

患者への情報提供が必要であると考え、その目的のためにパンフレットが有効であると考えた。

B. 研究方法

本分担試験はNK腫瘍研究会で実施した第I相試験登録終了後よりプロトコールの検討ならびに作成を担当、実施した。本研究計画は2007年5月12日にNK腫瘍研究会のプロトコール委員会でフルプロトコールの承認を受けた。

本臨床試験のPrimary endpointは奏効率(overall response rate)、secondary endpointsは完全奏効率(%CR)、1年生存率、初発/再発/難治別の治療効果、再発例での先行レジメン別での治療効果、有害事象発生率とする。登録期間3年で28名を登録することを予定した。本試験は日本を中心に、香港・韓国・台湾・中国のセンター施設(海外各国あたり1-2施設)の参加による東アジア多国間共同研究として実施する。

対象症例

以下の全ての基準を満たすものを適格例として対象とする。

- (1) 生検または骨髓液・末梢血検査によりWHO分類のENKLと診断
- (2) 以下のいずれかであること
 - ① Ann Arbor病期分類IV期の新規診断例
 - ② 初回治療で寛解(CRまたはPR)後の再発例
 - ③ 初回治療でNCまたはPDであった例
- (3) 年齢 15歳~69歳
- (4) Performance status (ECOG) 0-2
- (5) 評価可能病変を有する
- (6) ステロイド全身治療中の患者は登録前にステロイド投与を中止できる
- (7) 十分な骨髄・肝・腎・心・肺機能
- (8) 患者本人よりの書面同意が得られている

治療計画

SMILE療法を28日毎を2コース施行する。
化学療法 (SMILE療法: Steroid, Methotrexate, Ifosfamide, Lasparaginase, Etoposide)

薬剤	投与量	投与方法	投与日 (Day)
メトトレキサート	2 g/m ²	DIV (6h)	1
ロイコポリン	15 mg/回 x4	DIV or PO	2, 3, 4

イホスファミド	1,500 mg/m ²	DIV (3h)	2, 3, 4
メスナ**	300 mg/m ² x3	IV	2, 3, 4
デキサメタゾン	40 mg/body	DIV or PO	2, 3, 4
エトポシド	100 mg/m ²	DIV (2h)	2, 3, 4
L-アスパラギナーゼ***	6,000 u/m ²	DIV (2h)	8, 10, 12, 14, 16, 18, 20
G-CSF			治療開始後6日目より使用

予定症例数と研究期間、データ管理、附随研究

予定症例数 28例、予定登録期間 3年、追跡期間 1年、総研究期間 4年

データ管理業務は特定非営利活動法人血液疾患臨床研究サポートセンターに委託して実施し、付随研究として日本国内においてのみENKLにおける末梢血EBウイルスDNA量の臨床的有用性に関する研究を実施する。

(倫理面への配慮)

適切な症例選択基準と治療中止基準を設定することにより、被験者の安全性を確保する。またヘルシンキ宣言を遵守し、わが国での臨床研究に関する倫理指針あるいは海外各国ではそれに相当する指針に則って実施する。登録に際しては、IRB承認が得られた説明文書により口頭で説明後に文書で同意をえる。試験登録後は、プロトコールを遵守し有害事象発生の防止に努めるとともに、対象患者のプライバシーの保護に十分な配慮を行う。

C. 研究結果

本分担研究者は第I相試験に続いて、プロトコールの立案、臨床試験の実施を担当している。2007年7月2日から症例登録が開始された。2008年3月現在の参加施設(IRB承認施設)は60施設である。福岡大学は2007年6月12日付でIRB承認を得ている。

登録の最初の2例がGrade4の好中球減少に引き続く感染症で死亡したため、安全性を含む問題の検討のため本試験の登録を一時休止し、2007年10月12日に国内および韓国、香港のコアメンバーによる会議を開催した。1)発症から診断までの期間が長い患者、ステロイド剤の継続投与が行われていた患者、感染症を有する患者、多剤耐性菌の保菌者について登録ないし治療時に注意喚起を促す記載をプロトコールに追加、2)リンパ球

数を適格条件に追加、3) G-CSF は国外では原則的には日本の適応承認量とするが、海外では G-CSF の 1 回投与量の適応承認量の上限がわが国の 2 倍以上であるため、遷延する好中球減少などやむを得ない場合は倫理的観点から各国の適応承認量内で増量してもよいことを英語版プロトコルに追記、さらに現行日本語版プロトコルには G-CSF の用法・用量に関する厳密な規定の記載がないため、皮下注射または点滴静注で適応承認量を用いることを追記、4) 評価不能 (not evaluable; NE) の定義に加え、単なる検査もれのため NE と判定された症例と早期死亡例とを区別するため、「早期死亡 (early death; ED)」の定義を追記というプロトコルを改訂後、本臨床試験を継続することを討議の結果決定し、効果安全評価委員会でも承認された。それを受け 2007 年 11 月 26 日より症例登録を再開し、予定登録症例数より早いペースで登録が進んでおり、2009 年 3 月 2 日現在で計 25 例が登録されている。

本分担研究者が中心となり本研究主任研究者である鈴木律朗 (名古屋大学) と分担研究者の山口素子 (三重大学)、他に伊豆津宏二 (NTT 東日本関東病院)、押味和夫 (前・順天堂大学) による本リンパ腫のパンフレット「NK 細胞腫瘍の患者さまとご家族へ」を作成した。

D. 考察

稀少腫瘍は登録患者数が少ないことを理由に、プロスペクティブな臨床試験は困難ということで実施をされてこなかったが、そのような対象の腫瘍でも地理的距離も人種も近い東アジアの国々と協力して臨床試験を実施することで新しい治療法の開発が可能であることを示したと考えられる。

多国間で実施する臨床試験の最大の問題は研究体制の質の維持である。そのため本臨床研究でも第 I 相試験と同様に安全性確保のため、通常よりも厳格な有害事象報告規定を使用している。また国内および国外参加施設へメーリングリストを通じた密な継続的な連絡をとることで、大きな問題も生じていない。このようにコンピューターのネットワークを使用することで、多国間で実施する臨床研究の問題の一部は解決できると考えられる。

予定登録症例数 28 症例に対して、研究登録施設が 60 施設と多いことが奇異に感じられるかもしれ

ないが、稀少腫瘍の場合はこのような方法をとるしか、登録症例数は確保できないと考えられた。また登録施設のメーリングリストによるネットワークの形成が、今後、他の臨床試験を実施するうえでも重要なことと考えられた。

本研究に参加している海外の研究者とは主任者研究員、分担研究者が以前より、様々な交流を持っており意志疎通が容易であることが、本臨床研究の遂行に寄与していると考えられるため、研究者が一同に会して、検討をすることは必須と考えられる。この問題も厚生労働科研費など公的資金の援助などにより解決できていると考えられた。

ENKL はまれな腫瘍であり、さらに本試験の対象となる患者は少なく、福岡大学では 2~3 年に一人である。今後も本臨床研究の分担研究員として、登録機関中に症例の登録を行うことを目標にし、また周囲の施設にも協力要請を継続していく。

ENKL を含む NK 細胞リンパ腫は稀少腫瘍であるため、医療者向けにも情報量としては少なく、患者向けとなると極めてその情報は限られている。正しい病気の理解をもつていただくことが、稀少腫瘍の臨床試験をするうえにも重要であると考えたので、患者向けのパンフレットを作成した。この有用性に関しては配布後にさらに検討が必要と考えられた。

E. 結論

症例数の少ない腫瘍は、プロスペクティブな臨床試験が実施困難であるということの解消する方法があることを本研究は示している。具体的には参加施設を増やしても質を保つことが可能なシステムを構築することや地理的距離と人種が近く、質の高い臨床研究が可能である韓国、香港、台湾、中国のセンター病院と共同で臨床試験を組むことである。また本臨床試験が対象としているような症例数の少ない腫瘍に対しても、患者への情報提供が必要不可欠であると考え、パンフレットを作成した。配布後、患者などからの意見を聞き、本パンフレットのみならず他の稀少リンパ腫に対する情報提供をするパンフレットを作成する場合の参考にしていきたい。

