

Kaneko T, Nakagawa A, et al	Neuroblastoma cells can be classified according to glycosphingolipid expression profiles identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry	Int J Oncol	37(5)	1279-1288	2010
Ochiai H, Nakagawa A, Kamijo T, et al	Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma	Oncogene	29(18)	2681-2690	2010
中澤温子	Anaplastic lymphoma kinase (ALK)	病理と臨床	28 (臨時増刊)	326-327	2010
Souzaki R, Tajiri T, et al	The genetic and clinical significance of MYCN gain as detected by FISH in neuroblastoma	Pediatr Surg Int	27(3)	231-236	2011
Souzaki R, Tajiri T, et al	Hedgehog signaling pathway in neuroblastoma differentiation	J Pediatr Surg	45	2299-2304	2010
Tajiri T, et al	Concordance for neuroblastoma in monozygotic twins: case report and review of the literature	J Pediatr Surg	45	2312-2316	2010
Tajiri T, et al	The implications of surgical intervention in the treatment of neuroblastomas: a 20-year single institution experience	Surg Today			in press(*)
Moroz V, Iehara T, et al	Changes over three decades in outcome and the prognostic influence of age-at-diagnosis in young patients with neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group Project	Eur J Cancer	47(4)	561-571	2011
Kimoto T, Iehara T, et al	Detection of MYCN DNA in the cerebrospinal fluid for diagnosing isolated central nervous system relapse in neuroblastoma	Pediatr Blood Cancer	56(5)	865-867	2011
Tazoe J, Iehara T, et al	Unusual fatty metamorphosis observed in diffuse liver metastases of stage 4S neuroblastoma	Pediatr Radiol	40(5)	777-780	2010

Takahashi H, et al	Optimal cutoff points of CYFRA21-1 for survival in non-small cell lung cancer patients based on running statistical analysis	Anticancer Res	30(9)	3833-3837	2010
Tanaka M, Takahashi H, et al	Trends of stomach cancer mortality in Eastern Asia in 1950-2004: comparative study of Japan, Hong Kong and Singapore using age, period and cohort analysis	Int J Cancer			2011, Mar 21 (Epub)(*)
Takenobu H, Nakagawara A, Kamijo T, et al	CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway-modification	Oncogene	30(1)	97-105	2011
Hishiki T, Nakagawara A, Kamijo T, et al	Reevaluation of trkA expression as a biological marker of neuroblastoma by high-sensitivity expression analysis - a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute	J Pediatr Surg	45(12)	2293-2298	2010
Shi Y, Nakagawara A, Kamijo T, et al	HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma	Eur J Cancer	46(12)	2324-2334	2010(*)

IV. 研究成果の刊行物・別刷

8. 血液・腫瘍

神経芽腫

neuroblastoma

京都府立医科大学大学院医学研究科小児発達医学 家原知子

神経芽腫の治療には適切なリスク分類が必須である。低リスク腫瘍には治療の軽減が行われる。高リスク腫瘍には多剤併用の寛解導入療法と手術・放射線の局所療法、造血幹細胞移植を併用した大量治療が行われる。

診断のポイント

1. 症状 神経芽腫の症状は、腹部腫瘤、眼瞼の腫脹、四肢の疼痛など多彩で、発熱や顔色不良、倦怠感など非特異的な場合も多い。原発腫瘍の発生部位が副腎や交感神経節など体幹の後壁であるため、早期に腫瘤を触知することはまれであるが、乳児期では乳児健診や他疾患で受診した際に偶然、腹部腫瘤として発見されることもある。ただし、乳児期早期にみられる病期 4S の腫瘍では、肝転移腫大による腹部膨満や呼吸障害、皮下転移で発見される場合もある。幼児～年長児例では転移のみられる進行例が多く、骨・骨髄転移による頭痛、腰痛、四肢の疼痛、歩行障害や、眼窩内転移による眼瞼の腫脹、頸部リンパ節腫脹などで発見される。縦隔発生例では咳嗽などの呼吸障害や、眼瞼下垂・発汗の異常などを呈する Horner 症候群がみられることがある。また、縦隔や後腹膜の交感神経節からの発生例では脊椎管内への浸潤をきたし (dumb-bell type)、脊髄圧迫による両下肢麻痺や膀胱直腸障害などがみられることがある。まれな症状として、難治性の下痢や眼球運動障害・小脳失調を呈する opsomyoclonus 症候群がある。

2. 診断に必要な検査 カテコラミン産生腫瘍であり代謝産物であるバニルマンデル酸 (vanilmandelic acid : VMA)、ホモバニリン酸 (homovanilic acid : HVA) が尿中で高値を示す。血液中では神経特異エノラーゼ (neuro-specific enolase : NSE)、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase : LDH)、フェリチンが高

値を示す。

画像診断は、胸腹部の単純 X 線や超音波検査、CT、MRI で原発腫瘍の検索が可能である。遠隔転移の診断には、 ^{123}I を用いた MIBG (meta-iodobenzylguanidine) シンチグラフィが推奨される。まれに、MIBG 陰性の骨転移病変が報告されており、これらの検索には骨シンチグラフィ、単純 X 線撮影を行う。

確定診断は病理組織診断である。国際的な神経芽腫の診断の規準は、以下のいずれか一つを満たす必要がある。

① 原発腫瘍または転移巣の生検を行い、光学顕微鏡検査による腫瘍組織の明確な病理診断が得られていること。その際に、免疫組織検査、電子顕微鏡検査、尿中または血清カテコラミン代謝産物値の上昇が認められることを参考とする。

② 左右両側の腸骨穿刺吸引細胞診と両側の骨髄生検により明確な腫瘍細胞 (たとえば免疫組織学的に陽性の細胞集塊) が認められ、尿中または血清カテコラミン代謝産物値が高値を示していること。

さらに予後因子として、腫瘍組織からの生物学的因子の検索を行うべきである。腫瘍細胞の染色体数 (ploidy)、腫瘍組織中の *MYCN* がん遺伝子の増幅、不均衡な 11 番染色体長腕 (11q) のヘテロ接合性の消失および 1 番染色体短腕 (1p) のヘテロ接合性の消失、17 番染色体長腕 (17q) の増幅などが重要とされている¹⁾²⁾。

3. 組織診断 神経芽腫の病理分類は、International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) 分類に従って分類することが推奨されており、間質の増生量、細胞の成熟度、細胞の有糸分裂-核崩壊指数 (mitosis karyorrhexis index : MKI) と患者の年齢に基づいて、予後良好 (favorable) および予後不良 (unfavorable) に分類される。この病理分類は予後と強く相関する (表 1)³⁾。

4. 病期分類 1993 年に定められた神経芽細胞腫国際病期分類 (International Neuroblastoma Staging System : INSS) は、国際的に頻用されている病期分類である。この分類は手術後に判定されるもので、表 2 のとおりである。一方、2009 年に International Neuroblastoma Risk Group Risk (INRGR) が報告されたが⁴⁾、このリスク分類では、術前の画像検査での

