

2. Ha-ras and trk A expression in NBs

We first reported that the Ha-ras expression associated closely with the clinical outcome of the patients [5,6]. The expression is evaluated immunohistochemically and the specific antibody to Ha-ras p21 was originally developed against a peptide of the C-terminal region [5,7]. Recently, a commercial antibody [Ha-ras(C-20), Santa Cruz, CA, USA] is available with same specificity to our antibody. We reported that the immunohistochemical expression of trk A also associated closely with clinical outcome of the patients [8] and was independent from the Ha-ras expression. Moreover, the combination of Ha-ras and trk A expression was useful to discriminate biological behavior of NBs [3]. Both Ha-ras and trk A genes associate closely with differentiation and apoptosis mechanism in NB cells, however, they function in different ways to cell death [9,10].

3. Evaluation of specificity and sensitivity of markers to clinical outcome

We focused the three markers, MYCN gene status, histopathology according to International Neuroblastoma Pathological Classification (INPC) [11] and Ha-ras/trk A expression for predicting clinical outcome of the patients [12]. First we evaluated retrospectively their predictive specificity

and sensitivity to the clinical outcome (Fig. 1). The objective patients were diagnosed clinically (non-mass); 45 patients had clinical events such as progress, relapse and/or death and 42 were event-free survivors for more than 2 years after the diagnosis. Specificity to the poor clinical outcome was 86%(19/22) in NBs with MYCN amplification, 76%(25/33) in NBs with INPC unfavorable histology, and 75% (27/36) in NBs with low Ha-ras/trk A expression. However, the sensitivity to all 45 cases with poor clinical outcome were 42%(19/45), 55%(25/45), 60%(27/45) in NBs with MYCN amplification, INPC unfavorable histology and in low Ha-ras/trk A expression, respectively. Prognostic prediction by using one marker was insufficient because of the low sensitivity.

Therefore the three markers were combined for predicting risk to progress. NBs with any of the three markers, MYCN amplification, INPC unfavorable histology or low Ha-ras/trk A expression, increased the sensitivity to poor clinical outcome of the patients to 84% (38/45) and the specificity to poor clinical outcome was 73% (38/52).

On the other hand, NBs with all of three markers, such as ‘single copy of MYCN’ and ‘INCP favorable histology’ and ‘high Ha-ras/trk A expression’, showed quite favorable outcome of the patients. The specificity of the NBs to the good clinical outcome was 88%(22/25). We could predict the risk with high sensitivity and specificity.

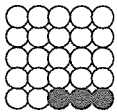

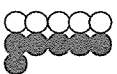

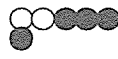






INPC Ha-ras/Trk A expression		Favorable Histology			Unfavorable Histology		
		High	Intermediate	Low	High	Intermediate	Low
M Y C N g e n e	Not amplified	 EFS: 88%	 EFS: 60%	 EFS: 45%	 EFS: 25%	 EFS: 33%	 EFS: 33%
	Amplified	-	 EFS: 50%	 EFS: 0%	 EFS: 0%	 EFS: 33%	 EFS: 10%

Fig. 1. Clinical outcome of the patients with neuroblastoma. All neuroblastomas were diagnosed clinically (non-mass NBs). Open circle presents an event-free survivor and closed circle presents a patient with clinical events, such as death, relapse and progress. Abbreviations: INPC, International Neuroblastoma Pathological Classification; EFS, event-free survival rate.

4. Intervention in early stages salvages the patients with risk to progress

In our data base there were 94 NBs with at least one of the risk markers mentioned above. The event-free survival of the patients was 43% (40/94). Even with the cytogenetic markers, event-free survival was 86% in the patients with the localized NBs (stage I or II). On the other hand, the survival was 35% in the patients with advanced NBs (stage III, IVs or IV). This finding reveals that intervention in early stages improves clinical outcome of the patients, even if the NBs have risk to progress.

5. Clinical risk of the NBs defined by multivariate markers

Based on the results mentioned above, the 'high risk' is defined by NBs in any stage with any of following markers, MYCN amplification or INPC unfavorable histology or low Ha-ras/trk A expression. The 'low risk' is defined by NBs with all another markers, single copy

of MYCN and INPC favorable histology and high Ha-ras/trk A expression and localized tumor. The remaining NBs are defined in 'intermediate risk' category.

6. Estimation of biological profile in NBs detected through infantile mass-screening program

The Japanese mass-screening program was introduced in 1984 for infants at 6 months of age. This program detected 2366 NBs (mass-NBs) until 2001. The event-free survival of patients is 98%. There have been controversial discussion about benefit of the mass-screening. Quebec [13] and German [14] studies reported that the mass-screening provided no effect on mortality caused by NBs. Recent Japanese nation-wide study showed significant reduction of mortality in mass-screening group comparing with children who did not have the mass-screening [15]. The biological analysis of the mass-NBs has not been conclusive. We have been evaluating the biological property of the 248 mass-NBs and following their clinical outcome. They were about 10% of all mass-NBs in Japan. Based on criteria in the

INPC ^a & Ha-ras/trk A ^b Stage	"Favorable" ^a			"Unfavorable" ^a			total □ (EFS/UO) ^c
	"High" / "Intermediate" / "Low" ^b	"High" / "Intermediate" / "Low" ^b	"High" / "Intermediate" / "Low" ^b	"High" / "Intermediate" / "Low" ^b	"High" / "Intermediate" / "Low" ^b	"High" / "Intermediate" / "Low" ^b	
I							99 □ (94/5)
II							78 □ (73/5)
IVs							12 □ (12/0)
III							46 □ (41/5)
IV							13 □ (9/4)
total □ (EFS/UO) ^c	138 □ (133/5)	55 □ (51/4)	36 □ (32/4)	6 □ (5/1)	4 □ (3/1)	9 □ (5/4)	248 □ (229/19)

Fig. 2. Biological profiles of 248 mass-NBs. (a) International neuroblastoma pathological classification (INPC), (b) H-ras/trk A expression, c; number of event-free survival (EFS) and patients with unfavorable outcome (UO). Patients outcome: small open circle presents a event-free survivor and large one presents 10 event-free survivors. Closed circle is a deceased case. A downward closed triangle is a case with relapse NB and a upward closed triangle is a case with progressive NB. Capital 'N' presents MYCN amplification with more than 10 copies and small 'n' presents the amplification with 3–9 copies.

non-mass NBs mentioned above, the 248 mass-NBs were classified into risk categories. Seventy-one percent of them were detected as localized tumors (stage I and II) and 29% were in stages III, IVs and IV. The MYCN amplification was detected in only 13 mass-NBs (5%). The distribution of mass-NBs with MYCN amplification and the better event-free survival [69% (9/13)] of the patients might suggest the benefit of early detection and intervention through the mass-screening. Total 62 NBs (25%) were evaluated to have high-risk property; 55 had INPC unfavorable histology or low Ha-ras/trk A expression and seven had only the MYCN amplification as a risk marker. Among localized 103 NBs (stages I, II) with INPC favorable histology and high Ha-ras/trk A expression, 100 NBs (40%) were classified as *low-risk property* and the MYCN amplified 3 NBs moved to high risk group. The remaining 86 NBs (35%) in other categories were classified to be *Intermediate risk* (Fig. 2).

7. Conclusion

The multivariate evaluation showed the diversity of non-mass- and mass-NBs with variety risk to progress. The cytogenetic markers, MYCN, INPC histology and Ha-ras/trk A expression could predict the risk with high sensitivity and specificity.

Acknowledgements

This study was supported by Grants-in-aid for Cancer Research (13–19, 16–17) and for Scientific Research (H16-Clinical Cancer Research-039) from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and by grants (14370250, 15659249) from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture

References

- [1] J.M. Maris, K.K. Matthay, Molecular biology of neuroblastoma, *J. Clin. Oncol.* 17 (1999) 2264–2279.
- [2] R.C. Seeger, G.M. Brodeur, H. Sather, A. Dalton, S.E. Siegel, K.Y. Wong, D. Hammond, Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas, *N. Engl. J. Med.* 313 (1985) 1111–1116.
- [3] T. Tanaka, T. Sugimoto, T. Sawada, Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/trk A gene expression, *Cancer* 83 (1998) 1626–1633.
- [4] G.M. Brodeur, Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 203–216.
- [5] T. Tanaka, D.J. Slamon, H. Shimoda, C. Waki, Y. Kawaguchi, Y. Tanaka, N. Ida, Expression of Ha-ras oncogene products in human neuroblastomas and significant correlation with patient's prognosis, *Cancer Res.* 48 (1988) 1030–1034.
- [6] T. Tanaka, D.J. Slamon, H. Shimada, H. Shimoda, T. Fujisawa, N. Ida, R.C. Seeger, A significant association of Ha-ras p21 in neuroblastoma cells with patient prognosis, *Cancer* 68 (1991) 1296–1302.
- [7] T. Tanaka, D.J. Slamon, M.J. Cline, Efficient generation of antibodies to oncoproteins by using synthetic peptide antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 3400–3404.
- [8] T. Tanaka, E. Hiyama, T. Sugimoto, T. Sawada, M. Tanabe, N. Ida, Trk A gene expression in neuroblastoma: the clinical significance of an immunohistochemical study, *Cancer* 76 (1995) 1086–1095.
- [9] A. Nakagawara, M. Arima-Nakagawara, N.J. Scavarda, C.G. Azar, A.B. Canter, G.M. Brodeur, Association between high levels of expression of the trk gene and favorable outcome in human neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 847–854.
- [10] C. Kitanaka, K. Kato, R. Ijiri, K. Sakurada, A. Tomiyama, K. Noguchi, et al., Increased ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression, *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (2002) 358–368.
- [11] H. Shimada, I. Ambros, L.P. Dehner, J. Hata, V.V. Joshi, B. Roald, et al., The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system), *Cancer* 86 (1999) 364–372.
- [12] T. Tanaka, T. Iehara, T. Sugimoto, M. Hamasaki, S. Teramukai, Y. Tsuchida, et al., in: B. De Bernardi, A. Garaventa et al. (Eds.), *Multivariate evaluation for heterogeneous neuroblastomas Advances in Neuroblastoma Research, Eleventh Conference, Genova (2004)*, p. 64.
- [13] W.G. Wood, R.M. Gao, J.J. Shuster, L.L. Robinson, M. Bernstein, S. Weitzman, et al., Lemieux: Screening of infants and mortality due to neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 1041–1046.
- [14] F.H. Schilling, C. Spix, F. Berthold, R. Erttmann, N. Fehse, B. Hero, et al., Neuroblastoma screening at one year of age, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 1047–1053.
- [15] K. Hayashi, T. Fujita, K. Katanoda, T. Sobue, M. Nishi, K. Yamamoto, in: B. De Bernardi, A. Garaventa et al. (Eds.), *Effectiveness of Mass-screening program on neuroblastoma mortality in 1995–2000 birth cohort of Japan: nationwide neuroblastoma mortality study Advances in Neuroblastoma Research, Eleventh Conference, Genova (2004)*, p. 93.