本研究は、国内でも各施設に CRC を配置した臨床研究支援センターが設置されたこと、各診療科内にも CRC が置かれ、臨床研究を実施する環境が整

ったこと、メーリングリストなどでプロトコールの内容や、有害事象などの情報をリアルタイムで共有できること、厚生労働科研費の交付対象の研究となり公的な資金援助を受けたことなどから、現在のよう高い質を保持した多国間の臨床治療研究が継続可能である。

本臨床研究は稀少腫瘍に対する多国間共同国際臨床研究を実施していく上でのモデルケースとなると考えられ、さらに患者さんへの稀少腫瘍の情報発信も含めた新しい臨床研究の形を示していると考えている。

進行期や再発・難治の ENKL に対する適切な研究計画に基づく前向き治療研究の報告は皆無であり、まだ有効な治療法はない。日本主導により実施された SMILE 療法の第 I 相試験に続く、第 II 相試験としての本研究は、アジアの患者のためにアジアで治療法を開発するということが可能であることを示している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Suzumiya J, Ohshima K, Tamura K, Karube K, Uike N, Tobinai K, Gascoyne RD, Vose JM, Armitage JO, Weisenburger DD; for the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. The International Prognostic Index predicts outcome in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma: analysis of 126 patients from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. *Ann Oncol*. 2009 Jan 15. [Epub ahead of print]
- (2) Lee J, Au WY, Park MJ, Suzumiya J, Nakamura S, Kameoka J, Sakai C, Oshimi K, Kwong YL, Liang R, Yiu H, Wong KH, Cheng HC, Ryoo BY, Suh C, Ko YH, Kim K, Lee JW, Kim WS, Suzuki R. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in extranodal natural killer/T cell lymphoma: a multinational, multicenter, matched controlled study. *Biol Blood Marrow*

Transplant. 2008 Dec;14(12):1356-64.

- (3) Yamaguchi M, Nakamura N, Suzuki R, Kagami Y, Okamoto M, Ichinohasama R, Yoshino T, Suzumiya J, Murase T, Miura I, Ohshima K, Nishikori M, Tamaru J, Taniwaki M, Hirano M, Morishima Y, Ueda R, Shiku H, Nakamura S. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. *Haematologica*. 2008 Aug;93(8):1195-202.
- (4) Yamaguchi M, Suzuki R, Kwong YL, Kim WS, Hasegawa Y, Izutsu K, Suzumiya J, Okamura T, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K. Phase I study of dexamethasone, methotrexate, ifosfamide, L-asparaginase, and etoposide (SMILE) chemotherapy for advanced-stage, relapsed or refractory extranodal natural killer (NK)/T-cell lymphoma and leukemia. *Cancer Sci*. 2008 May;99(5):1016-20.
- (5) Karube K, Aoki R, Sugita Y, Yoshida S, Nomura Y, Shimizu K, Kimura Y, Hashikawa K, Takeshita M, Suzumiya J, Utsunomiya A, Kikuchi M, Ohshima K. The relationship of FOXP3 expression and clinicopathological characteristics in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Mod Pathol*. 2008 May;21(5):617-25.
- (6) 鈴宮淳司: NK 細胞リンパ腫: 病因と病態。臨床血液 2008 Aug;49(8):545-52.
- (7) 鈴宮淳司: 非 Hodgkin リンパ腫④ (節外性 NK/T 細胞リンパ腫); 内科必携画像診断。内科 2008;101 (Suppl. 6):1574-1577
- (8) 鈴宮淳司 慢性リンパ性白血病; 内科必携画像診断。内科 2008;101 (Suppl. 6):1552-1556
- (9) 尾畑由美子、鈴宮淳司 悪性リンパ腫に伴う血球食食症候群、病態と診断。血液・腫瘍科 2008;57 (Suupl.6) 162-169

著書

鈴宮淳司: 慢性リンパ性白血病 今日の治療指針 2009 年版 山口徹、北原光夫、福井次矢総編集 医

学書院、東京 2009年、504-506

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

「NK細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究」班

分担研究課題 「NK細胞腫瘍の治療研究と東アジア研究組織の構築」

研究分担者 加納 康彦 栃木県立がんセンター 副病院長

研究要旨

私達は抗がん剤の併用研究から Methotrexate (MTX)が種々の抗がん剤と同時投与で拮抗作用、MTX 先行で相乗作用を示すことを観察してきた。併用時の MTX のスケジュール依存性の性格を明らかにするために、さらに多くの薬剤と MTX の間の併用効果を調べた。ヒト白血病細胞株として T 細胞白血病の MOLT3 を用い、併用する抗がん剤として carboplatin, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A(fludarabine の活性化物質), gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide (ifosfamide の活性化物質), mitoxantrone を用いた。MOLT3 細胞を MTX と他剤を同時投与と MTX 先行で培養し MTT assay で dose-response curve を得、IC₅₀における併用効果を isobologram で分析した。その結果、MTX はすべての薬剤と同時投与で拮抗作用、MTX 先行で doxorubicin 以外の薬剤と相乗作用を認めた。MTX は最も古い抗がん剤のひとつであるが、併用しても抗腫瘍効果があがらず単独に使用されることも多かった。しかし、MTX を先行投与すると明らかに相乗作用を示すことが示され、MTX が併用薬剤の抗腫瘍効果を高めている可能性が高いことが示唆された。臨床で MTX を併用する場合、MTX を先行させるスケジュールを考える必要がある。

A. 研究目的

がん化学療法は通常多剤併用療法が行われる。しかし、抗がん剤は併用薬や投与スケジュールによりその抗腫瘍効果はかなり異なることが知られており、その併用には細心の注意が必要である。私たちは過去25年、抗がん剤の至適併用を知る目的で、抗がん剤の併用効果を *in vitro* の系をもちいて研究してきた。そしてその成果は抗がん剤の臨床試験のプロトコール作成のために貴重な情報を提供してきた。あらためて、その併用効果の結果を見直してみると、MTX がその併用において極めてユニークな併用パターンを示すことがわかった。すなわち、種々のがん株化細胞も用いた実験で MTX は同時投与において amacrone, amurubicin, cytarabine,

bleomycin, carboplatin, depsipeptide, 4-hydroperoxy-ifosfamide, imatinib, SN-38, F-ara-A, 6-mercaptopurine, mitoxantrone, paclitaxel, sobuzoxane, PKC412, raltitrexed, vincristine 等、調べた限りすべての抗がん剤と拮抗作用を示したことである。この結果は、リンパ系腫瘍等に対し、MTX が他の抗がん剤としばしば同時投与されているが、この投与方法が適切でないことを示唆している。さらに MTX を先行される時間差投与の実験により、検討したすべての薬剤 (cytarabine, SN-38, 6-mercaptopurine, paclitaxel, raltitrexed, vincristine) との併用で、いずれも相乗作用を示すことを見いだした。これは、MTX と他剤を併用する場合、MTX 投与先行の時間

差投与がより強い抗腫瘍効果をもつことを示している。MTX 併用における至適投与スケジュールを知る目的で、この現象が MTX とそれ以外の抗がん剤の併用でもみられるか、改めて検討をおこなった。

B. 研究方法

ヒト白血病細胞株として T 細胞白血病の MOLT 3 細胞を用いた。併用に用いた抗がん剤は carboplatin, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A, gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide, mitoxantrone である。MOLT3 細胞を $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、細胞液 ($100 \mu\text{l}$) を 96 穴組織培養プレートに分配し、同時投与の実験では種々の濃度の MTX ($50 \mu\text{l}$) とこれらの薬剤 ($50 \mu\text{l}$) の存在下で 4 日間培養した。一方、MTX 先行の場合、フラスコ中で MTX を 2 4 時間投与し、培養液を交換し 96 穴組織培養プレートに分配 ($150 \mu\text{l}$) し、併用薬を加えさらに 4 日間培養をおこなった。その後 $50 \mu\text{l}$ の MTT (1mg/ml) を各穴に加え 4 時間 incubation した後、上清を捨て、DMSO を $150 \mu\text{l}$ 加え MTT-formazan product を Titertek Multiscan をもちい 570 nm の吸光度で測定し生細胞数を求め、得られた dose-response curve から IC_{50} における併用効果を isobologram (Steel and Peckham) で分析した。