病期分類として、International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) が提唱されている(表3)⁵⁾。

重症度評価

神経芽腫は自然退縮するものから、遠隔転移や腫瘍進展をきたして致命的となるものまで、その病態は多岐にわたる。したがって、リスクに応じた治療選択が必要となる。リスク分類は、診断時年齢、病期、病理組織分類などの臨床的因子に、MYCN 遺伝子増幅、腫瘍細胞の染色体数 (ploidy)、染色体異常などの分子生物学的因子を組み合わせて判定し、低・中間・高リスクの3群に分類するのが一般的である。リスク分類は各国の臨床試験に合わせて国ごとにさまざまであったが、近年、リスク分類を国際的標準化する目的で、INRGR が報告された。INRGR では、年齢 (18 カ月)、病期、MYCN 遺伝子の増幅、11 番染色体長腕の欠失 (11qLOH) を予後因子として用いている (表4)。

基本病態

神経芽腫は、胎生期の神経堤細胞を起源とする細胞ががん化したものであり、頸部・胸部・骨盤部など体幹の交感神経節や副腎髄質に多く発生する。悪性度が高く、腫瘍の増大・進展を示すものや自然退縮や分化傾向を示すものなど、さまざまな腫瘍動態を示す。

小児がんの中では白血病・脳腫瘍に次いで多くみられる腫瘍である。米国の報告では、15 歳未満の小児腫瘍の 10%前後を占め、7,000 人に 1 人の発生割合である。わが国では年間 320 例前後の新規患児が発生している。年齢分布では 0 歳でもっとも高いピークがあり、3 歳に第二の低いピークをもつ二峰性のパターンを示す。

予後は診断時年齢と強く相関し、一般的に年長児の予後は不良であるが、乳児では自然退縮・分化を示す腫瘍が多く、予後良好とされている。年齢因子は連続的なリスク因子であるが、近年の INRG の報告で、年齢

のカットオフは 1 歳から 1 歳半 (18 カ月) に変更された。

治療の実際

神経芽腫の治療指針は、リスク分類に従って決定される。

1. **低リスク腫瘍** 低リスク群は限局性腫瘍と病期 4S で、ほとんどが乳児例である。限局性腫瘍の基本的な治療方針は手術のみである。初診時に全摘

表1 International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) (文献3) より引用)

1. neuroblastoma/subgroup
 - a) undifferentiated
 - b) poorly differentiated
 - c) differentiating
2. ganglioneuroblastoma (GNB), intermixed
3. ganglioneuroma (GN)/subgroup
 - a) maturing
 - b) mature
4. ganglioneuroblastoma (GNB), nodular

予後不良群 (unfavorable histology) は、以下の腫瘍である

- 神経芽腫
 - ①腫瘍細胞の分化度、年齢にかかわらず、high MKI を示す腫瘍
 - ②全年齢における undifferentiated NB
 - ③1.5 歳以上の神経芽腫、poorly differentiated
 - ④1.5 歳以上で発生した中等度 MKI を示す神経芽腫
- GNB・nodular

発生年齢と結節を形成する神経芽腫成分の分化度および MKI の程度によって予後が決定される。すなわち神経芽腫成分が上記①～④に相当する群

MKI: 有糸分裂・核崩壊指数

表2 International Neuroblastoma Staging System (INSS) (文献2) より引用)

病期	定義
1	限局性腫瘍で、肉眼的に完全切除。組織学的な腫瘍残存は不問。同側のリンパ節に組織学的な転移を認めない (原発腫瘍に接し、一緒に切除されたリンパ節転移はあってもよい)
2A	限局性腫瘍で、肉眼的に不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認めない
2B	限局性腫瘍で、肉眼的に完全または不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認める。対側のリンパ節に転移を認めない
3	切除不能の片側性腫瘍で、正中線 (対側椎体縁) を越えて浸潤。同側の局所リンパ節の転移は不問。または、片側発生の限局性腫瘍で対側リンパ節転移を認める。または、正中発生の腫瘍で椎体縁を越えた両側浸潤 (切除不能) か、両側リンパ節転移を認める
4	いかなる原発腫瘍であるにかかわらず、遠隔リンパ節、および/または、骨、骨髄、肝、皮膚、他の臓器に播種している (4S は除く)
4S	限局性腫瘍 (病期 1, 2A, 2B) で、播種は皮膚、および/または、肝、骨髄に限られる (1 歳未満の患者のみ)。骨髄中の腫瘍細胞は有核細胞の 10% 未満で、それ以上は病期 4 である。MIBG シンチグラフィが行われるならば骨髄への集積は陰性

出が可能な腫瘍に関しては、手術摘出のみで治療を終了する。初診時に全摘出が不能で、生検や垂全摘にとどまった症例に関しては、手術後の残存腫瘍に対して化学療法を行う研究と、手術後は残存腫瘍があっても化学療法は行わず、再発後に化学療法を追加する研究が報告されている。一般的には2~4剤の化学療法薬を組み合わせ、低用量の化学療法を周期的に行う。わが国では、過去の乳児神経芽腫プロトコルが標準的になっているが、非切除症例に対してビンクリスチン (VCR)+シクロホスファミド (CPA) または、VCR+CPA+ピラルビシン (THP) による化学療法が安全かつ有効であった⁶⁾。

また、わが国でのマス・スクリーニング発見例やドイツでの無症状の乳児の低リスク症例の一部では試験的に、自然退縮を期待して経過観察が行われている。

2. 中間リスク腫瘍 中間リスク腫瘍は、MYCN 遺伝子非増幅で一次的に手術摘出が困難な限局性腫瘍と、乳児の MYCN 遺伝子非増幅の病期 4 である。原発巣の一次的全摘が不可能であり、初回手術は生検にとどまる。初期治療として化学療法を施行し、その後、二次的手術にて原発巣の摘出となる。諸外国では、化学療法はシスプラチン (CDDP)、ドキシソルビシン (DXR)、CPA、エトポシド (VP-16) などから2ないし4の薬剤併用治療を周期的に行っている。さらに米国では、初期治療で寛解に至らなかった一部の症例に対して大量治療を行っており、フランスでは骨転移に対して放射線治療を併用している。しかし、大量治療の有効性や放射線治療の適応については議論のあるところである。中間リスク群は非常に不均一な集団であり、その治療薬剤や期間に一定の見解は

得られていない。わが国の乳児神経芽腫治療プロトコルでは、VCR+CPA+THP を9コースまたはVCR+CPA+THP+CDDP を6コース施行し、9805 研究では MYCY 遺伝子非増幅で INSS の病期 4 (n=36) は3年 EFS (event-free survival: 無再発生存率) が94%という良好な成績が得られた。