神経芽腫統一プロトコールにおけるシスプラチンの腎障害 —自験例における検討

Renal toxicity by cisplatin in the induction chemotherapy for neuroblastoma in Japan-single institute experience

大曾根眞也, 細井 創, 家原 知子, 土屋 邦彦, 杉本 徹

Shinya OSONE, Hajime HOSOI, Tomoko IEHARA

Kunihiko TSUCHIYA, Tohru SUGIMOTO

要 旨

現在の神経芽腫統一治療プロトコールにおけるシスプラチン (CDDP) の腎障害を検討することを目的に, 自験例での血清クレアチニン, クレアチニンクリアランスの経過を検討した. CDDP は総投与量に依存して腎機能を低下させ, 450mg/m² 以上で有意差を認めた. 腎障害を考慮すると, 神経芽腫の化学療法における CDDP の総投与量は 450mg/m² までを目安とすることが望ましいと考えられた.

Key words : 腎障害, 神経芽腫, クレアチニン, クレアチニンクリアランス, シスプラチン

renal toxicity, neuroblastoma, creatinine, creatinine clearance, cisplatin

はじめに

シスプラチン (CDDP) は, 進行神経芽腫に対する化学療法において重要な地位を占める抗腫瘍剤である. しかし, CDDP による用量依存性の腎障害は, しばしば治療遂行の妨げとなる. 本邦では, 進行神経芽腫統一プロトコールにおいて, 1998年から⁹⁵A₃および⁹⁵newA₁レジメンが, また乳児神経芽腫統一プロトコールにおいては1998年からD₂レジメンが, それぞれ用いられている. 特に⁹⁵A₃レジメンは, CDDPが1コースあたり125mg/m²と増量されており, 腎障害については十分な注意が必要である. 今回我々は, 現行のこ

れら統一プロトコールを用いた患児における腎機能の経過を検討した.

対象と方法

当科で治療した神経芽腫症例のうち, 2003年11月までに現行の神経芽腫統一プロトコールである⁹⁵A₃, ⁹⁵newA₁, D₂レジメンを施行した11例を対象とした (表1). いずれの症例においても, CDDP投与前日からプロトコールに指定された通りhydrationを行い, CDDPは24時間持続点滴静注で投与した. 一部の症例では, 腎障害, 出血性膀胱炎などの有害事象のため, 途中から抗腫瘍剤の投与量が改変されていた. 各症例の, 化学療法各コース前後における血清クレアチニン (Cre) 値および24時間クレアチニンクリアランス (Ccr) を後方視的に検討した. 各症例の血清Creおよび

表1 当施設における ${}_{98}A_3$, ${}_{98}newA_1$, D_2 施行例

症例	発症年齢	Stage	原発部位	転移部位	MYCN増幅
1	11	4	右副腎	骨, 骨髄	-
2	3	4	左副腎	骨, 骨髄	-
3	3	4	右副腎	骨	+
4	10M	4	後腹膜	骨, 骨髄, リンパ節	-
5	4	4	左副腎	骨, 骨髄, リンパ節	-
6	4	4	右副腎	骨, 骨髄	+
7	11M	3	後腹膜	なし	+
8	10M	1	右副腎	なし	+
9	1M	1	左副腎	なし	+
10	11M	4	胸部	骨	-
11	1	4	後腹膜	骨	-

表2 対象症例の治療経過

症例	施行回数			CDDP 総投与量 (mg/m ²)	発症時 腎合併症	手術による 腎損傷	超大量 化学療法	転帰(**)
	${}_{98}A_3$	D_2	${}_{98n}A_1$					
1	6	0	0	750	-	-	*	死亡(38)
2	7	0	0	875	腎性高血圧	乳び腹水	*	生存(61)
3	5	0	1	715	-	-	L-PAM/TEPA	生存(20)
4	4	0	0	500	-	-	-	死亡(47)
5	2	0	5	700	左重複尿管	-	L-PAM/TEPA BU/TEPA	生存(36)
6	2	1	0	250	-	-	L-PAM/TEPA BU/TEPA	生存(16)
7	3	2	0	495	-	右腎動脈損傷	L-PAM/TEPA	死亡(25)
8	1	2	0	250	-	-	Hi-MEC	生存(24)
9	0	6	0	360	左水腎症	-	Hi-MEC	生存(34)
10	0	6	0	360	-	-	-	生存(45)
11	0	4	4	600	-	-	-	生存(39)

* : 腎障害のため, 超大量化学療法を断念.

** : 括弧内は, 死亡例では診断後死亡までの月数, 生存例では 2005 年 1 月時点での診断後月数を示す.

表3 CDDP 総投与量による腎機能の差異

CDDP 総投与量	450mg/m ² 未満	450mg/m ² 以上	
Cre(mg/dl)	0.23±0.06 (n=55)	0.44±0.13 (n=14)	p<0.001
Ccr(ml/分)	130.6±39.2 (n=16)	68.2±22.0 (n=11)	p<0.001
Ccr<60ml/分	0/16 (0%)	6/11 (55%)	p<0.01

Ccr 値と CDDP 総投与量との相関関係について、Spearman の順位相関係数の検定を用いて検討した。また、各症例の血清 Cre および Ccr 値を CDDP 総投与量 450mg/m² 未満群と 450mg/m² 以上群の 2 群に分け、両群の血清 Cre および Ccr 値の平均値について、Welch の t 検定を用いて有意差の有無を検討した。さらに、両群で Ccr が 60ml/分以下であった割合について、Mann-Whitney 検定を用いて有意差の有無を検討した。

結 果

当施設において ⁹⁸A₃, ⁹⁸newA₁, D₂ を施行した 11 例を表 1 に示した。International Neuroblastoma Staging System で、2 例が stage 1, 1 例が stage 3, 8 例が stage 4 であった。stage 1 の 2 例のうち 1 例 (症例 8) は、10 ヶ月時に尿路感染症で発見され、右副腎腫瘍全摘出術を施行し、腫瘍組織の MYCN が 10 倍と増幅していることが判明した。もう 1 例 (症例 9) は、他院で 1 ヶ月時に左副腎腫瘍摘出術を受け、その後無治療であったが、3 ヶ月時に皮膚、リンパ節、骨髄に再発し、当施設に入院した、MYCN 増幅例である。原発部位は 11 例中 7 例が副腎、3 例が後腹膜、1 例が胸部であった。

対象症例の治療経過を表 2 に示した。⁹⁸A₃, ⁹⁸newA₁, D₂ の施行回数は表に示すとおりであるが、前述した通り、CDDP を含む抗腫瘍剤の投与量は、腎機能などの状況に応じて変更されている例が含まれていた。CDDP の総投与量は 250 ~ 875mg/m² (中央値 500mg/m²) であった。化学療法開始前に腎合併症の存在した症例は 3 例あった。症例 2 は腫瘍が左腎動脈を圧迫して腎性高血圧を来し、症例 5 は左重複尿管が偶然発見され、症例 9 は腫瘍の尿管圧迫による水腎症を来していた。化学療法開始後の原発腫瘍摘出術の際に腎または腎血管損傷を来し、術後に血清 Cre が上昇した例が 2 例あった。そのうちの 1 例 (症例 2) は、術後に ⁹⁸A₃ を 1 コース追加したところ、急性腎不全を来した。また 11 例中 2 例 (症例 1, 2) では、治療中に腎障害が進行したため超大量化学療法を断念し、通常量の化学療法を継続した。しかし症

例 1 は寛解せず、症例 2 は化学療法終了後 29 ヶ月で骨髄再発した。また当施設では、超大量化学療法として melphalan(L-PAM), etoposide, carboplatin の 3 剤を組み合わせた Hi-MEC 療法を第 1 選択としている。しかし Hi-MEC 療法による腎障害を懸念して、治療中に腎障害が出現した 3 例 (症例 3, 5, 7) で L-PAM と thiotepa(TEPA) または busulfan(BU) と TEPA の 2 剤併用を選択した。

各症例の血清 Cre および Ccr の測定回数は、それぞれ計 69 回、27 回であった。そのうち CDDP 総投与量 450mg/m² 以上での測定回数は、血清 Cre 14 回、Ccr 11 回であった (表 3)。各症例の CDDP 投与量増加にともなう血清 Cre の経過を図 1A に示した。CDDP 総投与量が 450mg/m² 以上になると、各症例の血清 Cre が上昇する傾向を認めた。次に各症例の CDDP 総投与量と血清 Cre を散布図として示した (図 1B)。CDDP 総投与量と血清 Cre とは、相関係数 0.66 で有意な正の相関を示した。また、CDDP 総投与量 450mg/m² 未満群と 450mg/m² 以上群において、血清 Cre の平均値はそれぞれ 0.23 ± 0.06mg/dl, 0.44 ± 0.13mg/dl (平均値 ± 標準偏差, 以下同様) であり、CDDP450mg/m² 以上群の平均血清 Cre が有意に高かった (p < 0.001, 表 3)。