(倫理面への配慮)

がん株化細胞をもちいた組織培養の研究なので、倫理面への配慮は必要なし。

C. 研究結果

MTX の IC_{50} 値は 96 h exposure の場合 15 nM、24 h exposure では 490 nM であった。併用効果を isobologram で分析すると、MTX と他剤の同時投与の場合、いずれの抗がん剤を用いても、併用時の data point は殆どが subadditive から protection の領域にはいり、拮抗作用と判定した。これは、すでに以前私達が発表した結果に一致している。一方、MTX を先行させた場合、carboplatin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A, gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide, mitoxantrone との併用で data point は殆ど supraadditive area にはいり、MTX とこれらの薬剤が相乗作用をもつことが示された。Doxorubicin との併用では data point は envelope of additivity 内にあり、相加効果と判定し

た。同時投与で MTX と相加、相乗作用を示す薬剤はなく、一方、MTX 先行投与で拮抗作用を示す薬剤もなかった。 IC_{50} における併用効果も同様であった。

D&E. 考察および結論

私達は以前から MTX を他の抗がん剤と併用させた場合、同時投与で拮抗作用を示し、MTX を先行させると相乗作用を示すことを観察していた。今回、今まで詳細に時間差投与を十分検討していなかった doxorubicin, carboplatin, doxorubicin, etoposide, 5-fluorouracil, F-ara-A, gemcitabine, 4-hydroperoxy-ifosfamide, mitoxantrone について MOLT3 細胞を用いて同時投与と MTX 先行の時間差投与について検討した。その結果、MTX との同時投与ですべての抗がん剤が拮抗作用を示し、MTX 先行投与で doxorubicin (相加作用) を除くいずれの抗がん剤が相乗作用を示すことが確認された。これは以前、種々の投与スケジュールで MTX との併用を検討した cytarabine, SN-38, 6-mercaptopurine, paclitaxel, raltitrexed, vincristine との間に認められた効果と同様であった。

抗がん剤の併用効果を分析する方法は抗がん剤の dose-response curve をどう考えるかにより意見がわかれており、多く方法がある。私達が用いた isobologram による方法は相乗作用や拮抗作用に非常に厳密であり、他の分析方法を用いても同様の結果が得られるのは確実である。

これは、このような傾向を示す抗がん剤は他にない。MTX は dihydrofolate reductase を阻害する抗葉酸剤である。一方、併用に用いた抗がん剤はアルキル化剤、Topo-II 阻害剤、Topo-I 阻害剤、代謝拮抗剤、mitotic 阻害剤など作用機序の異なる抗がん剤である。MTX と殆どすべての抗がん剤がなぜ拮抗的に働き、また、MTX を先行させると相乗的に作用するかその機序は不明である。併用時の data point をみると、同時投与では protection 領域にはいるものが多く、これはお互いに他方の抗がん剤の作用を阻害していることを意味している。一方、MTX を先行させた場合の相乗作用については、MTX が G₁/S 期に細胞を同調させることから、これにより第 2 の抗がん剤の細胞内輸送が亢進するのではないかと考えられるが推察の域をでない。この点につ

いては今後検討課題である。

以上の結果より、MTX と他剤を併用する場合は MTX と他の抗がん剤の同時投与は避け、MTX を先行させるスケジュールを考えたほうがよい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Odgerel T, Kikuchi J, Wada T, Shimizu R, Futaki K, Kano Y, Furukawa Y. FLT3 inhibitor PKC412 exerts differential cell cycle effects on leukemic cells depending on the presence of FLT3 mutations. *Oncogene*.27: 3102-3110, 2008
- (2) Murakami T, Sato A, Chun NA, Hara M, Naito Y, Kobayashi Y, Kano Y, Ohtsuki M, Furukawa Y, Kobayashi E. Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma. *J Invest Dermatol*.128:1506-1516, 2008
- (3) Nakajima TE, Yasunaga M, Kano Y, Koizumi F, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shirao K, Shimada Y, Matsumura Y. Synergistic antitumor activity of the novel SN-38-incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer*. 122:2148-53, 2008
- (4) Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Tanaka M, Katano S, Inoue K, Igarashi S, Hirabayashi K, Furukawa Y, Ohmine K, Sato K, Kobayashi H, Ozawa K, Kirito K, Nagashima T, Teramukai S, Fukushima M, Kano Y. Long-term results of dose-intensive chemotherapy with G-CSF support (TCC-NHL-91) for advanced intermediate-grade non-Hodgkin's lymphoma: a review of 59 consecutive cases treated at a single institute. *Oncol Res*. 17:137-149, 2008
- (5) Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K. Bortezomib overcomes cell

adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene*. 28:231-242, 2009

- (6) Mori K, Kobayashi H, Kamiyama Y, Kano Y, Kodama T. A phase II trial of weekly chemotherapy with paclitaxel plus gemcitabine as a first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 Oct 22; [Epub ahead of print]

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

「NK 細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究」班

分担研究課題 「NK 細胞腫瘍の治療研究と東アジア研究組織の構築（臨床試験の実施）」

研究分担者 石田 文宏 信州大学医学部内科（2） 准教授

研究要旨

節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型、の近縁疾患であるアグレッシブ NK 細胞白血病の病態解明および治療法確立に向けての情報収集のため、日本および韓国の諸施設参加による「アグレッシブ NK 細胞白血病に関する日韓多施設共同後方視的研究」(ANKL07)を計画し、症例を登録した。41 例が登録され、本邦症例に関して中央標本検討会を実施した。

A. 研究目的

アグレッシブ NK 細胞白血病（以下 ANKL）は NK 細胞の全身性増殖を特徴とし、急速に進行する臨床経過をたどる疾患である。白血病・リンパ腫の中でも稀とされ、本邦の悪性リンパ腫に対する相対頻度では 0.1%である。アジア諸国に多く、これまでの報告は特に東アジア地域からの症例が多くを占めている。青壮年に多い。治療としてアントラサイクリン系薬剤を含む多剤併用化学療法が比較的行われるが完全寛解到達率は 23%と低く、本邦症例の生存の中央値は 58 日と短い。一方、自家末梢血幹細胞移植や同種造血幹細胞移植療法で寛解が得られたという症例報告がある。

ANKL は 節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型(以下 ENKL)との類似性を指摘されており、ENKL で骨髄浸潤を伴う場合 ANKL と同義に扱うとする意見もあるが細胞遺伝学的には異なるとされる。ANKL に先行して慢性 NK 細胞増殖症 (CNKL) や慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) が認められたとする報告もある。また、現在、ENKL の未治療 IV 期・再発・難治例を対象として、エトポシド、L-アスパラギナーゼ、イホスファミド、メトトレキサート、デキサメタゾンによる新規レジメン(SMILE 療法)の第 II 相試験を実施中であるが、

第 I 相試験では ANKL も対象疾患に含まれていた。ANKL 症例の登録はなく、第 II 相試験では対象疾患から ANKL を外した経緯もある。

これまでの ANKL に関する研究は NK 腫瘍研究会が行った臨床疫学研究の 22 例が最大でありほとんどが単独の症例報告または単独施設からの症例研究である。ANKL を早期かつ適切に診断し、治療成績を高めるためには多数の ANKL 症例の情報を集積する必要がある。自家移植は類縁疾患の ENKL での有効性が報告されており、また、同種造血幹細胞移植は造血幹細胞ソースとして臍帯血の利用の増加、非骨髄破壊的前処置の導入といった変化もあり ANKL に対しての移植療法のあり方も変化してきている可能性がある。

