$, $p = 0.0317$).

Discussion

The hTERT mRNA detection by the nested PCR was satisfactory for discriminating malignant tumors in the pheochromocytomas we examined, but the full-length type of hTERT mRNA by real-time PCR was less informative because of lower sensitivity.

The no. 5 case of pheochromocytoma was diagnosed as malignant due to development of metastasis after the examination of hTERT mRNA expression.