ついで、24 時間 Ccr について、CDDP 総投与量との関係を散布図に示した (図 2)。CDDP 総投与量と 24 時間 Ccr とは、相関係数 -0.66 で有意な負の相関を示した。また、CDDP450mg/m² 未満群と 450mg/m² 以上群とで、24 時間 Ccr の平均値はそれぞれ 130.6 ± 39.2ml/分, 68.2 ± 22.0ml/分であり、CDDP450mg/m² 以上群で有意に低かった (p < 0.001, 表 3)。さらに 24 時間 Ccr が 60ml/分未満であったのは、各群それぞれ 0/16 回 (0%), 6/11 回 (55%) であり、Ccr が 60ml/分未満である率は CDDP450mg/m² 以上群で有意に高かった (p < 0.01, 表 3)。

考 察

CDDP の dose-limiting factor は、用量依存性に出現する腎障害である¹⁾。CDDP による腎障害

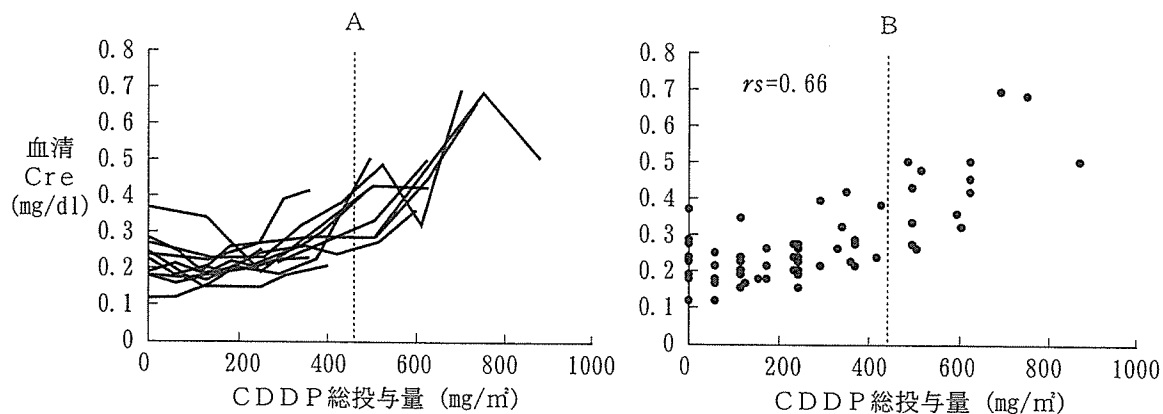


図1 各症例のCDDP総投与量と血清Cre

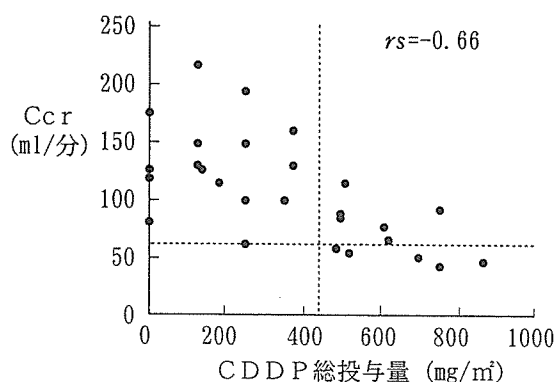


図2 CDDP総投与量とCcr

を軽減するために、hydrationを充分行うこと、CDDP投与を短時間静注でなく持続静注とすることが行われているが^{1,2)}、確実に腎障害を予防できる方法はいまだに確立されていない。一方、CDDPの抗腫瘍効果は用量依存性であるため、現行の進行神経芽腫プロトコルで採用されている $98A_3$ では、1コースあたり $125\text{mg}/\text{m}^2$ と高用量のCDDPを用いて、抗腫瘍効果の増大を狙った。しかしCDDP総投与量の増加による腎障害の出現が懸念された。

実際に現行の進行神経芽腫プロトコルを施行した今回の対象症例でも、CDDPによる用量依存性の腎障害が認められた。特に総投与量 $450\text{mg}/\text{m}^2$ 以上の例では血清Cre上昇やCcr低下を認めた。これは $98A_3$ を施行した例に限らず、 $98A_3$ で腎障害を来したため $98\text{new}A_1$ に変更した例や、 D_2 のみを施行した例においても共通していた。

ただし今回の検討では、一部の症例(症例2, 7)では、手術による腎損傷が腎障害に関与したと考えられるため、CDDPだけに腎障害の原因を帰することができるわけではない。Jaffeらは、小児骨肉腫患児において、CDDPによるCcr低下はCDDP総投与量が $450\text{mg}/\text{m}^2$ 以上になると出現すると報告しているが³⁾、今回の我々の検討でも同様の結果が得られており、小児ではCDDPの総投与量が $450\text{mg}/\text{m}^2$ 以上になると、腎障害のリスクが高まると考えられる。

現在の進行神経芽腫に対する治療戦略は、強力なinduction therapyによって腫瘍を縮小させ、引き続いて原発巣のsecond look operationを行い、最後に微小残存腫瘍に対して、造血幹細胞移植を併用した超大量化学療法を行うというものである⁴⁾。しかしinduction therapyによって腎障害を来すと、超大量化学療法の遂行が困難となる。神経芽腫に対する超大量化学療法として現在広く用いられているHi-MEC療法は、L-PAMとCarboplatinによる腎毒性があり、腎障害をもつ患児では急性腎不全をもたらす危険性もあるため⁵⁾使用しにくい。今回の対象症例でも、治療関連腎障害のため超大量化学療法を断念した症例が2例あった。このうち1例は後に骨髄再発しており、超大量化学療法を施行できなかったことが再発につながった可能性がある。超大量化学療法を安全に施行するためには、induction therapyによる腎障害を最小限に食い止めることが重要となる。従って、induction therapyにおけるCDDP

の総投与量は、前述のJaffeらの報告³⁾と考えあわせると、450mg/m²までとすることが望ましいと思われる。しかしながら、CDDP 総投与量を制限する場合、それによって induction therapy による抗腫瘍効果が減弱して、second look operation を施行できなくなる可能性を考慮しなければならない。この点は、現在の進行神経芽腫に対する治療戦略の限界かもしれない。一部の施設からは、腎機能など臓器予備能が保たれている段階で、早期に超大量化学療法を施行するという治療戦略が報告されているが⁶⁾、これは現在の治療戦略の限界を打破する1つの方向性になりえるかもしれない。

今回の検討では、腎障害の指標として糸球体機能を反映する血清 Cre や Ccr を用いた。これらは腎機能の指標として、現在最も日常的に用いられているものである。しかし、血清 Cre や Ccr を小児悪性腫瘍患児において用いる際には、これらが腎機能を過大評価するリスクを念頭におく必要がある。

Cre は、筋肉で産生されて血中に放出されるため、体内の筋肉量に依存して血清 Cre は変動する。一般的に悪性腫瘍患者では、長期間の安静臥床や化学療法による食思不振のため、筋肉量が減少して血清 Cre が低下する傾向がある¹⁾。従って、血清 Cre を用いて算出する Ccr は、悪性腫瘍患者においては高値となり、腎機能を実際より過大評価する危険性がある。

また、成人の非腫瘍性腎疾患患者を対象とした研究⁷⁾において、糸球体濾過率 (GFR) の gold standard であるイヌリンクリアランス (Cin) と血清 Cre の相関を検討したところ、血清 Cre は Cin が 40-50ml/分まで低下して初めて上昇していた。また、この報告では Cin と Ccr の相関をも検討しており、Cin が 80ml/分以下になると Ccr が Cin よりも高値になる傾向が強まっていた。これは、腎機能低下時に Cre が尿細管から分泌されるためと考えられているが⁷⁾、GFR が低下している際には、Ccr が GFR を過大評価することを示している。Womer ら⁸⁾も、CDDP 投与を受けた小児悪性腫瘍患児を対象とした研究において、GFR の指標と

して信頼性の高い⁵¹Cr-EDTA クリアランスと Ccr を比較検討し、Ccr が GFR を過大評価する危険性を指摘している。

しかしながら、Cin や⁵¹Cr-EDTA クリアランスは、現時点で本邦では施行困難である上に、小児では手技が煩雑で実用的ではない。従って、小児悪性腫瘍患児における GFR の評価には、以上の点に留意して、血清 Cre や Ccr を参考にして評価していくべきである。血清 Cre の解釈においては、図 1A にも示したように、各症例の血清 Cre の 0.1 ~ 0.2mg/dl レベルのわずかな上昇傾向を見逃さないことが肝要である。このような血清 Cre の上昇傾向を認めた場合には、GFR がかなり低下している可能性が高いので、Ccr や^{99m}Tc-DTPA レノグラムを用いて GFR をより厳密に測定し、CDDP の腎障害を早期に発見するように努めるべきである。