ANKL の実態を正確に把握するには多施設での前向きコホート研究が必要であるが極めてまれな疾患であるため実施は困難である。そのため各施設でのこれまでに経験した症例の情報を後ろ向きに収集し調査することで ANKL の病像と治療状況を調べることが次善の方法になる。

以上の背景から ANKL の病像を明らかにする、ANKL 患者での化学療法の実施状況およびその影響を調べる、造血幹細胞移植の実施状況と予後との関連を調べることを主目的として本研究を考案し

た。本試験は日本・韓国諸施設の参加による 2 国多施設共同研究として実施する。

B. 研究方法

本臨床研究 (ANKL07) は 2007 年 7 月よりプロトコールコンセプトおよびプロトコールの作成を開始、2007 年 11 月 13 日に NK 腫瘍研究会のプロトコール委員会でプロトコールが承認され、参加予定施設に研究案内が通知された。研究計画の概要を示す。

〔症例選択規準〕

(1) 末梢血または骨髄に NK 細胞の免疫表面形質を持つ顆粒リンパ球の増加を認める。フローサイトメトリーで表面 CD3 陰性または T 細胞受容体遺伝子再構成が胚細胞型であることが必要である。

(2) ANKL は典型例では臨床的に急激な進行で臓器障害を呈する。細胞形態と臨床経過と合わせて適格と判断する。必ずしも、臨床経過で臓器障害を示さない場合も対象に含めることとする。その理由として臨床経過を判断基準に含めない場合 CAEBV 症例、CNKL 症例も含まれる可能性があるが、それぞれから ANKL に移行する症例の存在も考えられていることより検討対象に含める。

EB ウイルスは、in situ hybridization 法ないしは Southern Blot 法で検討すると ANKL 細胞に高率に陽性であるが、EB ウイルス陽性は診断の必須条件とはしない。

〔症例登録の概要〕

参加施設に該当する ANKL の症例があるか否かの調査用紙を配付する(一次調査)。該当症例がある場合、二次調査に協力できると答えた施設に、症例毎に情報を調査するための調査用紙を送付する(二次調査)。診断時の臨床情報、化学療法に関する情報、造血幹細胞移植に関する情報、予後に関する情報を収集する。病理組織標本として末梢血・骨髄穿刺標本を検討する。調査期間は 1985 年以降、2008 年 6 月 30 日までとする。

〔倫理面への配慮〕

本研究は、後ろ向き調査研究で「疫学研究」に当たり「疫学研究の倫理指針」に従って実施する。本研究は各実施施設の倫理委員会での審査および承認または施設長の承認を受け実施している。登録に

際しては、対象患者のプライバシーの保護に十分な配慮を行う。患者情報は連結匿名化して扱う。

C. 研究結果

信州大学では研究事務局として 2008 年 1 月 24 日付けて医倫理委員会の承認を得た。2008 年 2 月 1 日から本研究の症例登録を開始した。国内参加施設は 14 施設、韓国 1 施設である。

国内 8 施設から 22 例、韓国 1 施設から 19 例が登録された。

国内症例は年齢中央値 34 歳で、6 歳から 74 歳に分布していた。男性 16 例、女性 6 例であった。白血球数の中央値は $3,050/\mu\text{l}$ 、末梢血腫瘍細胞の割合の中央値は 34.6%、骨髄の腫瘍細胞割合中央値は 30%となっていた。

2008 年 11 月 3 日に国内症例に関して中央標本検討会を開催した。血液病理医を含め血液専門医計 20 名が参加した。22 例に関して検討可能であり、腫瘍細胞が成熟した顆粒大リンパ球様の形態を示した症例が 17 例と最も多かった。細胞質が広く単球様にも見える症例が 2 例、未成熟で芽球様の症例を 2 例認めた。

CAEBV を思わせる病状が 3 例で先行していたが、その 3 例と他の症例で腫瘍細胞形態での差は明らかでなかった。

D. 考察

ANKL07 研究は ENKL との異同が問題になっている ANKL の実態を把握し、ENKL と比較しても予後不良とされている本疾患での治療法の改善に向けての情報収集を目的に立案、実施されている。登録期間は比較的短期間であったが、日本、韓国より 41 例が登録され本疾患研究では最大規模となることが予想される。これまで ANKL は 100 例あまりの報告がなされているが、ほとんどが症例報告ないしは単独施設からのものであり、1998 年に実施された本邦 NK 腫瘍研究会の臨床疫学的調査による 22 例が多施設共同研究ではほとんど唯一であった。次いで韓国、中国、ニュージーランドとなっており、東アジアが大半を占め、日本を含む当地域に多く欧米ではきわめて稀であることを伺わせる。EBV ウイルスが高頻度に陽性であることとともに ENKL と共通する特徴である。東アジアにおいて

も ANKL に関する前向き研究はこれまでなされておらず、本疾患の希少性や SMILE-PI における登録状況からしてもその実施はきわめて困難と考えられる。そのため最近の特に造血細胞移植療法に関する状況の変化と進歩が ANKL の治療法に影響している可能性を考え後ろ向き研究を実施することとした。診断に関しては中央標本検討会を実施することで正診率を高めるよう心がけた。韓国の症例を含めての詳細な解析は今後なされる予定であり、ANKL の早期診断および有効な治療法開発につながる情報が得られることを期待したい。信州大学では ANKL07 に 9 例を登録した。

E. 結論

ENKL 限局期例では放射線治療と化学療法併用により予後が改善し、初発 IV 期・再発・難治 ENKL に対しては SMILE-PII が進行中である。ANKL に関しては前向き研究の困難さを勘案し ANKL07 を計画、実施した。ANKL について日本主導により東アジアでの共同研究として行うことにより、将来の治療法確立ならびに患者の予後改善につながる可能性があり、解析の結果に期待したい。

ANKL07 は 2 国間の研究ではあるが、緊密に連絡を取り合うことで一定水準の臨床研究の質を確保している。本研究や SMILE-PII を通じて、成人悪性リンパ腫における多国間診療研究の基盤形成につながっている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Makishima H, Komiyama Y, Asano N, Momose K, Nakamura S, Ishida F. Peripheral T-cell lymphoma following diffuse large B-cell lymphoma associated with celiac disease. *Internal Med.* 2008 47:295-298.
- (2) Joshita S, Kitano K, Nagaya T, Kamijo A, Nakazawa K, Ishida F. Zygomycosis presenting as acute myocardial infarction during hematological malignancies. *Internal Med* 2008 47:839-842.

- (3) Ito T, Makishima H, Nakazawa H, Kobayashi H, Shimodaira S, Nakazawa Y, Kitano K, Matsuda K, Hidaka E, Ishida F. Promising approach for aggressive NK cell leukaemia with allogeneic haematopoietic cell transplantation. *Eur J Haemat* 2008 81:107-111
- (4) 樋口由美子、伊藤俊朗、松田和之、樋口 司、日高恵以子、今川英里、宇原美帆、中澤英之、石田文宏、山内一由、佐野健司、勝山 努. 骨髄移植後のキメリズム解析を不可能にした再発時付加染色体異常. *臨床血液* 49:109-114,2008
- (5) 石田文宏、伊藤俊朗. NK 細胞腫瘍の血中 EBV 量測定. *血液・腫瘍科* 56:630-635,2008