3. 高リスク腫瘍 高リスク神経芽腫には、MYCN 遺伝子増幅例や1歳以上の病期 4 症例が含まれる。これらの症例に対する治療は、強力な多剤

表 3 International Neuroblastoma Risk Group Staging System (INRGSS) (文献4) より引用

stage	定義
L1	限局性腫瘍で多臓器への浸潤なし
I2	限局性腫瘍で多臓器への浸潤あり
M	遠隔転移あり
MS	I1, I2の腫瘍で骨髄、皮膚、肝臓へ転移あり

表 4 The International Neuroblastoma Risk Group consensus pre-treatment classification schema (INRGR) (文献4) より引用

INRG stage	年齢	diagnostic category tumor grade	MYCN	11q aberration	ploidy	pre-treatment risk group
L1		GN maturing	NA			A Low
		GNB intermixed	NA			B Low
		any, except GN maturing or GNB intermixed	NA			H High
I2		GN maturing	NA			A Low
		GNB intermixed	NA			B Low
	<18 m	any, except GN maturing or GNB intermixed	NA	No		D Intermediate
			NA	Yes		I High
	≥18 m	GNB nodular, differentiating	NA	No		E Intermediate
		GNB nodular, poorly differentiated or undifferentiated	NA	Yes		J High
NB, poorly differentiated or undifferentiated		NA	(Any)		J High	
(Any)		Amp			N Ultra-High	
M	<18 m		NA		Hyperdiploid	F Intermediate
			NA		Diploid	G Intermediate
	≥18 m		Amp			O Ultra-High
						P Ultra-High
MS	<18 m		NA	No		C Low
			NA	Yes		K High
			Amp			Q Ultra-High

併用の寛解導入療法と、手術摘出および放射線治療による局所治療を行い、最後に自己造血幹細胞移植を併用した大量治療を行うという集学的治療が一般的である。米国では5コースのCDDP+DXR+CPA+VP-16からなる導入療法を行い、寛解導入率は78%であった。わが国の進行神経芽腫のスタディでは、VCR+CPA+THP+CDDPからなる導入療法を行い、寛解導入率は93%であった。米国の前向き試験での、自己造血幹細胞移植併用の大量化学療法を施行した群の5年EFSは30%であり、後療法としてレチノイン酸を内服した群での5年EFSは59%の治療成績であった⁷⁾。高リスク腫瘍に関しては、各国でさまざまな臨床試験が組まれており、わが国でも局所療法を大量治療の後に行う局所遅延療法が試みられている。また、高リスク腫瘍の化学療法は非常に強力であり、重度の腎機能障害や骨髄抑制からくる重症感染症などによる致死合併症が散見される。後遺障害としての聴力障害、成長障害、性腺機能障害も問題となっている。

最新ガイドライン/エビデンス

わが国の神経芽腫に対するガイドラインは、2005年に「抗がん剤適正使用ガイドライン」として、厚生労働省と日本癌治療学会の要望を受けて日本小児がん学会により作成されたが、今回、最新のエビデンスを取り入れて「がん診療ガイドライン」として作成中であり、2010年に完成予定である。

神経芽腫の治療についてエビデンスが得られている事項としては、以下の内容がある。外科的に全摘できた低リスク腫瘍に対しては、外科的摘出術のみにて経過観察可能である。高リスク腫瘍に対する自己造血幹細胞移植併用大量化学療法については、維持療法群との無作為割り付け比較試験の結果から、その有用性が証明されている。

近年のトピックス

前述のとおり、新規リスク分類であるINRGRが国際コンセンサスとして定められた。この中で、今まで12カ月で予後のカットオフが定められていたが、18カ月に変更となった。また、手術前の画像診断に基づく病期分類として、INRGSSが定められたのも特筆すべき点である。さらに、Image Defined Risk Factors (IDRF) という、手術前の画像診断で手

私の治療方針

初診時に、生物学的因子を含む診断を十分に行い、リスク判定に基づいた治療選択を行う。低リスク腫瘍に関しては副作用を最小限に抑えた治療選択が必要であり、手術時期や化学療法の施行、継続についての決定にはcancer-boardによる慎重な対応を行っている。高リスク腫瘍については、強力な化学療法を中心とした集学的な治療が必要であるが、治療間隔を空けずに、腎障害などの副作用の出現を最小限に抑えた薬剤投与を行っている。

術リスクを判定する指標が定められた。このことで、手術合併症を減少させると期待されている。

また、神経芽腫の発生、病因の解明のための基礎研究は盛んになされているが、この中で2008年には、受容体型チロシンキナーゼALK遺伝子の点突然変異が神経芽腫の発がんにかかわっていることが明らかとなり、治療への発展が期待されている。

ピットフォールと対策

神経芽腫はリスク分類による治療指針が重要であり、初期診断が重要である。そのためには、疾患に精通した小児科医、小児外科医、病理医、放射線診断医によるチーム医療が必須である。また、低リスク群は予後良好で大部分の腫瘍が自然退縮するとの誤解が生じやすい。無治療で経過観察を行う場合は、患者家族への十分な説明同意のうえで、疾患に精通した医療チームによって慎重に行われることが望ましい。

文献

- 1) Maris JM et al.: *Lancet* 369: 2106-2120, 2007
- 2) Brodeur GM et al.: *J Clin Oncol* 11: 1466-1477, 1993
- 3) Shimada H et al.: *Cancer* 92: 2451-2461, 2001
- 4) Cohn SJ et al.: *J Clin Onco* 27: 289-297, 2009
- 5) Cecchetto G et al.: *J Clin Oncol* 23: 8483-8489, 2005
- 6) 家原知子: *小児がん* 41: 35-38, 2004
- 7) Matthay KK et al.: *J Clin Oncol* 27: 1007-1013, 2009

著者連絡先

〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465
京都府立医科大学大学院医学研究科小児発達医学
家原知子

第24回日本小児がん学会教育セッション 神経芽腫に対する集学的治療法：化学療法を中心に

七野 浩之, 陳 基明, 麦島 秀雄

I 概 念¹⁾

神経芽腫 (neuroblastoma) の概念は, Pepper, Hutchinson, Wright の3人の先駆者により確立した²⁾. 1901年にPepperらは肝臓と副腎の先天性肉腫6例の報告を行った. 続いて1907年にHutchinsonらが副腎腫瘍の眼窩転移例7例を報告した. そして1910年にWrightらが初めてneuroblastomaの用語を使用し神経芽腫の概念が確立している.

「神経芽腫」とは通常広義に用いられ, それは組織学的な分類として, 狭義の神経芽腫 (neuroblastoma) と神経節芽腫 (ganglioneuroblastoma) 及び神経節腫 (ganglioneuroma) の3種類を総称するものである. 最近では広義の神経芽腫を, 脳腫瘍である中枢性神経芽腫と区別するために, 末梢性神経芽腫群腫瘍 (pNTs; peripheral Neuroblastic Tumors) と呼称するようになった^{1,3)}.