文 献

- 1) Kintzel PE: Anticancer drug-induced kidney disorders: Incidence, prevention and management. *Drug Safety*, 24: 19-38, 2001
- 2) Rossi R, et al: Renal involvement in children with malignancies. *Pediatr Nephrol*, 13: 153-162, 1999
- 3) Jaffe N, et al: Renal toxicity with cumulative doses of cis-diamminedichloroplatinum-II in pediatric patients with osteosarcoma. *Cancer*, 59: 1577-1581, 1987
- 4) Tsuchida Y, Kaneko M: Treatment of advanced neuroblastoma: The Japanese experience. *Neuroblastoma*, Brodeur GM, et al eds, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp453-469
- 5) 大曾根真也, 他: 固形腫瘍患児における Ifosfamide の腎毒性について. *小児がん*, 38: 145-150, 2001
- 6) Grupp SA, et al: Tandem high-dose therapy in rapid sequence for children with high-risk neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 18: 2567-2575, 2000
- 7) Shemesh O, et al: Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int*, 28: 830-838, 1985
- 8) Womer RB, et al: Renal toxicity of cisplatin in children. *J Pediatr*, 106: 659-663, 1985

国立成育医療センターでの 放射線治療の取り組み

標準的な 小児がんの診断、 治療構築目指す

国立成育医療センター
放射線診療部

正木英一

北村正幸

野坂俊介

岡田良行

宮崎 治

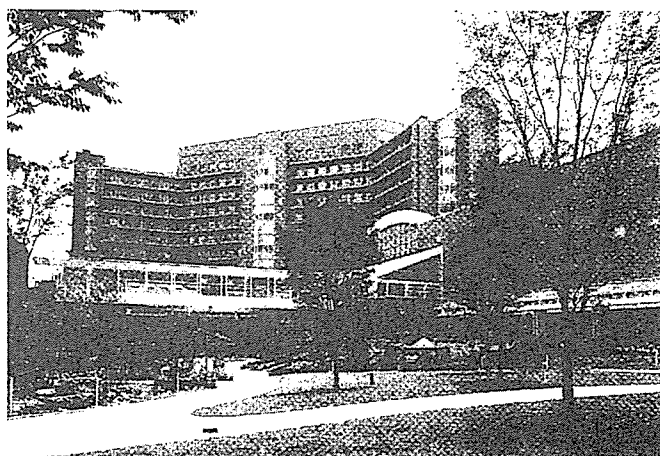
堤 義之

鹿島恭子

宮坂実木子

大楠郁子

岡本礼子



国立成育医療センター外観

国立成育医療センターでは放射線診療部がすべての患者の画像診断を行っており、小児がん患者の診断に必要なモダリティの選択を臨床各科に推挙し、stagingに至る画像診断を行っている。

前施設である国立小児病院時代より行われている腫瘍カンファレンスを、Tumor Boardとして小児腫瘍科の主催のもとに外科、臨床検査部病理および放射線診療部（放射線治療科、放射線診断科）、時に主治医である総合診療部、脳神経外科、耳鼻咽喉科、整形外科、眼科、皮膚科が参加し、放射線診療部カンファレンス室にて、初診時の小児がん患者の診断・stagingを行い、治療法を決定している。

EMBに基づいた放射線治療を他科医に提案できるシステム導入

即ち、患者の初診時から放射線腫瘍医が診断および治療に積極的に関わり、治療のどの時期に放射線治療を採用するかということの適応条件を提示する。また、放射線治療の適応ではない疾患あるいは器管に関して的確な助言を与える。これらのことは、従来より「化学療法が効かなくなったから放射線治療でも行う」といった、放射線腫瘍医からすると放射線治療という武器を有効に使わない考え方を全く払拭することにある。

このTumor Boardを形成することにより、放射線治療を有効な時期に集学的治療に取り入れ、腫瘍線量をなるべく少なくできる治療法を採用することが可能となる。化学療法と同時併用とするのか、化学療法後に放射線治療を行うのかといった判断をEMBに基づいて小児腫瘍医および小児外科医に提案するこのシステムは、小児がんだけではなくがん治療全般で行われるべきものである。

国立成育医療センターで 行っている小児がん放射線治療

1. 小児がん患者への インフォームド・コンセント

国立成育医療センターではチーム医療を治療の主体としているので、その患者および腫瘍に関わる総合診療部、専門診療部の医師および看護師同席で患者家族に治療法の説明と予想されるその結果などを説明する。その後、小児であっても理解できる子どもに対しては、小児腫瘍医とともに年齢に応じた説明を両親

同席のもと行っている。

さらに、両親に対して放射線治療の詳細に関すること、現在の標準的な治療法をPDQ日本語版など教科書的なもの、治療研究であればその資料を提示しながら主治医である小児腫瘍医とともに説明し、理解してもらっている。その場で、放射線晩期合併症についても起こり得ることを説明し、家族が主体的に治療に参加することが小児がんでは重要であることの理解を得ている。

また、治癒した後の患児が社会から受けるであろう事態（精神的あるいは身体的いじめ）から家族が守る必要性など、ソーシャルワーカーを交えての説明になることもある。

2. 患者の固定法

小児がん患児の放射線治療において、放射線治療ベッド上で体動なく照射野の再現性の良いと思われる年齢層は、小学校高学年以上である。その年齢層以下の小児では何らかの処置が必要とされている。通常は鎮静剤の投与によるが多く、1カ月近くもかかる分割照射では主治医である小児科医がその対応に追われて困難性を訴えることが多い。我々は国立小児病院時代から液晶テレビにて患児の好きなアニメーション・ビデオを見せることにより、2歳以上であれば無鎮静で放射線治療ができることを実証してきた。しかし、2歳以下においては麻酔科医が全身麻酔を行い、安全性の確保に努めている。

頭頸部腫瘍であればシエル・マスクを作成し、体幹部固定装置を用いることにより、さらに体動なく安全に放射線治療が行える環境



正木英一（まさき ひでかず）

●47年香川県生まれ。73年慶大医卒。同大医学部訓練医、助手を経て、82年専任講師（医学放射線科学）。同年国立小児病院放射線科医長、02年から国立成育医療センター放射線診療部長として現在に至る。慶大客員助教授、東邦大客員講師兼任。

を整えている（図1）。

これに先立ち、患児が放射線治療室に慣れるよう、放射線治療は痛くないことを実感してもらう「模擬照射」期間を設けている。

3. CTシミュレーション

患児が放射線治療室に慣れたところで、固定装置を装着し、放射線治療室内に設置してあるCTシミュレーション装置にて腫瘍部を撮影する。

参考文献

1 Donaldson SS, Meza J, Breneman JC, et al: Results from the IRS-IV randomized trial of hyperfractionated radiotherapy in children with rhabdomyosarcoma—a report from the IRSG. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51 (3): 718-28, 2001.

2 Freeman CR, Bourgouin PM, Sanford RA, et al: Long term survivors of childhood brain stem gliomas treated with hyperfractionated radiotherapy. Clinical characteristics and treatment related toxicities. The Pediatric Oncology Group. *Cancer* 77(3):555-62. 1996

3 Mandell LR, Kadota R, Freeman C, et al: There is no role for

hyperfractionated radiotherapy in the management of children with newly diagnosed diffuse intrinsic brainstem tumors: results of a Pediatric Oncology Group phase III trial comparing conventional vs. hyperfractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43(5):959-64, 1999.

4 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* 27(5):557-563.1995.

5 Emami B, Lyman J, Brown A, et al: Tolerance of Normal Tissue to Therapeutic Irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21(1):109-122,1991

図1 小児の固定法

子どもの好きなアニメを液晶テレビで見せ、無鎮静で放射線治療を行う。

全脳照射時などでは液晶テレビを尾側に配置し、眼球を下方へ偏位させることにより水晶体保護が可能となる



図10a 脳腫瘍におけるシェル・マスク固定法

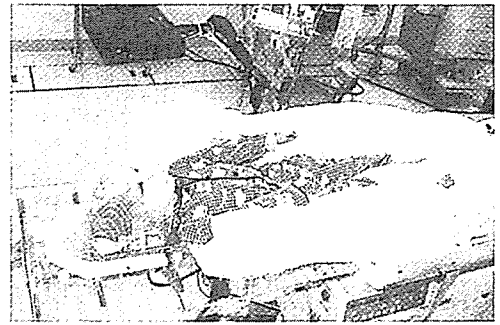


図10b 髄芽腫全脳全脊髄照射時におけるシェル・マスクおよび体幹部固定法 (原発巣への局所照射療法中)

我々の施設を中心に全国の小児がんに関心のある医師に呼びかけ、日本放射線腫瘍学研究会 (Japanese Radiation Oncology Study Group: JROSG) の専門委員会、即ち JROSG 小児放射線治療委員会として横紋筋肉腫放射線治療ガイドラインを策定し、神経芽腫放射線治療ガイドライン案を準備している。この全国治療研究に際し、小児がん放射線治療精度を高めるために放射線治療データセンターを国立成育医療センター放射線

治療研究の成果を踏まえた本邦における治療研究が近年行われてきている。ウィルムス腫瘍は National Wilms' Tumor Study (NWT S)、横紋筋肉腫は International Rhabdomyosarcoma Study (IRS) に準じた全国治療研究が行われており、各々に放射線治療ガイドラインが策定されている。

4. 3D治療計画
CTシミュレーション装置にて撮影したデータを3D治療計画装置に転送し、腫瘍巣をCTイメージに描画する。腫瘍の種類によつて定められているGTVを描画するためには、どの時期の腫瘍巣を放射線治療のターゲットとするのかを理解しなければならぬ。初診時、化学療法後あるいは手術時の腫瘍巣をターゲットとする治療であるのかということである。