2. 学会発表

- (1) 百瀬佳代子、牧島秀樹、関口 和、伊藤俊朗、中澤英之、下平滋隆、石田文宏：顆粒リンパ球増多症30例の臨床的検討. 第70回日本血液学会総会
- (2) 伊藤俊朗、金 成元、福田隆浩、田野崎隆二、上田恭典、和氣 敦、小松恒彦、上 昌広、森慎一郎、石田文宏、高上洋一：血縁HLA-I 抗原不適合ドナーを用いたミニ移植：多施設共同臨床第1相試験(RIST0303). 第70回日本血液学会総会
- (3) 仁科さやか、浅野直子、鹿間直人、佐々木茂、中澤英之、関口 和、伊藤俊朗、牧島秀樹、小林光、石田文宏. 10年以上経過後に晩期再発をきたした節外性NK/T細胞リンパ腫、鼻型の臨床的検討. 第70回日本血液学会総会
- (4) 浅野直子、鈴木律朗、大島孝一、鏡味良豊、石田文宏、吉野正、森島泰雄、中村栄男. 節性末梢性T細胞リンパ腫におけるケモカインレセプターおよび細胞障害性分子の発現における関連性について. 第70回日本血液学会総会.
- (5) 牧島秀樹、鈴木剛史、北原桂、伊藤俊朗、中澤英之、百瀬佳代子、関口和、北野喜良、石田文宏. アグレッシブNK細胞白血病におけるIL-18の役割. 第70回日本血液学会総会
- (6) 小浜浩介、牧島秀樹、久保田龍二、出雲周二、魚住公治、石田文宏、有馬直道. 顆粒リンパ球

増多症 (T-LGLL, CNKL, AGNKL) における
NK細胞受容体(KIR)遺伝子解析. 第70回日
本血液学会総会

- (7) Asano N, Suzuki R, Ohshima K, Ishida F,
Kagami Y, Yoshino T, Morishima Y,
Nakamura S. Expression of chemokine
receptors(CXCR3 and CCR4) and cytotoxic
molecules in peripheral T-cell
lymphoma, unspecified and ALK-negative
anaplastic large cell lymphoma. 10-ICML,
Lugano, Switzerland

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

「NK 細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究」班

分担研究課題 「NK 細胞腫瘍の治療研究と東アジア研究組織の構築（臨床試験の実施）」

研究分担者 山口 素子 三重大学医学部附属病院 血液内科 講師

研究要旨

東アジアに多い難治性腫瘍である節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型(ENKL)の初発 IV 期・再発・難治例に対する有効な寛解導入療法を開発するため、東アジアのセンター施設の参加による「未治療 IV 期、再発・難治 NK/T 細胞リンパ腫/白血病に対する SMILE 療法の第 II 相試験 (SMILE-PII)」を計画し、2007 年 7 月から症例登録を開始した。本分担研究者は本試験の計画に参加し、現在研究事務局 (国内)を担当している。2009 年 2 月現在で 60 施設が参加しており、予定の 1.5 倍以上のペースで症例登録が進んでいる。

A. 研究目的

ENKL はかつて致死性正中肉芽腫などと呼ばれ、鼻腔を中心に周辺破壊性に進行し死亡する難治性リンパ腫である。限局期 ENKL に対しては診断後早期での病変部放射線照射の有効性が報告され、近年急速に予後が改善されつつあるが、ENKL の約 10%を占める進行期および再発・難治例では有効な治療法が皆無であり、1 年以内にはほぼ全例が死亡し、長期生存者はない。これらの NK 細胞腫瘍は日本など東アジア諸国では両者合わせて全悪性リンパ腫の 3~8%を占める一方、欧米では 1%未満であり、有効な治療法の開発を行うことがわが国に期待されている。

日本の NK 腫瘍研究者で構成される NK 腫瘍研究会では、香港・韓国・台湾の共同研究者との十分な事前検討の結果、近年の基礎研究の成果から ENKL および ANKL に対し有効性が期待されるエトポシド、L-アスパラギナーゼに、多剤耐性(MDR)非関連薬剤であるイホスファミド、メトトレキサート、およびデキサメタゾンを加え、これら 5 剤の薬物動態を考慮して薬剤投与順序を決定した新規レジメン(SMILE 療法)を考案し、ENKL の未治療

IV 期・再発・難治例および ANKL 例を対象として、SMILE 療法の推奨投与量の決定と安全性の評価を行うアジア多国間第 I 相試験(SMILE-PI; UMIN 臨床試験登録番号 C000000018)を実施した。その結果、投与レベル 1 において完全奏効を含む奏効が得られ、毒性は許容範囲内であることが確認された。

以上より本研究では第 I 相試験で登録のなかった ANKL を除外した対象において SMILE 療法の第 II 相試験を行い、SMILE 療法 2 コースの寛解導入療法としての有効性と安全性を評価する。Primary endpoint は奏効率 (overall response rate)、secondary endpoints は完全奏効率 (%CR)、1 年生存率、初発/再発/難治別の治療効果、再発例での先行レジメン別での治療効果、有害事象発生率とする。登録期間 3 年で 28 名を登録することを予定する。本試験は日本に加えて香港・韓国・台湾・中国のセンター施設の参加による国際間多施設共同研究として実施し、国外参加施設は SMILE 第 I 相試験参加施設を中心に構成する。本研究班は本治療研究すなわち東アジアに頻度の高い腫瘍に対する臨床試験を通じて、東アジアにおける多国間研究グループを構築することを目標としている。

B. 研究方法

本臨床試験は2006年10月の第I相試験登録終了後よりプロトコールコンセプトおよびフルプロトコールの作成を開始した。2007年5月12日にNK腫瘍研究会のプロトコール委員会でフルプロトコールが承認され、同月内にNK腫瘍研究会の参加施設に試験案内が通知された。

臨床試験計画の概要は以下の通りである。

[症例選択規準]

以下の全てを満たすものを適格例とする。

- (1) 生検または骨髄液・末梢血検査によりWHO分類のENKLと診断
- (2) 以下のいずれかであること
 - ① Ann Arbor 病期分類IV期の新規診断例
 - ② 初回治療で寛解(CRまたはPR)後の再発例
 - ③ 初回治療でNCまたはPDであった例
- (3) 年齢15歳～69歳
- (4) Performance status (ECOG) 0-2
- (5) 評価可能病変を有する
- (6) 登録時前にステロイド投与を中止できる
- (7) 十分な骨髄・肝・腎・心・肺機能
- (8) 患者本人よりの書面同意が得られている

[プロトコール治療]

登録後7日以内にプロトコール治療を開始する。
化学療法 (SMILE 療法: Steroid, Methotrexate, Ifosfamide, L-asparaginase, Etoposide)

薬剤	投与量	投与方法	投与日 (Day)
メトトレキサート	2 g/m ²	DIV (6h)	1
ロイコポリン	15 mg/回 x4	DIV or PO	2, 3, 4
イホスファミド	1,500 mg/m ²	DIV (3h)	2, 3, 4
メスナ**	300 mg/m ² x3	IV	2, 3, 4
デキサメタゾン	40 mg/body	DIV or PO	2, 3, 4
エトポシド	100 mg/m ²	DIV (2h)	2, 3, 4
L-アスバラギナーゼ***	6,000 u/m ²	DIV (2h)	8, 10, 12, 14, 16, 18, 20
G-CSF	適応承認量	SC	Day 6より開始 28日毎をめぐりにくり返し2コース施行する。

[予定症例数と研究期間、データ管理、附随研究]

予定症例数 28例、予定登録期間 3年、
追跡期間 1年、総研究期間 4年

データ管理業務は特定非営利活動法人血液疾患臨床研究サポートセンターに委託して行う。

本試験では日本国内のみにおいてENKLにおける末梢血EBウイルスDNA量の臨床的有用性に関する附随研究を実施する。

(倫理面への配慮)

本試験に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言を遵守し、わが国での臨床研究に関する倫理指針あるいは海外各国ではそれに相当する指針に則って実施する。登録に際しては、予め参加施設のIRB承認が得られた説明文書を渡し、臨床試験の内容を口頭で詳しく説明する。試験登録後は、プロトコールを遵守し有害事象発生の防止に努めるとともに、対象患者のプライバシーの保護に十分な配慮を行う。