神経芽腫は, 胎生期の神経堤 (あるいは神経冠) (neural crest) を起源とする神経芽細胞が成熟分化せずに腫瘍化したものと考えられ, 副腎髄質および交感神経系組織に発生する胎児性腫瘍である^{1,3)}.

発生頻度は小児悪性固形腫瘍の中で脳腫瘍に比べて多く, 日本の小児がんの中の10~20%を占める. アメリカでは7,000人出生に対し1人の割合で発生し, 年間約600~650人の発生がある¹⁾. 日本では出生数あたりの発生頻度は把握されてい

ないが, 日本神経芽腫研究グループ (Japan Neuroblastoma Study Group/JNBSG) の種々のアンケート調査などからの推計では年間に90~130例, そのうち高リスク神経芽腫は年間50~70例程度と考えられる⁴⁾. アメリカ Children's Oncology Group (COG) の統計では年齢のピークは出生時であり, 1歳未満は36%, 5歳未満で89%, 10歳未満で98%を占める¹⁾.

II 病態生理

神経芽腫の好発部位は副腎で65%を占め, その他は頸部, 後縦隔, 後腹膜, 骨盤腔などの交感神経節である. 左右差は3:2の割合で左に多い. 転移は骨, 骨髄, 肝, リンパ節, 皮膚, 眼窩等に認められる. 硬膜, 脳実質あるいは肺転移の報告もある¹⁾.

ほとんどの神経芽腫は血清カテコラミン (ドパミン, アドレナリン, ノルアドレナリン) を産生し, その尿中代謝産物であるバニルマンデル酸 (VMA) とホモバニリン酸 (HVA) などが上昇するため, これを腫瘍マーカーとして利用できる. また血中の神経特異エノラーゼ (neuron-specific enolase: NSE) が高値となることも多い¹⁾.

組織学的に狭義の神経芽腫は, クロマチンに富む核と乏しい細胞質からなる小円形の神経芽細胞とわずかな神経線維からなり, その間に間質細胞が存在する. 神経節芽腫は, 未分化な神経芽細胞と分化した神経節細胞が混在するものである. 神経節腫は, 主として神経節細胞からなるものである. 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会分類では, 神経芽腫 (花冠-細線維型・円形細胞型),

神経節芽腫（分化型・混成型・低分化型），神経節腫に分類している³⁾。

Beckwithらの研究から胎生期には多数の *in situ* neuroblastoma が存在し，その大多数は自然に成熟または消退し，残りのごく一部が神経節腫になるものと推定されている。日本で行われたマススクリーニング症例の検討からも，マススクリーニングで発見された神経節腫のうちあるものは自然退縮や分化成熟することが判明した^{3,5)}。しかし1歳半（あるいは1歳）以上で診断される症例はそのほとんどの病期は進行しており，また生物学的予後因子も不良なことが多く，治療抵抗性であることが多い。

1970年代に開始され連続と継続されている研究から，現在では，予後と密接に関連している因子には，年齢，stage，病理組織学的分類，*MYCN*，DNA ploidy，染色体異常（1p-，11q-，17q+）等が考えられている^{1,3,6)}。

Brodeurらの検討では，*MYCN*が増幅している頻度と3年生存率は，良性の神経節腫ではそれぞれ0/64・100%，低リスク群病期1と2では31/772・90%，4Sでは15/190・80%，進行例では612/1974・40%である。Shimadaらの検討ではFavorable Histology (FH) 329例では*MYCN*非増幅325例・増幅4例であるが，Unfavorable Histology (UH)では243例中*MYCN*非増幅164例・増幅79例であった。*MYCN*増幅はすなわち予後不良であるが，非増幅は必ずしも予後良好ではない。UHの中では*MYCN*増幅腫瘍は非増幅腫瘍より早期に発症する傾向にあり，分化傾向が見られず，high MKIを呈する特徴がある¹⁾。

DNA ploidy が3倍体の腫瘍は2倍体・4倍体に比しDNAが不安定であるため，細胞の生存及び分裂増殖に不利であり，治療に対する反応性が良いと言われている。Flow cytometryによりDNA量を検討する。DNA index (DI)=1はdiploidを反映し予後不良であるが，FHではschwann細胞が2倍体のためDI=1になる^{1,3,6)}。

III 臨床症状

臨床症状には原発部位の腫瘍による症状と転移

による症状があり，年齢と原発部位・病期により様々である。

乳児期早期の症例は多くが限局例であり症状を認めない。乳児期のマススクリーニング発見例は一般的に無症状であった。4S期では，瀰漫性肝転移による腹部膨満症状とそれによる胸部圧迫のための呼吸器症状を認めることがある。進行例には，腹部膨満，食欲不振，発熱などの他に，遠隔転移の症状としての顔面蒼白，貧血，眼球突出，眼瞼出血，骨痛，関節痛，跛行などが認められるが，発熱のみの場合や偶然の腹部腫瘍触知による発見まで無症状のこともある。特殊な症状として，Horner症候群やopsomyoclonus，小脳性運動失調あるいは脊椎管内への腫瘍進展による神経麻痺，腫瘍から産生されるカテコラミンによる異常な発汗や高血圧，血管作動性腸ペプチド産生による水様性下痢などが見られることがある¹⁾。

IV 診断

診断は原発腫瘍または転移巣の開創生検を行い光学顕微鏡検査により病理組織学的に確定診断する。あるいは，骨髓検査で腫瘍細胞の転移が確認され，かつ尿中VMAやHVAが明らかに高値である場合は，原発腫瘍の組織学的検討を行わずに神経節腫と診断してよい。しかしながら原則としては，診断を確定し，治療方針を決定するために必要な腫瘍の生物学的予後因子を検討するために，原発腫瘍（あるいは転移巣）の開創生検を行うべきである。針生検による病理診断は正確な診断に至ることが困難な場合があり，また生物学的予後因子の検索ができないことが多く，神経節腫以外の固形腫瘍の場合も含め薦められない^{1,3)}。

*MYCN*コピー数やDNA ploidyなどの分子生物学的予後因子の検索を行うことが，リスク分類による治療方針の決定には必要である^{1,3)}。

病理組織学的分類はInternational Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)が国際的に標準的である。これは，神経節腫細胞の形態に，診断時年齢，Schwann細胞の発達(stroma)，神経細胞の分化程度(differentiation)，核崩壊程度(Mitosis-karyorrhexis index) (MKI)を加味し，

組織型としては Neuroblastoma/Ganglioneuroblastoma, intermixed/Ganglioneuroma/Ganglioneuroblastoma, nodular の4型に分類し、さらに予後のグループとして Favorable Histology Group (FH) と Unfavorable Histology Group (UH) に分類するものである^{1,3)}。