5. 各腫瘍における放射線治療法の選択…
EBMを検索、あるいは治療研究への参加

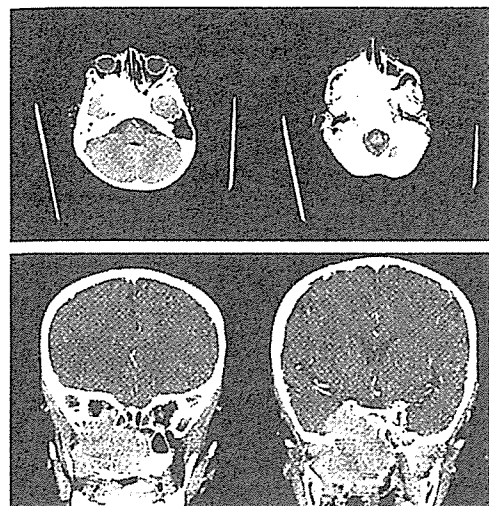
しかしながら、横紋筋肉腫、脳腫瘍に代表される大線量を術後照射線量として要求されている小児がんにおいては、正常組織の障害を少なく、かつ腫瘍巣に線量を多く与えたいとして hyperfractionation あるいは術中照射などが採用されている。 hyperfractionation においては横紋筋肉腫、脳幹部腫瘍で治療研究が行われてきたが、通常分割照射法と比較して優位な効果を得ていない。

神経芽腫で用いる術中照射では、顕微鏡的

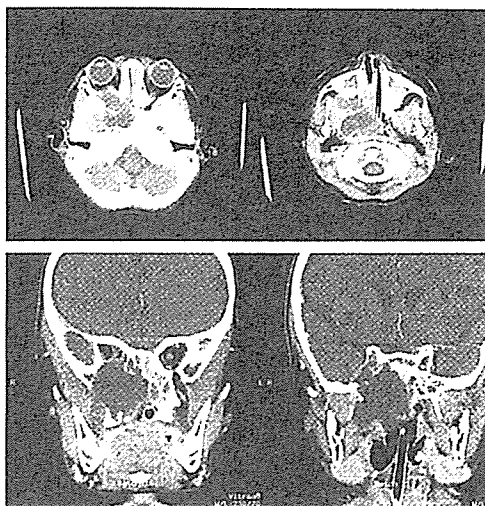
最近の集学的治療ではウィルムス腫瘍、神経芽腫の術後照射線量は晩期合併症を心配する必要がない程度まで減量されてきている。これは化学療法法の dose intensity を上げる試みが近年行われており、骨髄破壊的化学療法までも採用されてきたことによる。

6. 小児がんに対する放射線治療の適応
放射線治療に感受性が高い小児がんが多く、

診療部内に設置した。
このセンターでは放射線治療後に放射線治療症例報告書 C R F を収集し、それを解析することになっているが、セントラル・レビューセンター的な機能として放射線治療プランニング当初に相談を受け付け、リアルタイムにアドバイスが行えるシステムを構築している。また、治療研究が行われていない腫瘍群においては、これらの腫瘍に関しての原典となる Pediatric Oncology Group (POG) などの文献および国立小児病院での経験に基づいたコンサルテーションを行い、小児科医および放射線腫瘍医に理解してもらうこととしている (masaki.h@nccchd.go.jp宛に連絡ください)。



coronal view
図2a 初診時造影CT axial view



coronal view
図2b 放射線治療6日後造影CT axial view

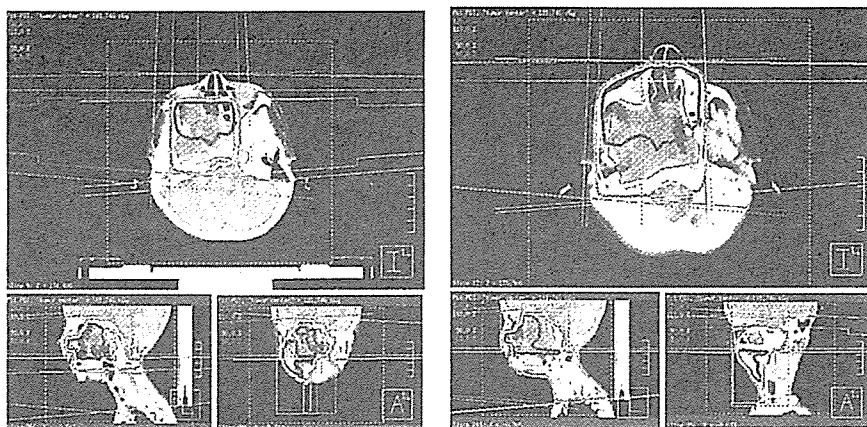
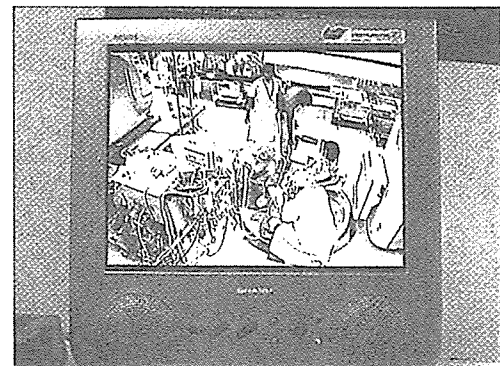


図2c
放射線治療線量分布図

図2 横紋筋肉腫embryonal type (副鼻腔原発) 2歳9ヵ月男児 stage 3、group III

鼻閉、右眼低下垂、右眼球突出にて来院。CT、MRIにて頭蓋底を破壊する上咽頭・副鼻腔腫瘍を認める。CT施行(図2a)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、緊急照射による効果が現れた(図2b)。鼻腔原発巣には前左右3門、右頸部リンパ節転移部には前後2門とした(図2c)。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



全麻下全身照射準備中のモニタリング：この状態を患者家族に見せている

図3 放射線治療中の放射線操作室内にて家族と一緒に患者のモニタリングを行う。患児を安心させるため、マイクを通して家族から声を掛けてもらうこともある

残存腫瘍に対して電子線エネルギー6MeV 10Gyを我々は採用している。この1回10Gyという線量は、抗腫瘍効果としては5Gy/8分割、正常組織における晩期障害の観点からは30Gy/15分割に相当する。そこで、慎重に

確な腫瘍巣の判定を行い、術中照射の利点、欠点をよく理解して適応を決める必要がある。この適応には、小児の鎮静の問題も介在する。分割照射では主治医である小児科医が毎日苦労して鎮静を行っているのが現状であり、薬

7. 晩期合併症の認識

成長期にある小児に放射線治療を行うことに関しての認識を強くしなければならぬ。成人でいわれている正常組織耐容線量(表1)よりも通常は低い線量で合併症が発生することを考慮し、照射線による骨格および軟部組織の変形を最小限度許容できる程度に抑える照射方法を採用する。成人においては腫瘍巣に線量集中を行う定位放射線治療が盛んに行われているが、小児、特に頸部腫瘍において行うことは十分に注意する必要がある。腫瘍巣に線量集中させたいと考えるのが通常であるが、顔面であれば照射後左右非対照の成長が起こり、著しい顔面変形が起こること

表1 放射線治療に対する正常組織耐容線量 (成人)

臓器	TD5/5 容積			TD50/5 容積			評価項目
	1/3	2/3	3/3	1/3	2/3	3/3	
腎	5000	3000*	2300	—	4000*	2800	臨床的腎炎
膀胱	N/A	8000	6500	N/A	8500	8000	膀胱萎縮症状、容積減量
骨：							
大腿骨頭	—	—	5200	—	—	6500	壊死
顎関節	6500	6000	6000	7700	7200	7200	関節機能の著しい制限
肋軟骨	5000	—	—	6500	—	—	病的骨折
皮膚	10cm ²	30cm ²	100cm ²	10cm ²	30cm ²	100cm ²	毛細血管拡張症
	—	—	5000	—	—	6500	
	7000	6000	5500	—	—	7000	壊死、潰瘍
脳	6000	5000	4500	7500	6500	6000	壊死、梗塞
脳幹部	6000	5300	5000	—	—	6500	壊死、梗塞
視神経	部分容積なし	—	5000	—	—	6500	失明
視交叉	部分容積なし	—	5000	部分容積なし	—	6500	失明
脊髄神経	5cm	10cm	20cm	5cm	10cm	20cm	脊髄炎、壊死
	5000	5000	4700	7000	7000	—	
馬尾神経	容積効果なし	—	6000	容積効果なし	—	7500	臨床的に明らかな神経障害
上腕神経叢	6200	6100	6000	7700	7600	7500	臨床的に明らかな神経障害
眼：水晶体	部分容積なし	—	1000	—	—	1800	治療を要する白内障
眼：網膜	部分容積なし	—	4500	—	—	6500	失明
耳：中耳/外耳	3000	3000	3000*	4000	4000	4000*	急性滲出性耳炎
耳：中耳/外耳	5500	5500	5500*	6500	6500	6500*	慢性滲出性耳炎
耳下腺*	—	3200*	3200*	—	4600*	4600*	口腔内乾燥症 (TD100/5 : 5000)
喉頭	7900*	7000*	7000*	9000*	8000*	8000*	軟骨壊死
喉頭	—	4500	4500*	—	—	8000*	喉頭浮腫
肺	4500	3000	1750	6500	4000	2450	間質性肺炎
心臓	6000	4500	4000	7000	5500	5000	心膜炎
食道	6000	5800	5500	7200	7000	6800	臨床的狭窄/穿孔
胃	6000	5500	5000	7000	6700	6500	潰瘍、穿孔
小腸	5000	—	4000*	6000	—	5500	閉塞、穿孔/瘻孔
大腸	5500	—	4500	6500	—	5500	閉塞、穿孔/潰瘍/瘻孔
直腸	100cm ² 容積効果なし	—	6000	100cm ² 容積効果なし	—	8000	重症直腸炎/壊死/瘻孔、狭窄
肝	5000	3500	3000	5500	4500	4000	肝不全

* : 50%以下の容積では著明な変化は認められない。

耐容線量：通常照射 (1日1回180~200cGy、週5回法) での総線量

TD5/5 : 5年後に5%の確率で合併症が生じる線量

TD50/5 : 5年後に50%の確率で合併症が生じる線量

標準的な治療構築の必要性

成人がんの施設では、このような余裕がないのが実情であるので、これを推奨することはできないが、家族を患児とともに治療に参加させることの助けになると考えている。

小児がん放射線治療における「標準治療」といわれるものは未だ存在しない。標準治療に近づくべく治療研究が行われ、その結果をもとに「標準的な治療」が教科書的に記載されている。少なくともその「標準的な治療」を患者および家族に提示し、選択できるようにシステムを構築することが「患者が望む放射線治療」になると考えている。