C. 研究結果

本臨床試験は2007年7月2日から症例登録が開始された。本分担研究者は第I相試験に続いて研究事務局(国内担当)を担当している。当施設では2007年7月2日付でIRB承認が得られた。2009年2月現在の参加施設(IRB承認施設)は60施設である。最初の2例がGrade 4の好中球減少に引き続く感染症で死亡したため、登録を一時休止し、2007年10月12日(日本血液学会・日本臨床血液学会合同総会会期中)に国内外のコアメンバーを招集しurgent meetingを開催した。討議の結果、第I相試験登録患者も含めて重篤な感染症を来した症例で高率に認められたリンパ球数低値例を除外するとともに、感染症リスクの高い患者における治療上の注意事項を加えることを主な内容とするプロトコール改訂を行った上で試験継続することが決定された。この研究者判断は効果安全評価委員会の審査を受け承認された。2007年11月26日より症例登録が再開された。その後Grade 4の非血液毒性が5例(20%)で報告されているものの、各患者は適切な臨床的対応により毒性から短期間で回復しており、治療関連死亡は生じていない。

2009年3月1日現在で計25例が登録されており、予定の1.5倍以上早い集積ペースで症例登録が進んでいる。このため、検出力を80%から90%に高めることを目的とし、登録予定患者数を28から38へ増加するプロトコール改訂が提案された。海

外研究者を含めた検討会が2009年3月に予定されている。

D. 考察

本試験においては第I相試験と同様に患者の安全を守る目的で、通常よりも厳格な有害事象報告規定を使用している。その一例として、予期されるGrade 4の非血液毒性は急送報告対象として取り扱い、報告内容を参加施設内で迅速に共有していることがあげられる。第I相試験では有害事象報告の遅れが問題となったが、本試験では、国内および国外参加施設メーリングリストを通じた継続的な注意喚起、および班会議などでの直接指導により、参加施設数が多いにもかかわらず、現在のところ規定通りに有害事象報告は実施され、研究体制の質は保持されている。

本試験では治療関連死亡が2例生じており、いずれもGrade 3-4の好中球を伴う感染Grade 4によるものであった。この毒性は本試験に先行して実施された第I相試験で観察された唯一のGrade 4の非血液毒性である。本試験ではGrade 4の非血液毒性がこのほかに5件(T-Bil, ALT, 好中球減少を伴わない感染、脳症、Grade 3-4の好中球を伴う感染)が報告されている。以上より、登録患者の安全を十分に考慮しつつ今後も慎重にプロトコール研究を継続していく必要がある。

現在のところ予定集積ペースの約1.5倍以上とわけて順調な登録状況である。一方で当施設では研究事務局として登録期間中に複数症例の登録を行うことを目標とし、近隣施設および関連診療科への呼びかけを行ってきたが、登録には至っていない。原因として、ENKLの2/3以上を占める限局期鼻NK/T細胞リンパ腫の治療成績が近年向上したことにより再発・難治例が急減していること、進行期ENKLでは本試験の対象とならない高齢者あるいは全身状態不良患者のいずれかであることが明らかとなった。実際、本試験の登録症例数は初発例が多く、再発・難治例をはるかに上回っている。引き続き近隣施設および関連診療科への協力要請を行っていくが、この傾向は当科および三重県内のみならず今後一般的にみられる可能性があり、試験運営上注意すべき点と思われる。

E. 結論

ENKLにおいては診断後早期の放射線治療と化学療法の追加あるいは同時併用により限局期例の予後が急速に改善しているのに対し、初発IV期・再発・難治ENKLに対する適切な研究計画に基づく前向き治療研究の報告は皆無であり、有効な治療法は存在しない。初発IV期・再発・難治ENKLに対する本格的な前向き臨床試験は本研究に先立って実施されたSMILE療法の第I相試験が世界初であり、本臨床試験がそれに続くものである。

現在のところ症例登録がきわめて順調に進んでおり、国内外ともに本試験の対象に対する有効な治療開発が急務であり、本試験に対する関心が高いことがうかがえる。引き続き登録患者の安全を十分に考慮した試験運営を継続し、試験完遂をすることで将来の標準治療確立に貢献できるよう努力していく。

本試験では現在のところ、規定を遵守した有害事象報告を始めとして、質の高い臨床試験運営が実現されている。成人の悪性リンパ腫における日本と多国間での治療研究はこれまでほとんど行われていない。本試験を通じて、人的および物的双方における東アジア多国間臨床試験の運営基盤が構築されつつあることが研究者間に実感されており、実際、国際学会やグローバル治験の場においても交流が深められつつある。今後継続的に本研究組織において本試験に続く臨床試験を計画し実施することで、目標とする成人リンパ腫における恒久的な多国間治療研究グループの形成が達成されると予想される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Miyazaki K, Yamaguchi M, Imai H, Kobayashi T, Tamaru S, Nishii K, Yuda M, Shiku H, Katayama N. Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including gd T-cell lymphoma. Blood 113:1071-4, 2009
- (2) Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M, Asai H, Mishima Y, Terui Y, Takahashi S,

- Komatsu H, Ikeda K, Yamaguchi M, Suzuki R, Tanimoto M, Hatake K. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol* 19:1921-6, 2008
- (3) Yamaguchi M, Nakamura N, Suzuki R, Kagami Y, Okamoto M, Ichinohasama R, Yoshino T, Suzumiya J, Murase T, Miura I, Ohshima K, Nishikori M, Tamaru J-I, Taniwaki M, Hirano M, Morishima Y, Ueda R, Shiku H, Nakamura S. *De novo* CD5⁺ diffuse large B-cell lymphoma: Results of a detailed clinicopathological review in 120 patients. *Haematologica* 93:1195-202, 2008
- (4) Shimada K, Matsue K, Yamamoto K, Murase T, Ichikawa N, Okamoto M, Niitsu N, Kosugi H, Tsukamoto N, Miwa H, Asaoku H, Kikuchi A, Matsumoto M, Saburi Y, Masaki Y, Yamaguchi M, Nakamura S, Naoe T, Kinoshita T. A retrospective analysis of intravascular large B-cell lymphoma treated with rituximab-containing chemotherapies. *J Clin Oncol* 26:3189-95, 2008
- (5) Yamaguchi M, Suzuki R, Kwong YL, Kim WS, Hasegawa Y, Izutsu K, Suzumiya J, Okamura T, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K. Phase I study of dexamethasone, methotrexate, ifosfamide, L-asparaginase, and etoposide (SMILE) chemotherapy for advanced-stage, relapsed or refractory extranodal natural killer (NK)/T-cell lymphoma and leukemia. *Cancer Sci* 99:1016-20, 2008
- (6) 山口素子: NK/T 細胞リンパ腫. *内科* 102: 322-325, 2008
- (7) 山口素子: NK/T 細胞リンパ腫. *日本内科学会雑誌* 97: 1595-1601, 2008
- (8) 山口素子: NK 細胞リンパ腫. *血液・腫瘍科* 56: 306-313, 2008
- (9) 山口素子: 限局期鼻 NK/T 細胞リンパ腫の治療. *臨血* 49: 553-558, 2008
- (10) 山口素子: 末梢性 T 細胞リンパ腫と NK/T 細胞リンパ腫の治療. よくわかる悪性リンパ腫のすべて, 飛内賢正編, 永井書店, pp201-213, 2008
2. 学会発表
- (1) Miyazaki K, Yamaguchi M, Imai H, Kobayashi T, Tamaru S, Nishii K, Katayama N: Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including gd T-cell lymphoma. 10th International Conference on Malignant Lymphoma, June 4, Lugano (Focus on Session, #035)
- (2) Izutsu K, Yamaguchi M, Suzuki R, Takada K, Harabuchi Y, Gomyo H, Koike T, Okamoto M, Suzumiya J, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K for The NK-cell Tumor Study Group, Japan: Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood and extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. 10th International Conference on Malignant Lymphoma, June 4, Lugano (Poster session, #229)
- (3) Watanabe T, Kinoshita T, Itoh K, Yoshimura K, Kaba H, Ogura M, Kagami Y, Yamaguchi M, Kurosawa M, Tsukasaki K, Kasai M, Tobinai K, Mukai K, Nakamura S, Ohshima K, Hotta T, Shimoyama M: A New Prognostic Model for Peripheral T/NK-Cell Lymphomas (PTCLs) from Prospective Multicenter Clinical Trials. 10th International Conference on Malignant Lymphoma, June 4, Lugano (Focus on Session, #093)
- (4) Oguchi M, Kagami Y, Ishikura S, Nihei K, Ito Y, Yamaguchi M, Tobinai K, Hotta T, Wasada I, Oshimi K: Upfront radiotherapy with concurrent chemotherapy for localized nasal NK/T-cell lymphoma: Radiotherapy quality assurance (QA) review in Japan clinical oncology group (JCOG) trial 0211. ASTRO2008, September 21-26, Boston, USA (Poster session, #2682)
- (5) 山口素子: リンパ系腫瘍診療の新展開