V 病期分類

これまで病期分類は日本小児外科学会悪性腫瘍分類, Evans system, St. Jude Children's Research Hospital and POG classification などが使用されてきたが、現在は神経芽細胞腫国際病期分類 (International Neuroblastoma Staging System/INSS) (表1) が使用される⁷⁾。病期分類には初診時での原発腫瘍の広がり、リンパ節転移、肝転移、あるいは神経芽腫の好発部位である交感神経の経路に沿った部位への転移の把握が必要であり、これには全身の X 線 CT や MRI が必要である。さらに骨及び骨髄転移の検索が必須で、I-123 metaiodo-benzylguanidine (MIBG) シンチグラフィー及び Tc-99m 骨シンチグラフィーが必要である。骨髄転移の検索には、治療効果の判定として International Neuroblastoma Response Criteria (INRC) (表2) を用いる場合には左右2箇所の上腕骨での骨髄穿刺吸引検査と左右2箇所の骨髄生検が必要とされている⁷⁾。

表1 神経芽細胞腫国際病期分類 (International Neuroblastoma Staging System/INSS)

病期	定義
1	限局性腫瘍で、肉眼的に完全切除。組織学的な腫瘍残存は不問。同側のリンパ節に組織学的な転移を認めない。(原発腫瘍に接し、一緒に切除されたリンパ節転移はあってもよい)
2A	限局性腫瘍で、肉眼的に不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認めない。
2B	限局性腫瘍で、肉眼的に完全または不完全切除。原発腫瘍に接しない同側リンパ節に組織学的に転移を認める。対側のリンパ節に転移を認めない。
3	切除不能の片側性腫瘍で、正中線(対側椎体縁)を越えて浸潤。同側の局所リンパ節の転移は不問。または、片側発生の限局性腫瘍で対側リンパ節転移を認める。または、正中発生の腫瘍で椎体縁を越えた両側浸潤(切除不能)か、両側リンパ節転移を認める。
4	いかなる原発腫瘍であるかに関わらず、遠隔リンパ節、及び/または、骨、骨髄、肝、皮膚、他の臓器に播種している。(4Sは除く)
4S	限局性腫瘍(病期1, 2A, 2B)で、播種は皮膚、及び/または、肝、骨髄に限られる(1歳未満の患者のみ)。骨髄中の腫瘍細胞は有核細胞の10%未満で、それ以上は病期4である。MIBGシンチが行われるならば骨髄への集積は陰性。

VI リスク分類

神経芽腫は、年齢、病期、病理学的特徴、分子生物学的特徴などにより著しく予後が異なる。このため治療選択の基準として、病期分類にさらにいくつかの予後因子を組み合わせたリスク分類の必要性が提唱されている。リスクは予後との関連により低リスク群、中間リスク群、高リスク群に分類することが一般的である。これまでは日米欧で独自のリスク分類が提案されてきたが、現在は国際的な統一分類の開発(The International Neuroblastoma Risk Classification (INRG))が企画され討議されている^{8,9)}。さらに今後は分子生物学的予後因子を組み込んだリスク分類が創案されることと考えられる。代表的なリスク分類である COG のリスク分類では、年齢と INSS 病期分類、INPC 組織分類、MYCN 増幅の有無及び DNA index により表3のように分類している^{1,10)}。

VII 鑑別診断

HE 染色による形態判断では鑑別が困難な腫瘍群を小円形細胞腫瘍と呼び、悪性リンパ腫、ユーイング肉腫ファミリー腫瘍、横紋筋肉腫と神経芽腫が含まれる。これらの鑑別には生検あるいは摘出組織を利用して免疫染色や電子顕微鏡検査ある

表2 効果判定規準 (International Neuroblastoma Response Criteria/INRC)

評価	原発巣	転移巣
CR (complete response)	腫瘍無し	腫瘍無し カテコールアミン代謝産物正常化
VGPR (very good partial response)	90%—99%縮小	腫瘍無し カテコールアミン代謝産物正常化、骨シンチでの集積は残存していてもよい (MIBG シンチは陰性化していなければならない)
PR (partial response)	50%以上縮小	測定可能病変が50%以上縮小 骨転移の病変数が50%以上減少 骨髄転移の病変数は0—1か所 (MIBG シンチでの集積は残存していてもよい)
MR (mixed response)	新病変の出現なし 原発巣および転移巣の測定可能病変において50%以上縮小する病変を認める 同時に他の病変は50%未満の縮小や25%未満の増大を示す	
NR (no response)	新病変の出現なし 原発巣および転移巣の測定可能病変は、50%未満の縮小や25%未満の増大を示す	
PD (progressive disease)	新病変の出現 あるいは原発巣および転移巣の測定可能病変において25%以上の増大を示す病変を認める もしくは骨髄の転移病変の新たな出現	

CR, VGPR, PR, MR, NR については定義に述べられた全ての要件を満たしていることが必要である。PD に関しては定義に述べられたいずれかの要件を満たした状態である。

Brodeur GM, et al.: J Clin Oncol 11(8) : 1466-7, 1993 より引用

表3 COG リスク分類

低リスク	<ol style="list-style-type: none"> 1. 患者の年齢を問わず INSS 1 期 2. 1 歳未満の INSS 2A 期及び 2B 期 3. 1 歳以上で、FHG の INSS 2A 期及び 2B 期 4. 1 歳以上で、<i>N-MYC</i> 増幅なしの INSS 2A 期及び 2B 期 5. 1 歳未満で、<i>N-MYC</i> 増幅なし、かつ FHG、かつ高二倍体 DNA である INSS4S 期
中間リスク	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 歳未満で、<i>N-MYC</i> 増幅なしの INSS 3 期 2. 1 歳以上で、<i>N-MYC</i> 増幅なし、かつ FHG の INSS 3 期 3. 1 歳未満で、<i>N-MYC</i> 増幅なしの INSS 4 期 4. 1 歳未満で、<i>N-MYC</i> 増幅なし、かつ二倍体に近い DNA の INSS 4S 期 5. 1 歳未満で、<i>N-MYC</i> 増幅なし、かつ UFHG の INSS 4S 期
高リスク	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 歳以上で、<i>N-MYC</i> 増幅あり、かつ UFHG の INSS 2A 期及び 2B 期 2. 患者の年齢を問わず、<i>N-MYC</i> 増幅ありの INSS 3 期 3. 1 歳以上で、UFHG の INSS 3 期 4. 1 歳未満で、<i>N-MYC</i> 増幅ありの INSS 4 期 5. 1 歳以上の INSS 4 期 6. 1 歳未満で、<i>N-MYC</i> 増幅ありの INSS 4S 期

FHG;INPC で favorable histology group, UFHG;INPC で unfavorable histology group

記載のない項目は不問である

Castleberry RP. Eur J Cancer. 33 : 1430-1437, 1997 より引用

いは分子生物学的検査を施行する必要がある。また腫瘍マーカーとしての血清カテコールアミンやVMA, HVAなどを確認することが有効である。NSEは小円形細胞腫瘍ではいずれの腫瘍でも上昇することがある。また原発部位が腎近傍の場合には腎芽腫などの腎原発腫瘍との鑑別も必要である^{1),3)}。