8. 小児への放射線治療の特徴

我々の施設は小児がん症例が主体であり、年間放射線治療新患者が少ない施設であるがゆえに、患者および家族を接する時間が多く取れる余裕がある。毎回の放射線治療に放射線腫瘍医が立ち会い、セッティングの確認、ポータル・イメージの確認を行っている。放射線治療の際に、放射線操作室内に家族および看護師の同席を許可し、一緒にリニアック室内の患者の様子を見ることにしている(図3)。

神経芽腫治療における外科治療の役割

(一施設症例の解析からの考察)

The role of surgical intervention in the treatment for neuroblastoma

田尻 達郎, 木下 義晶, 高橋由紀子

東 真弓, 竜田 恭介, 田口 智章, 水田 祥代

Tatsuro TAJIRI, Yoshiaki KINOSHITA, Yukiko TAKAHASHI

Mayumi HIGASHI, Kyosuke Tatsuta, Tomoaki TAGUTHI, Sachiyo SUITA

要 旨

神経芽腫治療における外科治療の役割について一施設症例の解析から検討した。乳児神経芽腫においては、治療の主体は無理のない一次的外科的根治術であり、化学療法、放射線照射を避けることが可能であると思われる。年長児神経芽腫においては、化学療法後の外科治療と局所放射線照射により局所コントロールは可能であるが、遠隔転移のコントロールを含めて考えた場合、治療の主体は化学療法であり、外科治療はその前後の化学療法の妨げになるような手法は避けるべきと考えられた。

Key words : 神経芽腫, 外科治療, 生物学的特性

neuroblastoma, surgical intervention, biology

はじめに

本邦における神経芽腫に対する全国規模の統一プロトコールは、1994年から確立された1歳未満の乳児神経芽腫プロトコール^{1), 2)}と1985年から確立された1歳以上の進行神経芽腫プロトコール^{3), 4)}に分かれており、乳児神経芽腫プロトコールは1998年に一度改訂され、進行神経芽腫プロトコールは、1991年と1998年に改訂されている。このような神経芽腫の2種類の統一プロトコールにおいて外科治療のカテゴリーは、診断時一次的

根治術、生検、second look operationによる根治術の3種類に大別される。

また、2004年3月にて本邦の国家事業としての乳児神経芽腫マススクリーニング検査^{5), 6)}は休止となり、乳児神経芽腫の診断、治療に関する概念は改変の時期であり、1才以上の進行神経芽腫治療に関しても、国際的に日本からの治療戦略、治療成績を発信できるような臨床研究確立のための準備が現在進行中である。以上のような本邦における神経芽腫治療の背景から、今回、乳児神経芽腫及び年長児進行神経芽腫の統一プロトコールに基づいて治療されてきた当教室における神経芽腫症例の解析を基に外科治療の役割と今後の全国規模の神経芽腫臨床研究における外科治療の展望について検討した。

九州大学大学院医学研究院 小児外科
Pediatric Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

表 1 1 歳未満に発症した神経芽腫 82 例 (1985-2003)

臨床像		症例数
病期	Stage 1, 2, 4S	70 (85%)
	Stage 3, 4	12
MYCN 増幅	非増幅	80 (98%)
	増幅	2
転帰	生存	79 (96%)
	死亡*	3

* 1 例のみ腫瘍死

対象と方法

当教室において 1985 年から 2003 年までに治療を開始した神経芽腫症例 123 例を解析対象とした。1 才未満症例の 82 例中、73 例がマススクリーニング症例であり、INSS 分類⁷⁾による stage1,2,4S 症例が 79 例(64%)であった。MYCN 増幅に関しては、従来のサザンブロット法に加えて FISH 法と定量的 PCR 法による解析を組み合わせ評価を行い⁸⁾、増幅例(3 コピー以上)は 17 例(14%)であり、現在、94 例(76%)が生存している。

治療は原則として乳児症例は乳児統一神経芽腫プロトコルに従い、1 才以上の進行症例は統一進行神経芽腫プロトコルに従って行った。基本的な外科治療指針としては、乳児神経芽腫症例に対しては、生検を含む臓器温存的腫瘍切除による初期手術を行い、Biology が良好の残存腫瘍の腫瘍縮小後は、second look operation による根治術は原則的には行なわなかった。また、1 才以上進行症例に対しては、生検による初期手術を行い、腫瘍縮小後に、できるだけ臓器温存的系統的リンパ節郭清を行わない second look operation を施行した。その際、腎合併切除により腫瘍全摘が可能であれば、原則的に腎合併切除を行い、腎合併切除を行っても、主要血管浸潤等により腫瘍全摘が不可能の考えられた場合は、腎温存的腫瘍亜全摘を目標とした。その後、原則的には、腫瘍全摘であれば、体外放射線照射に加えて骨髄移植を伴う大量化学療法を行って治療を終了とし、また、腫瘍非全摘であれば、体外放射線照射に加えて地

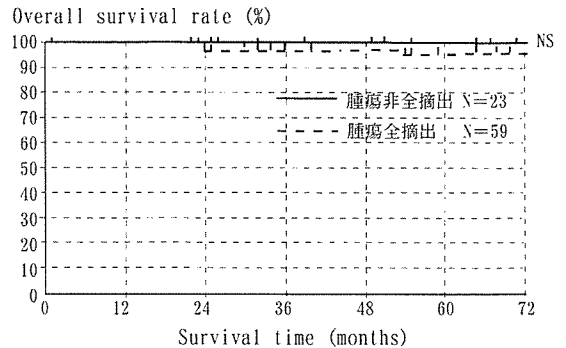


図 1 1 才未満症例における外科切除率と予後

固め化学療法を続行した。

各カテゴリーにおいて Kaplan-Meier 法を用いて生存率曲線を作成し、log-rank test による生存率の有意差検定を行った。

結 果

乳児神経芽腫症例

乳児症例 82 例の臨床像を表 1 に示した。85%にあたる 70 例が stage1,2,4S 症例であり、MYCN 増幅例はわずか 2 例であり、98%が非増幅であった。死亡例は 3 例で、腫瘍死は 1 例のみであった。

原発巣の外科切除率と予後の関係では、98%が生存していることから、全摘出例と非全摘出例において有意差を認めなかった(図 1)。また、乳児症例における化学療法施行と予後との関係では、全摘出例(59 例)において化学療法の施行(61 例)、非施行(21 例)に関して予後に差はなかった。非全摘出症例(23 例)においては、全例に化学療法が施行されており、化学療法の有効性を評価できなかった(表 2)。

表2 1歳未満症例における化学療法と予後

化学療法	外科切除率	生存
施行 (N=61)	全摘出 (N=38)	35 (85%)
	非全摘出 (N=23)	23 (100%)
非施行 (N=21)	全摘出 (N=21)	21 (100%)
	非全摘出 (N=0)	

表3 1歳以上に発症した神経芽腫 41例 (1985-2003)

臨床像		症例数
病期	Stage 1, 2	9
	Stage 3, 4	32 (78%)
MYCN 増幅	非増幅	26
	増幅	15 (37%)
転帰	生存	15 (37%)
	死亡	26

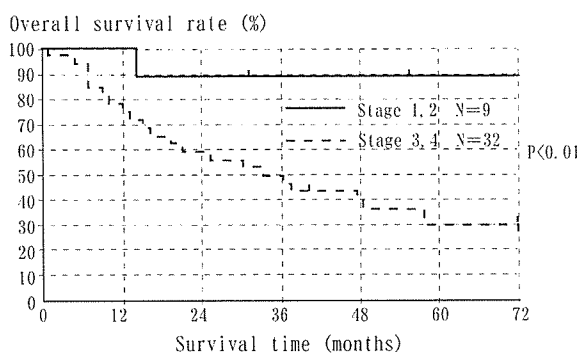


図2 1歳以上症例における臨床病期と予後

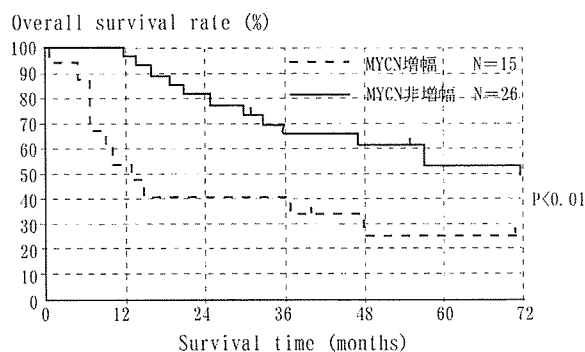


図3 1歳以上症例におけるMYCN増幅と予後

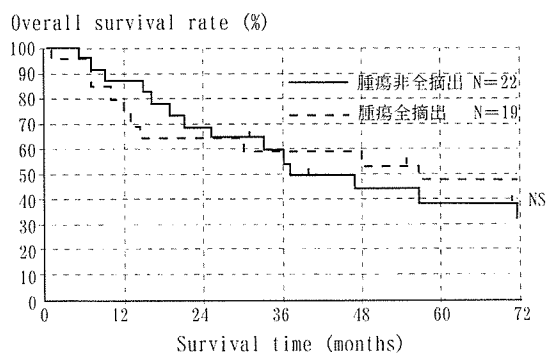


図4 1歳以上症例における外科切除率と予後

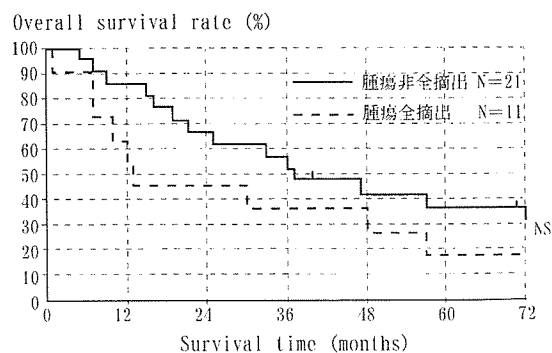


図5 1歳以上進行症例における外科切除率と予後

表4 Stage 4で原発腫瘍全摘出症例の臨床経過 (1994-)