DLBCL の最適治療確立に向けて わが国からのエビデンスと課題 De novo CD5-positive DLBCL の長期予後と今後の課題. 日本リンパ網内系学会総会 シンポジウム 2008年6月13日 札幌

- (6) 山口素子, 中村直哉, 鈴木律朗, 鏡味良豊, 岡本昌隆, 一迫玲, 吉野正, 鈴宮淳司, 村瀬卓平, 三浦偉久男, 大島孝一, 錦織桃子, 田丸淳一, 谷脇雅史, 平野正美, 森島泰雄, 上田龍三, 珠玖洋, 中村栄男: De novo CD5 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 120 例における詳細な臨床病理学的検討の結果. 第 70 回日本血液学会総会 一般口演 2008 年 10 月 10 日 京都
- (7) 塚崎邦弘, 渡辺隆, 吉村健一, 木下朝博, 鏡味良豊, 伊藤国明, 小椋美知則, 加幡晴美, 山口素子, 黒澤光俊, 笠井正晴, 飛内賢正, 鈴木孝世, 薄井紀子, 正木康史, 末岡榮三郎, 張高明, 永井宏和, 安藤潔, 大西一功, 畑裕之, 吉田功, 松田信, 前田嘉治, 向井清, 中村栄男, 大島孝一, 堀田知光, 下山正徳: 多施設共同臨床試験併合解析による末梢 T/NK 細胞リンパ腫の新たな予後予測モデル(JCOG0108A). 第 70 回日本血液学会総会 プレナリーセッション 2008 年 10 月 12 日 京都
- (8) 島田和之, 末永孝生, 山本一仁, 村瀬卓平, 市川直明, 岡本昌隆, 新津望, 小杉浩史, 塚本憲史, 三輪啓志, 麻奥英毅, 菊地我子, 松本守生, 田村和夫, 佐分利能生, 正木康史, 柏村眞, 吉田喬, 山口素子, 中村栄男, 直江知樹, 木下朝博: 血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫に対する rituximab 併用化学療法の有用性に関する検討. 第 70 回日本血液学会総会 プレナリーセッション 2008 年 10 月 12 日 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

「NK 細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究」班

分担研究課題 「NK 細胞腫瘍の治療研究と東アジア研究組織の構築
（末梢血 EB ウイルス量測定）」

研究分担者 木村 宏 名古屋大学大学院医学系研究科 微生物免疫学 准教授

研究要旨

節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型(ENKL)に対する有効な寛解導入療法を開発するため、東アジアのセンター施設の参加による「未治療 IV 期、再発・難治 NK/T 細胞リンパ腫/白血病に対する SMILE 療法の第 II 相試験 (SMILE-II)」を 2007 年 7 月から開始した。本分担研究者は、微小残存病変評価および予後予測因子としての末梢血 Epstein-Barr ウイルス量測定を担当している。2009 年 2 月 27 日現在で計 24 例が登録され、このうち国内登録症例 17 例に対してウイルス量測定を行った。今後、全登録症例に対してのウイルス定量結果が判明したら、末梢血中 EBV-DNA 定量の臨床的有用性と、全血法と血漿法の優劣を検討していく。

A. 研究目的

本研究の目的は、節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型(ENKL)において、末梢血中の Epstein-Barr virus (EBV) DNA 測定が微小残存病変評価および予後予測因子として有用かどうかを検証することである。さらに全血・血漿のうちいずれの検体が、臨床的に適しているかについても明らかにする。

EBV 関連腫瘍において、患者血清中に EBV-DNA が存在することは、鼻咽頭の扁平上皮がん、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫や胃がんなどで報告されている。末梢血検体における EBV 陽性細胞の同定には、これまで単核球 DNA を用いた PCR が行われてきた。さらにリアルタイム PCR 法で検討することにより、DNA の正確な定量が可能となった。測定に用いる検体の種類については全血、細胞成分、血漿を用いた報告がある。全血 DNA を用いた場合、単核球 DNA と DNA 定量結果はよく相関するが、血清を用いた場合はいずれとも相関は低いと報告されている。パーキットリ

ンパ腫・臓器移植後患者・HIV 感染者を対象とした血清と全血サンプルの比較研究で、全血の方がサンプルとして適当であるとする報告もあるが、これらの報告では単に検出感度のみを見ており、臨床的有用性が検討されているとは言い難い。EBV 関連リンパ増殖性疾患、慢性活動性 EBV 感染症、伝染性単核球症の診断に対する定量的 competitive PCR の有用性の検討では、感度は単核球を用いた方が高いが、特異度では血清を用いた方が高いとする報告もある。

以上の背景から、ENKL における EBV-DNA 定量はまだ少数例での検討しかないものの、難治である本疾患において腫瘍細胞の特性を生かした将来有望な予後予測マーカーと考えられる。また ENKL において、検体として全血と血漿とでどちらが臨床的有用性において優れているかも不明である。よって、本試験においては EBV-DNA 定量の臨床的有用性と、全血法と血漿法の優劣を検討することとした。

B. 研究方法

今回、本研究分担者は国内登録症例についてのみ、EBV-DNA 定量を行う。国外の参加施設については、それぞれ独自に採用しているリアルタイム PCR 法を用いて、EBV-DNA 定量を行うこととする。用いるシステムの違いにより、感度・標準値が異なるため、すべての症例の解析終了後、国内症例と国外症例についての比較を行う予定である。

国内の末梢血 EB ウイルス量定量研究の概要は以下の通りである。

[症例選択規準]

以下の適格規準すべてを満たす患者を登録適格例とする。

- 1) SMILE phase II study の適格基準を満たす症例。
- 2) 附随試験への参加についても患者本人 (15 歳以上 20 歳未満の場合は患者本人および保護者) から文書で同意が得られた症例。

[測定時期]

本試験では、1 症例あたり計 3 回の検体採取を行う。時期は治療開始直前、SMILE 2 コース後、一連の治療 (移植ありまたはなし) 終了後とする。ただし、造血細胞移植を実施した症例では、移植後の免疫能低下に伴う EBV の再活性化を認めることがあるので、3 回目の測定時期は移植後 day 180 頃とする。

[測定方法]

患者より採取した EDTA 加全血を、測定施設である名古屋大学大学院医学系研究科まで送付してもらう。検体を受領後直ちに、全血分画と遠心後上清の血漿分画に分ける。全血・血漿それぞれ 200 μ l より QIA Blood Mini Kit (Qiagen) を用い DNA を抽出する。EBV の BALF5 領域に設定したプライマー・蛍光プローブを用い、リアルタイム PCR 法にて EBV-DNA を定量する。EBV-DNA 量は、全血・血漿の 1mL あたりの分子数 (コピー/mL) で表記する。

[評価方法]

主要評価項目は全血法での SMILE 2 コース後の EBV-DNA の消失率とし、副次的評価項目は、一連の治療終了後 (移植ありまたはなし) の EBV-DNA 消失率、EBV-DNA 量と 1 年生存率の相関、治療反応性との比較、検体の種類 (全血 vs. 血漿) による各評価項目の比較とする。そのほか、病期、国際

予後指標 (IPI)、LDH 値、B 症状などと治療前 EBV-DNA 量、1 年生存率との比較などを、探索的に評価する。

[試験中止の規準]