VIII 予 後

予後を規定する最も重要な因子は適切な治療法である。このためリスク分類を設定し、リスクごとに治療強度を規定し、より適切な治療法の開発が検討されている。日本ではリスク分類は未だ議論の途上ではあるが、今後治療成績の集積により改善していくものと考えられる。今のところ1歳半以上あるいはstage 4あるいはMYCNが増幅している神経芽腫の予後は、骨髄破壊的大量化学療法を行っても3年無増悪生存割合として20~40%台に過ぎない。大量化学療法後の主な再発形式は骨あるいは骨髄再発である。現在アメリカではCOGのリスク分類に基づき3年全生存割合を低リスク群で90%超、中間リスク群で70~90%、高リスク群で30%超と推測している¹⁾。日本全体としての治療成績は明らかではない。

IX 治療方針

神経芽腫の治療は以前よりリスクに基づいた治療戦略が行われてきた。現在のCOGの治療方針は低リスク群では外科切除後経過観察、中間リスク群では外科切除と通常的化学療法、高リスク群では集学的治療が必要となり、外科切除に加え積極的な化学療法と大量化学療法 + 自家造血細胞移植及び放射線療法である。日本においても以前よりほぼ同様の治療方針が採られている。

低リスクあるいは中間リスク例の治療は第1選択としては外科切除を行う。外科療法単独で可能な場合や、あるいは6~12~24週間の化学療法を併用する場合がある。化学療法による障害を抑えるために薬剤使用量を少なくする努力が行われている。

ダンベル症候群をきたし脊髄圧迫症状を起こし

ている例では、神経学的な症状を一刻も早く改善し神経症状が永続するのを回避するために緊急化学療法を行うべきである。神経圧迫症状の期間が短いほど神経学的回復が期待される。椎弓切除術あるいは放射線療法も同等の治療効果が期待できるが、いずれもその後の化学療法が必要になるため、速やかな化学療法の実施が望ましいと考えられている¹⁾。

X 進行例に対する治療方針

種々の研究により明らかにされた予後不良因子(遠隔転移・MYCN増幅・UH・DNA index \leq 1など)を持つ高リスク神経芽腫は、現在なおその3年無増悪生存割合で20~40%であり、新たな有効な治療法の開発が切に待ち望まれている。

高リスク神経芽腫の進行は早く、発見後あるいは化学療法中にも急速に進展する例が多く見られ、原発部位の増大だけでなく骨・骨髄・リンパ節・肝・後腹膜・後縦隔などに急速に転移・浸潤する特徴がある。また、集学的治療が奏効し治療を終了できたとしても、治療後すぐから再発を認めることが多い。近年では原発巣局所に対する外科及び放射線療法が進歩してきており、以前よりも原発巣局所からの再発は減少して来たが、その代わりに骨や骨髄再発が主体となってきている。再発時期は骨髄破壊的大量化学療法施行直後から2年以内にほとんどの再発がみられ、その後も5年以上にわたり再発がみられる¹⁾。

現在日米欧では、高リスク神経芽腫に対しては、診断時に原発巣を安全に全摘出できる症例がほとんどなく、骨・骨髄転移例が多く、速やかに全身化学療法を行わないと生命の危険性が高いと判断されることから、生検後に速やかに寛解導入化学療法(induction)が開始される。化学療法を数コース行った後、局所療法として外科切除術および局所放射線療法を組み合わせた治療を行い、その後強化した化学療法かあるいは骨髄破壊的大量化学療法による地固め療法(consolidation)を行うものが多い。化学療法としてはシスプラチン・カルボプラチン・シクロフォスファミド・イホスファミド・エトポシド・ビンクリスチン・ピラルビシ

ン・ドキシソルピシンなどから2-4剤を選択し、それらを組み合わせて併用する種々の化学療法計画が考案され実施されている。また大量化学療法としては、現在主として行われているのはメルファラン+エトポシド+カルボプラチンの組み合わせによるMEC療法(CEM療法)やブスルファン+メルファランの組み合わせによるBU/Mel療法などである。TBIについては議論の多い部分であるが、近年ではTBIによる腎障害、間質性肺炎、肝中心静脈閉塞症などの急性毒性と、成長障害、内分泌障害、白内障、二次がんなどの晩期毒性の重大性から、生存者の生活の質も重視したnon-TBIによる治療開発が世界的に進行している¹⁾。

これらの高リスク神経芽腫に対する世界各国における標準的治療戦略による臨床試験成績はほぼ類似している。米国のCCG-A 3891臨床試験の大量化学療法群のデータでは、3年無増悪生存割合は34±4%で、非大量化学療法群では22±4%である¹¹⁾。またドイツ及びスイスのNB97臨床試験の大量化学療法群のデータでは、3年無増悪生存割合は47% (95% CI 38-55)で、非大量化学療法群では31% (95% CI 23-39)である¹²⁾。一方、日本から報告される3年無増悪生存割合は大体30~50%の範囲にある¹³⁾。

神経芽腫を含め発症数の少ない稀少疾患である小児固形腫瘍はいずれも未だ治療法開発段階であり、常に整備された前方視的な多施設共同臨床研究に従い治療が行われることが望ましいと考えられる。小児固形腫瘍は症例数が少なく、診断が不確実になることも多いため中央病理診断の必要性がある。各施設での個々の経験に基づいた治療では症例数が少なすぎて確かなデータが得られず、しかもデータ管理が不十分となりやすい。治療成績の向上には多施設臨床研究が不可欠である。

進行神経芽腫の再発例では再発後の予後はさらに悪い。現在でも非常に難治であり、再発後の長期生存例は少ない。新規薬剤や新規治療戦略の開発が望まれている。

現在世界的に期待されている新規薬剤・治療法には Topotecan, Irinotecan, Fenretinide, 131I-

MIBG+ ASCT, Tandem Auto SCT, Allo SCT, Anti-GD2 monoclonal antibody 3F8+GM-CSF, Demethylating agent (Decitabine)などがあげられる¹⁾。

XI 治療終了後の長期的な問題点

治療終了後の長期的な問題点も最近クローズアップされるようになり、重大な課題として再認識されている。これらには副鼻腔炎、低身長、やせ、肥満、歯牙の崩出障害、甲状腺機能低下症、性腺機能障害、不妊症、毛髪、難聴、白内障、腎機能障害、心機能障害、呼吸器系の障害、学校に関連する問題、精神神経的問題、二次がんなどの種々の問題点がある¹⁾。