症例	初診時転移部位	MYCN 増幅	術後局所照射	局所再発	転移再発	転帰
1	N, B, E, bm	非増幅	30Gy	(-)	B	腫瘍死
2	N, B, E, bm	増幅	30Gy	(-)	(-)	7年生存
3	N, bm	増幅	30Gy	(-)	(-)	4年生存
4	N, V, bm	増幅	30Gy	(-)	B, bm	腫瘍死
5	B	非増幅	30Gy	(-)	B, brain	腫瘍死
6	B, bm	増幅	30Gy	(-)	N, B, bm	腫瘍死

年長児 (1才以上) 症例

年長児 (1才以上) 症例 41例の臨床像を表3に示した。78%にあたる32例がstage3,4の進行症例であり、MYCN増幅例が15例 (37%) 存在していた。現在の生存数は15例 (37%) に過ぎなかった。

臨床病期と予後との関係では、stage1,2の早期症例 (9例) は、有意差をもって、進行症例 (32例) に対して予後良好であり (図2)、MYCN増幅と予後との関係では、MYCN増幅症例 (15例) は、非増幅症例 (26例) に対して有意差をもって予後不良であった (図3)。

原発巣の外科切除率と予後との関係では、全摘出例 (19例) と非全摘出例 (22例) に有意差を認めず (図4)、また、stage3,4の進行症例 (32例) に限っても、原発巣の外科的切除率と予後との関係において、全摘出例 (11例) と非全摘出例 (21例) に有意差を認めなかった (図5)。

1994年以降のStage 4症例で原発腫瘍全摘出した6例の臨床経過を表4に示す。4例が再発しているが、再発形式は全て遠隔転移再発である。末梢血幹細胞移植に伴う大量化学療法は、このうち3例に施行したが、施行症例、非施行症例において再発形式及び転帰に差異を認めなかった。現行の統一進行神経芽腫プロトコールに基づいた導入化学療法と系統的リンパ節郭清までは行わない腫瘍摘出術に放射線照射を加えた治療により局所腫瘍のコントロールは良好であると言える。

考 察

乳児神経芽腫における外科治療の役割

マスキュレーション症例を中心とした乳児神経

芽腫は大部分が局所腫瘍であり、悪性度も低く、外科切除率に関わらず予後良好であり、また、外科的に全摘出できた症例は化学療法の有無に関わらず予後良好であった。自験例において非全摘出例における化学療法非施行例が存在しないことから、非全摘出例における残存腫瘍への化学療法の必要性和有効性は評価できない。これらの結果からは、乳児神経芽腫における治療の主体は無理のない一期的外科的根治術であり、化学療法、放射線照射を避けることが可能であると思われる。

よって、今後の乳児神経芽腫における外科治療の展望としては、stage3、あるいは、stage2Aで初期手術が部分切除以下の症例に化学療法を省くことができるかと観点からの臨床研究が必要であると思われる。化学療法の有無に予後が関連しなければ、初期手術はさらに臓器温存につとめ、腫瘍のbiologyの検索を重視する手術が推奨され、また、化学療法の有無が予後に関連するならば、初期手術においても、臓器温存を考慮したできる限りの腫瘍切除を重視するべきと考える。

また、本邦におけるマスキュレーションの休止により、今後の乳児神経芽腫症例は、マスキュレーション施行時期と比較して生物学的特性、及び臨床経過に変化がみられると予測される。治療全体におけるsurgical interventionによる腫瘍のbiologyの検索は乳児神経芽腫治療における最も重要な役割である。

年長児 (1才以上) 神経芽腫における外科治療の役割

今回の解析結果では、年長児神経芽腫においては臨床病期と腫瘍の悪性度が最も予後に相関して

おり、外科切除率と予後に有意な相関を認められなかった。また、米国の Children Cancer Group (CCG) の High risk NB における外科治療の効果に関する報告⁹⁾においても、無病生存率において腫瘍全摘出例と非腫瘍全摘出例に有意差を認めていない。しかも、今回の症例においては、根治手術が、腫瘍非全摘出例において、より強力な化学療法が施行されたわけではなく、むしろ、腫瘍全摘出例に対して積極的に骨髄移植を伴う大量化学療法を選択する方針であったにも関わらず、全摘出例と非全摘出例に予後の差を認めなかったと言える。ただ、今回の解析における Stage 4 症例で原発腫瘍全摘出した 6 例の詳細な臨床経過の結果を考慮した場合、現行のプロトコールによる化学療法後の外科治療と局所放射線照射により局所コントロールは可能であったと考えられ、遠隔転移のコントロールを含めて考えた場合、治療の主体は化学療法であり、外科治療はその前後の化学療法の妨げになるような手法は避けるべきと考えられる。

今後、本邦において準備されている年長児進行神経芽腫に対する臨床試験における外科治療のコンセプトとしては、従来の局所根治を目指した手術の軽減化をはかり、外科治療による局所療法を可能な限り同一化することによりプロトコールの遂行性と効果の評価をより客観的にできることを目指すべきと考える。

文 献

- 1) 家原知子, 他: 乳児神経芽腫における治療の軽減. 小児外科, 33:1221-1227, 2001
- 2) 家原知子: 乳児神経芽腫治療プロトコールのこれまでと今後. 小児がん, 41:35-38, 2004
- 3) 金子道夫, 他: (日本進行神経芽腫スタディグループ) 日本における進行神経芽腫の治療成績. 小児外科, 36:79-83, 2004
- 4) Kaneko M, et al: Intensified chemotherapy increases the survival rates in stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. J Pediatr Hematol/Oncol, 24: 613-621, 2002
- 5) Sawada T, et al: Mass screening for neuroblastoma in Japan. Med Pediatr Oncol, 31: 429-434, 1998
- 6) Suita S, et al: Mass screening for neuroblastoma at 6 months of age: difficult to justify. J Pediatr Surg, 33: 1674-8, 1998
- 7) 田尻達郎, 他: 神経芽腫の国際分類. 小児内科, 30: 253-257, 1998
- 8) Tanaka S, et al: Clinical significance of a highly sensitive analysis for gene dosage and the expression level of MYCN in neuroblastoma. J Pediatr Surg, 39: 63-68, 2004
- 9) Adkins ES, et al: Efficacy of complete resection for high-risk neuroblastoma: a Children's Cancer Group study. J Pediatr Surg, 39: 931-6, 2004

CpG Island Methylator Phenotype Is a Strong Determinant of Poor Prognosis in Neuroblastomas

Masanobu Abe,^{1,2} Miki Ohira,³ Atsushi Kaneda,¹ Yukiko Yagi,¹ Seiichiro Yamamoto,¹ Yoshihiro Kitano,⁵ Tsuyoshi Takato,² Akira Nakagawara,³ and Toshikazu Ushijima¹

¹Carcinogenesis Division, National Cancer Center Research Institute; ²Department of Oral and Maxillo Facial Surgery, University of Tokyo Graduate School of Medicine; ³Biochemistry Division, Chiba Cancer Center Research Institute; ⁴Information Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center; and ⁵Department of Pediatric Surgery, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

Abstract

Neuroblastoma, one of the most common pediatric solid tumors, is characterized by two extreme disease courses, spontaneous regression and life-threatening progression. Here, we conducted a genome-wide search for differences in DNA methylation that distinguish between neuroblastomas of the two types. Three CpG islands (CGI) and two groups of CGIs were found to be methylated specifically in neuroblastomas with a poor prognosis. By quantitative analysis of 140 independent cases, methylation of all the five CGI (groups) was shown to be closely associated with each other, conforming to the CpG island methylator phenotype (CIMP) concept. The presence of CIMP was sensitively detected by methylation of the *PCDHB* CGIs and associated with significantly poor survival (hazard ratio, 22.1; 95% confidence interval, 5.3-93.4; $P < 0.0001$). Almost all cases with *N-myc* amplification (37 of 38 cases) exhibited CIMP. Even in 102 cases without *N-myc* amplification, the presence of CIMP (30 cases) strongly predicted poor survival (hazard ratio, 12.4; 95% confidence interval, 2.6-58.9; $P = 0.002$). Methylation of *PCDHB* CGIs, located in their gene bodies, did not suppress gene expression or induce histone modifications. However, CIMP was significantly associated with methylation of promoter CGIs of the *RASSF1A* and *BLU* tumor suppressor genes. The results showed that neuroblastomas with CIMP have a poor prognosis and suggested induction of silencing of important genes as an underlying mechanism. (Cancer Res 2005; 65(3): 828-34)

Introduction

Epigenetic abnormalities, especially alterations in DNA methylation, are intimately involved in development of various human tumors (1). Aberrant methylation of promoter CpG islands (CGI) causes inactivation of tumor suppressor genes. Genomic instability is caused by genomic hypomethylation and is associated with hypermethylation (2, 3). Identification of epigenetic abnormalities in human cancers is expected to lead not only to discovery of novel disease mechanisms but also to development of new diagnostic markers. Therefore, we previously developed a genome-wide scanning method, methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA), for detecting differences in DNA methylation (4, 5). This technique analyzes

unmethylated, CpG-rich regions of the genome and has already identified genes silenced in human lung, stomach, breast, and pancreatic cancers (6-9).