以下のいずれかの場合、試験を中止する。

- 1) 原病の悪化により、EBV 量測定の採血が困難と判断される場合
- 2) 患者が測定の中止を申し出た場合
- 3) 患者の転居等で、継続しての測定ないし追跡が不可能となった場合
- 4) 試験期間中の死亡

(倫理面への配慮)

本試験に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言を遵守し、わが国での臨床研究に関する倫理指針あるいは海外各国ではそれに相当する指針に則って実施する。登録に際しては、予め参加施設の IRB 承認が得られた説明文書を渡し、臨床試験の内容を口頭で詳しく説明する。試験登録後は、プロトコルを遵守し有害事象発生の防止に努めるとともに、対象患者のプライバシーの保護に十分な配慮を行う。

C. 研究結果

本試験である SMILE SMILE 療法の第 II 相試験は 2007 年 7 月 2 日から症例登録が開始された。2009 年 2 月 27 日現在の参加施設 (IRB 承認施設) は 59 施設であり、24 例が症例登録された。このうち、海外施設登録症例は 7 例であり、残りの 17 例の国内登録症例であった。これらの国内登録症例 17 例に対して末梢血の EBV-DNA 定量を行った。17 例中、3 例は既に 3 回の EBV-DNA 定量が終了しており、5 例については 2 回の解析 (SMILE 2 コース後の解析) を行っている。残り 9 例については登録時の解析のみ行った。全検体が、採取後一両日以内に測定施設に搬送され、解析・評価可能検体と考えられた。

患者末梢血を全血・血漿分画に分けリアルタイム PCR 法により EBV-DNA 定量を行い、それぞれ 1mL あたりの分子数で表記した。この方法による EBV-DNA 検出限界は、概ね 50 コピー/mL であり、それ以下の EBV-DNA 量は測定感度以下と表される。

SMILE 治療開始前の全血中の EBV-DNA 量は、

測定感度以下から 1.1×10^7 までに分布した。一方、血漿中の EBV-DNA 量は測定感度以下から 1.2×10^7 までに分布した。17 例中 3 例は、登録時の全血・血漿いずれからも EBV-DNA が検出されず、EBV 非関連と考えられた。これらの症例については、2 回目以降の EBV-DNA 定量は行っていない。また 2 例については、登録時に EBV-DNA が検出されたが、研究方法の項に掲げた試験中止基準に合致したため、2 回目以降の測定を行っていない。

D. 考察

ENKL は、鼻腔を中心に周辺破壊性に進行し死亡する難治性リンパ腫である。ENKL では、ほぼ全例の腫瘍細胞で EBV が検出される特徴を有する。末梢血中 EBV-DNA 量は、EBV 陽性腫瘍において体内の腫瘍量を反映する指標とされており、その変動を検索することは化学療法反応性を見るためには有益とされてきた。しかし、本邦では適応承認は未だ得られておらず自由に測定できない。また測定方法も、全血法と血漿法の 2 通りがありその優劣は決定していない。本分担研究により、以下の如くの研究成果が期待される。

1) 成熟 NK 細胞性腫瘍に対する末梢血中 EBV-DNA 定量の臨床的意義ははまだ確立されていない。今回の試験により微小残存病変評価としての有用性が示されれば、確実な腫瘍量判定に役立つ、一般臨床のみならず今後行われる臨床研究への貢献が期待できる。

2) 末梢血中 EBV-DNA 定量が予後予測因子となるのであれば、治療における層別化因子となる可能性がある。一般臨床のみならず、今後行われる臨床研究への貢献が期待できる。

末梢血中 EBV-DNA 量は、EBV 陽性腫瘍において体内の腫瘍量を反映する指標とされているが、本邦では適応承認は未だ得られておらず自由に測定できない。また測定方法も、全血法と血漿法の 2 通りがありその優劣は決定していない。よって、本試験においては EBV-DNA 定量の臨床的有用性と、全血法と血漿法の優劣を検討することとした。

E. 結論

ENKL に対する有効な寛解導入療法を開発するため、東アジアのセンター施設の参加による「未治

療 IV 期、再発・難治 NK/T 細胞リンパ腫/白血病に対する SMILE 療法の第 II 相試験 (SMILE-II)」を計画し、2007 年 7 月から症例登録を開始した。本分担研究者は、微小残存病変評価および予後予測因子としての末梢血 EB ウイルス量測定を担当している。2009 年 2 月 27 日現在で計 24 例が登録されており、国内登録症例 17 例に対してウイルス量測定を行った。

検討症例 17 例のうち、3 例については EBV-DNA 陰性であったため、その後の解析は行っていない。残りの 14 例についてもごく一部の症例が 3 回の解析を終了しているに過ぎず、半数の症例からは治療前の検体しか得られていない。よって、現時点では解析結果評価することはできない。今後、全登録症例に対してのウイルス定量結果が判明した時点で、末梢血中 EBV-DNA 定量の臨床的有用性と、全血法と血漿法の優劣を検討していく。

本研究分担では国内登録症例についてのみ、EBV-DNA 定量を行っている。国外の参加施設については、それぞれ独自に採用しているリアルタイム PCR 法を用いて、EBV-DNA 定量を行なう。用いるシステムの違いにより、感度・標準値が異なるため、すべての症例の解析終了後、国内症例と国外症例についての比較を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) [Kimura H](#), Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol* 18: 305-319, 2008.
- (2) Ohshima K, [Kimura H](#), Yoshino T, Kim CW, Ko YH, Lee SS, Peh SC, Chan JKC, and the CAEBV Study Group. Proposed categorization of pathological states of EBV-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disorder (LPD) in children and young adults: Overlap with chronic active EBV infection and infantile fulminant EBV T-LPD. *Pathol Int* 58:

- 209-217, 2008
- (3) Kubota N, Wada K, Ito Y, Shimoyama Y, Nakamura S, Nishiyama Y, Kimura H. One-Step Multiplex Real-time PCR Assay to Analyse the Latency Patterns of Epstein-Barr Virus Infection. *J Virol Methods* 147: 26-36, 2008
- (4) Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Ushijima Y, Kawada J, Nishiyama Y, Kojima S, Kimura H. Oligonucleotide Microarray Analysis of Gene Expression Profiles followed by a Real-time RT-PCR Assay in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *J Infect Dis* 197:663-666, 2008
- (5) Gotoh K, Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada J, Takahashi Y, Yagasaki H, Kojima S, Nishiyama Y, Kimura H. Clinical and virologic characteristics of 15 patients with chronic active Epstein-Barr virus infection treated with hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 46:1525-1534, 2008
- (6) Ono Y, Ito Y, Kaneko K, Shibata-Watanabe Y, Tainaka T, Sumida W, Nakamura T, Kamei H, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Simultaneous monitoring by real-time PCR of Epstein-Barr virus, human cytomegalovirus, and human herpesvirus 6 in juvenile and adult liver transplant recipients. *Transplant Proc* 40:3578-82, 2008
- lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts. National Institutes of Health, Bethesda, USA, September 8, 2008
- (2) Gotoh K, Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada J, Nishiyama Y, Kimura H. Clinical and virologic characteristics of 15 patients with chronic active EBV infection treated with hematopoietic stem cell transplantation. The 33rd International Herpesvirus Workshop. Estril, Portugal, August 1, 2008
- (3) 木村 宏、山内洋平、後藤研誠、伊藤嘉規、西山幸廣. Flow cytometry/in situ hybridization法を用いたEBV感染リンパ球の新規定量・同定法の確立と臨床応用 第56回日本ウイルス学会、ワークショップ ウイルス感染症の診断と治療 岡山、2008年10月28日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット（発明者；木村 宏、他1名）特願 2008-073384

著書

Quintanilla-Martinez L, Kimura H, Jaffe ES. EBV+T-cell lymphoma of childhood: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al., eds. 4th ed, IARC Press, Lyon, p278-280, 2008

2. 学会発表

- (1) Kimura H. Chronic active EBV syndromes in Asia -Clinical features-. International Meeting; Epstein-Barr virus