XII 結 語

本稿では、神経芽腫についての基礎的知識の概略と、進行神経芽腫に対する化学療法についての知見を紹介した。

文 献

- 1) 本稿全体を通じて次の文献を参考にした。
Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In Pizzo PA, Poplack DG, eds. Principle and Practice of Pediatric Oncology 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, pp933-970, 2006
- 2) Rothenberg AB, et al: Neuroblastoma remembering the three physicians who described it a century ago: James Homer Wright, William Pepper, and Robert Hutchinson. *Pediatr Radiol*, 39: 155-160, 2009
- 3) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会編集: 小児腫瘍組織カラーアトラス第2巻. 神経芽腫群腫瘍-国際分類INPCによる-第1版, 金原出版, 東京, pp3-33, 2004
- 4) 日本神経芽腫研究グループ運営委員会資料
- 5) 澤田淳, 他: 神経芽腫スクリーニング. 小児がんの臨床, 初版, 赤塚順一他編集, 医薬ジャーナル, 大阪, pp135-145, 2000
- 6) Volchenbom SL, et al: Progress in defining and treating high-risk neuroblastoma: lessons from the bench and bedside. *J Clin Oncol*, 27: 1003-1004, 2009

- 7) Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al: Revisions in the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. *J Clin Oncol*, 11 : 1466-1477, 1993
- 8) Cohn SL, et al: The international neuroblastoma risk group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J Clin Oncol*, 27 : 289-297, 2008
- 9) Monclair T, et al: The international neuroblastoma risk group (INRG) staging system: an INRG task force report. *J Clin Oncol*, 27 : 298-303, 2008
- 10) Castleberry RP. Neuroblastoma. *Eur J Cancer*, 33 : 1430-1437, 1997.
- 11) Matthay KK, et al: Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. *N Engl J Med*, 341 : 1165-1173, 1999
- 12) Berthold F, et al: Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: A randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 6 : 649-658, 2005
- 13) Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H, et al: Intensified chemotherapy increases the survival rate in patients with stage 4 neuroblastoma with *MYCN* amplification. *J Pediatr Hematol Oncol*; 24 : 613-621, 2002

Feasibility of tacrolimus, methotrexate, and prednisolone as a graft-versus-host disease prophylaxis in non-T-cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for children

Mochizuki K, Kikuta A, Ito M, Sano H, Akaihata M, Kobayashi S, Ohto H, Hosoya M. Feasibility of tacrolimus, methotrexate, and prednisolone as a graft-versus-host disease prophylaxis in non-T-cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for children. Clin Transplant 2010 DOI: 10.1111/j.1399-0012.2010.01352.x. © 2010 John Wiley & Sons A/S.

Abstract: In this study, we evaluated the feasibility of our graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxis with tacrolimus, methotrexate, and prednisolone in non-T-cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for children. Twenty-one consecutive patients including those with hematological malignancies (n = 11), solid tumors (n = 7), and non-malignancies (n = 3) were analyzed. Myeloablative and reduced intensity conditionings were carried out in 5 and 16 patients, respectively, and both of the regimens contained anti-human T-lymphocyte immunoglobulin. Twenty (95%) of the 21 patients achieved primary engraftment. Acute GVHD of grades II–IV and III–IV were observed in nine (47%) and one (5%) patient, respectively, all of which were controllable by steroids. Chronic GVHD was observed in eight (51%) of the 17 evaluable patients, and one of them developed steroid refractory chronic GVHD. Treatment-related mortality occurred in three patients (15%), as a result of acute pancreatitis, chronic GVHD, and EB virus associated lymphoproliferative disease. The median follow-up of the 13 survivors was 24 months, and the two-yr probability of overall survival was 68%. The Karnofsky performance scale score of the 13 survivors was 100%. These results indicated the feasibility of our GVHD prophylaxis in non-T-cell-depleted haploidentical HSCT for children.

Kazuhiro Mochizuki^a, Atsushi Kikuta^b, Masaki Ito^a, Hideki Sano^a, Mitsuko Akaihata^a, Shogo Kobayashi^a, Hitoshi Ohto^c and Mitsuaki Hosoya^a

^aDepartment of Pediatrics, Fukushima Medical University School of Medicine, ^bDivision of Pediatric Oncology, Fukushima Medical University Cancer Center and ^cDepartment of Blood Transfusion and Transplantation Immunology, Fukushima Medical University Hospital, Fukushima, Japan

Key words: children – graft-versus-host disease – haploidentical – non-T-cell-depleted – stem cell transplantation

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest in relation to this manuscript.

Corresponding author: Atsushi Kikuta, MD, PhD, Division of Pediatric Oncology, Fukushima Medical University Cancer Center, 1 Hikariga-oka, Fukushima City, Fukushima 960-1295, Japan. Tel.: +81 24 547 1295; fax: +81 24 548 6578; e-mail: akikuta@fmu.ac.jp

Accepted for publication 7 September 2010

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) has been successfully carried out to treat many malignant and non-malignant diseases. However, more than 50% of the patients requiring HSCT are unable to find a suitable adult stem cell donor in a timely fashion. On the other hand, haploidentical HSCT from family members provides an option for nearly all the patients lacking a compatible donor (1, 2). However, the usefulness of this approach is often limited by significant rates of graft-versus-host disease (GVHD), graft rejection,

and other complications. Lu et al. (3) reported a novel method of non-T-cell-depleted haploidentical HSCT in which anti-human T-lymphocyte immunoglobulin (ATG) was included in the conditioning regimen. They used cyclosporine A (CsA), methotrexate (MTX), and mycophenolate mofetil (MMF) as a GVHD prophylaxis and showed survival, relapse, treatment-related mortality (TRM), and GVHD outcomes comparable to those of transplantations from HLA-identical siblings. Recently, other groups have also reported

the usefulness of non-T-cell-depleted haploidentical HSCT, but an optimal regimen for GVHD prophylaxis has not yet been determined (2, 4, 5). Since 2003, we have been using tacrolimus, MTX, and prednisolone (PSL) as a GVHD prophylaxis in the ATG containing non-T-cell-depleted haploidentical HSCT. In this study, we evaluated the feasibility of our GVHD prophylaxis in the non-T-cell-depleted haploidentical HSCT for children.

Patients and methods

Patients

Twenty-one consecutive children who received non-T-cell-depleted HLA-haploidentical HSCT from a family donor between September 2004 and December 2009 at Fukushima Medical University Hospital were retrospectively analyzed (Table 1). Eleven patients had hematological malignancies, seven had solid tumors, and the remaining three patients had non-malignancies. In the patients with refractory disease, haploidentical family donors were chosen owing to the anticipation of stronger graft-versus-tumor effect. On the other hand, in the patients without refractory disease or non-malignancies, haploidentical HSCT was performed because there was no available HLA-identical-related or unrelated donor. Of the 11 patients with hematological malignancies, two were not in remission (Nos. 3 and 20), while all the patients with solid tumors were in primary refractory or relapsed phases. The institutional review board approved the protocol, and written informed consent was obtained from the patients or their guardians and family donors. Follow-up for all the patients was continued through August 2010.

Donor source, HLA disparity, and stem cell graft

Donors included fathers (9), mothers (9), and siblings (3). HLA-A, HLA-B, HLA-C, and HLA-DRB1 typing was performed by intermediate-resolution DNA typing (Genosearch HLA; MBL, Nagoya, Japan) (Table 1). HLA disparities in both graft-versus-host and host-versus-graft directions included two loci mismatches in one case, three loci mismatches in five cases, and four loci mismatches in the other 15 cases. None of the donors or recipients had anti-HLA antibodies against the mismatched antigens between each donor and recipient.