Neuroblastoma derived from primitive cells of the sympathetic nervous system is one of the most common solid tumors in childhood, characterized by two extreme disease courses, spontaneous regression, and life-threatening progression (10, 11). The clinical outcome is associated with disease stage, age at diagnosis, histologic classification, *N-myc* amplification, DNA ploidy, and *TrkA* overexpression (10-12). These characteristics are therefore used to classify cases into low-, intermediate-, and high-risk groups. However, especially in the cases with intermediate risk, prediction of prognosis and therapeutic decision-making are still difficult, and development of new markers is an urgent priority. Moreover, the molecular bases underlying the two distinct clinical courses are still unknown, and their clarification is needed to allow development of novel therapeutics.

In the present study, considering the major involvement of epigenetic machinery in embryonic development (13, 14), we searched for differences in DNA methylation between neuroblastomas with a good prognosis and counterparts with a poor prognosis by MS-RDA.

Materials and Methods

Tissue Samples and Cell Lines. Tumor samples were obtained from 145 nonrecurrent cases between 1995 and 1999 and were used under approval of institutional review boards. The mean age at initial diagnosis was 27 months (range, 0-216 months). Their clinical stages were determined according to the International Neuroblastoma Staging System, and 40, 17, 20, 60, and 8 cases belonged to stages I, II, III, IV, and IVS, respectively. Normal adrenal medulla tissue was collected from a case undergoing nephrectomy for a renal cancer. Neuroblastoma cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA), the Japanese Collection of Research Bioresources (Tokyo, Japan), and the RIKEN Bio Resource Center (Tsukuba, Japan). GANB was established by A.N. and normal human bronchial epithelial cells were purchased from Cambrex (East Rutherford, NJ). High molecular weight DNA and total RNA were extracted as previously described (7). Total RNAs of brain and adrenal glands were purchased from Clontech (Palo Alto, CA).

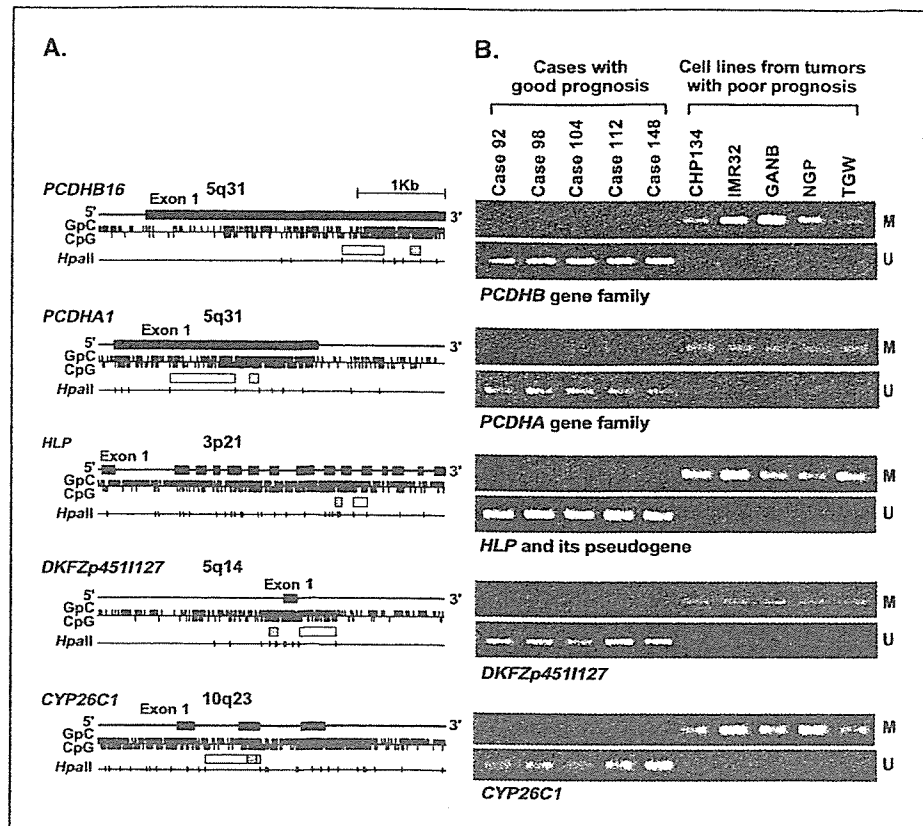
MS-RDA and Database Search. MS-RDA was done as previously described (4, 5). Genomic DNA of primary neuroblastomas with a good prognosis (cases 92, 98, 104, 112, and 148) and neuroblastoma cell lines established from cases with a poor prognosis (CHP134, IMR32, GANB, NGP, and TGW) were digested with *HpaII*, and then two pooled DNA samples were prepared. Although use of cell lines is highly recommended for MS-RDA (5), no cell lines were available for neuroblastomas with a good prognosis, and therefore we used the primary samples. To isolate CGIs that were hypermethylated in the latter, the cell line pool was used as the tester, and the primary tumor pool as the driver. MS-RDA in the opposite direction

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Toshikazu Ushijima, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan. Phone: 133-547-5240; Fax: 135-565-1753; E-mail: tushijim@ncc.go.jp.

©2005 American Association for Cancer Research.

Figure 1. Five CGIs isolated by MS-RDA and their methylation statuses in the samples used for MS-RDA. **A**, genomic structures of the five CGIs. GpC, CpG, and *Hpa*I recognition sites (5'-CCGG-3') are shown by ticks. Closed boxes, exons; open boxes, clones isolated by MS-RDA; shaded boxes, regions analyzed by MSP. **B**, methylation statuses analyzed by MSP. M, MSP using primers specific to methylated DNA; U, MSP using primers specific to unmethylated DNA. All the five CGIs were found to be differentially methylated between the two groups used for MS-RDA.



was also done. For each series of MS-RDA, 96 clones were analyzed for redundancy, and nonredundant clones were sequenced. Their genomic origins were examined using BLASTN software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Sodium Bisulfite Modification and Methylation-Specific PCR. One microgram of DNA underwent sodium bisulfite modification (15), and was suspended in 20 μ L of TE buffer. For methylation-specific PCR (MSP), 1 μ L of the solution was used for PCR with primers specific to methylated or unmethylated sequences. Using DNA from normal human bronchial epithelial and DNA methylated with *Sss*I methylase, annealing temperatures specific for methylated and unmethylated primers were determined. Quantitative MSP was done separately for methylated DNA molecules and for unmethylated DNA molecules. Standard DNA was prepared by cloning PCR products amplified by methylated and unmethylated primers into a vector, respectively. The numbers of methylated and unmethylated molecules in a test sample were determined by comparing their amplification with those of standard samples containing 10 to 10⁶ molecules. The "methylation index" was calculated as the fraction of methylated molecules in the total DNA molecules (no. methylated molecules + no. unmethylated molecules). Each sample was analyzed twice, blind to clinical information, and high reproducibility was confirmed (correlation coefficient = 0.98).

The *protocadherin* β (*PCDHB*) family consists of 16 genes with single exons and three pseudogenes on 5q31, and their CGIs are located in the gene bodies. MSP primers were designed to recognize 17 of the 19 members (all except for the *PCDHB1* gene and the *PCDHB19* pseudogene). The *protocadherin* α (*PCDHA*) family consists of 15 genes and one pseudogene having unique first exons and shared exons 2 to 4 on 5q31, and their CGIs are located in exon 1. MSP primers were designed to recognize 13 of the 16 members (all except for the *PCDHAC1* and *PCDHAC2* genes and the *PCDHAI4* pseudogene). The *hepatocyte growth factor-like protein* (*HLP*/*MSP*/*MST1*) gene is highly homologous to *macrophage stimulating*,

pseudogene 9 (*MSTP9*), and MSP primers were designed to recognize both of these. For *DKFZp4511127*, *FLJ37440*, *Zinc finger protein 297* (*ZNF297*), and *Cytochrome p450 CYP26C1* (*CYP26C1*), MSP primers were designed to recognize each of them specifically. The primers and PCR conditions are shown in Supplementary Table 1.

Semiquantitative and Quantitative Reverse Transcription-PCR. cDNA was synthesized from 3 μ g of total RNA treated with DNase using a Superscript II kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA). For semiquantitative reverse transcription-PCR (*PCDHB1-PCDHB15*), multiple cycles of PCR were tested for each gene, and numbers giving a wide dynamic range were determined. The primers and PCR conditions are shown in Supplementary Table 2. For quantitative reverse transcription-PCR (*PCDHB16*), the number of cDNA molecules was determined by quantitative PCR, as in quantitative MSP, and the copy number was normalized to that of *GAPDH*.

Chromatin Immunoprecipitation Assay. From 1×10^6 cells, DNA/histone complexes were immunoprecipitated, and DNA was eluted in 30 μ L of TE after reversing cross-linking. Copy numbers of DNA molecules of the *PCDHB16* exon, *RASSF1A* promoter, and *GAPDH* promoter in 1 L of the eluate were determined by quantitative PCR (primer sequences in Supplementary Table 3), and normalized to the copy numbers in the input. Anti-acetyl-histone H3 antibody (AcH3) and anti-dimethylated-histone H3 (lysine 9; Meth3K9) were purchased from Cell Signalling (Beverly, MA).

Statistical Analysis. Associations between methylation levels among CGI groups were examined using the Pearson correlation coefficient and Fisher's exact test. Survival time was measured from the date of initial diagnosis to the date of death or last contact. Kaplan-Meier analysis and log-rank tests were done to compare survival between the groups defined by methylation levels. Hazard ratio (HR) between groups and dose-response relationships between methylation levels and survival were estimated by the Cox proportional hazard model. Kaplan-Meier curves were drawn with the help of Aabel software (Gigawiz. Ltd. Co., Tulsa, OK) and other analyses were conducted using SAS version 8.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).