Eighteen patients received bone marrow as a stem cell source. Recently, the evidence regarding GVHD after haploidentical HSCT, which is mostly controllable by using ATG and intensive GVHD

prophylaxis, has led us to change the stem cell source from bone marrow to mobilized peripheral blood stem cells (Nos. 17, 20, and 21).

Conditioning regimen and GVHD prophylaxis

Myeloablative and reduced intensity conditioning (RIC) were carried out in 5 and 16 patients, respectively, and both of the regimens contained ATG (Table 1). The ATG product that we used before March 2009 was Zetbulin (Nihon Zouki, Tokyo, Japan) (total 10 mg/kg). It was then replaced by thymoglobulin (Genzyme Japan, Tokyo, Japan) because this has been covered by health insurance since April 2009 in Japan. The initial total dose of thymoglobulin was 10 mg/kg of recipient's body weight according to the manufacturer's instructions for HSCT conditioning. However, because of adverse events mainly because of viral infections, the total doses of thymoglobulin were gradually reduced to 2.5 mg/kg. In this study, there were four cases with primary graft failure of the first bone marrow transplantation or cord blood transplantation (CBT). They received haploidentical second (Nos. 11, 12, and 13) or third (No. 7) HSCT after very short-term conditioning with fludarabine and ATG. Three of them (Nos. 11, 12, and 13) received a myeloablative conditioning in their initial HSCT.

The GVHD prophylaxis was conducted with tacrolimus, short-term administration of MTX, and PSL. Tacrolimus was started on day -1, which was continuously administered intravenously. The concentration of tacrolimus in peripheral blood was adjusted between 10 and 15 ng/mL. Three or four wk after transplantation, the tacrolimus administration was changed to the oral route with the trough level targeted at 5–10 ng/mL. MTX (10 mg/m²) was administered intravenously on day +1, and then 7 mg/m² was administered on days +3 and +6 after transplantation. PSL was begun on day +0 with an initial dose of 1 mg/kg/d. When there was no sign of acute GVHD, from day +29, the PSL dose was tapered every week and was discontinued within two and six months after transplantation in the patients with malignant and non-malignant diseases, respectively.

Statistics

The severities of acute and chronic GVHD were diagnosed using standard criteria and the NIH criteria (6, 7). Transplantation-related toxicities were evaluated using the common terminology criteria for adverse events (CTCAE version 4.0; <http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/About.html>)

Table 1. Patient/donor characteristics, HLA disparity, stem cells and conditioning regimen

No	Age	Gender	Disease	Status	Donor	HLA disparity (A, B, C, DRB1)	Stem cell source and dose (per kg)	Conditioning regimen
1	2-3	M	CGD	With systemic infection	Mother	4/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^b (20 mg/kg)
2	5-9	M	Neuroblastoma	1 relapse	Sibling	4/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + TEPA (800 mg/m ²) + ATG ^b (20 mg/kg)
3	19-0	M	CML	Accelerated phase	Father	4/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + BU (8 mg/kg) + CY (50 mg/kg) + ATG ^b (20 mg/kg)
4	5-6	M	AML (M2)	2 CR	Mother	4/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^b (10 mg/kg)
5	10-5	M	Fanconi anemia	Post IST	Mother	4/8	BM	TLI (3) + Flu (180 mg/m ²) + CY (40 mg/kg) + ATG ^b (10 mg/kg)
6	4-9	M	Wilms tumor	Primary refractory	Father	4/8	BM	Flu (180 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + TEPA (400 mg/m ²) + ATG ^b (10 mg/kg)
7	6-3	M	ALL	2 CR, GF after uBMT and uCBT	Mother	4/8	BM	Flu (90 mg/m ²) + ATG ^b (15 mg/kg)
8	17-10	M	Rhabdomyosarcoma	1 relapse	Father	5/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^b (10 mg/kg)
9	9-5	M	ALL	2 CR	Mother	4/8	BM	TBI (12) + VP16 (60 mg/kg) + CY (120 mg/kg) + ATG ^b (10 mg/kg)
10	13-4	M	Neuroblastoma	Primary refractory	Sibling	4/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^b (10 mg/kg)
11	11-0	F	ALL	2 CR, GF after uCBT	Father	4/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^b (10 mg/kg)
12	3-1	F	EBV-PTCL	Chronic phase, GF after uCBT	Mother	4/8	BM	TBI (3) + Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^b (10 mg/kg)
13	14-4	M	AML (M0; FLT3-ITD)	1 CR, GF after uCBT	Father	4/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^b (10 mg/kg)
14	5-7	F	Neuroblastoma	1 relapse	Mother	4/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^b (10 mg/kg)
15	4-2	F	NK cell lymphoma	2 CR, post-uCBT	Mother	4/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^b (10 mg/kg)
16	10-0	F	Neuroblastoma	1 relapse	Father	5/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^c (10 mg/kg)
17	19-10	M	CGD	With systemic infection	Sibling	6/8	PBSC	TBI (3) + Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^c (5 mg/kg)
18	4-10	M	t-AML (M4)	1 CR	Father	4/8	BM	TBI (12) + VP16 (60 mg/kg) + CY (120 mg/kg) + ATG ^c (5 mg/kg)
19	18-10	F	Mesenchymal chondrosarcoma	1 relapse	Mother	5/8	BM	Flu (150 mg/m ²) + Mel (140 mg/m ²) + ATG ^c (2.5 mg/kg)
20	7-8	M	AML (M2)	1 relapse	Father	5/8	PBSC	TBI (12) + Ara-C (12 g/m ²) + CY (120 mg/kg) + G-CSF (5 µg/kg/d for 2 d) + ATG ^c (2.5 mg/kg)
21	10-11	F	ALL	2 CR	Father	4/8	PBSC	TBI (12) + VP16 (60 mg/kg) + CY (120 mg/kg) + ATG ^c (2.5 mg/kg)

^aCD34 positive cells. Age: year-months. CGD, chronic granulomatous disease; EBV-PTCL, EBV associated peripheral T cell lymphoma; CBT, cord blood transplantation; GF, graft failure; IST, immunosuppressive therapy; Flu, fludarabine; Mel, melphalan; TEPA, thio-TEPA; ATG, anti-human T-lymphocyte immunoglobulin; VP16, etoposide; M, male; F, female; u, unrelated.

^bZebrulin.

^cThymoglobulin.

Table 2. Engraftment, GVHD, complications and outcome

No	Engraftment (d)	Acute GVHD grade and stage (skin, liver, GI)	Chronic GVHD severity (organ: NIH score)	Other complications within 100 d	Follow up (months)	Outcome, KPS score of survivors
1	15 ^a	G0	NE	CMV reactivation	71	Alive without disease (re-CBT after secondary GF), 100%
2	19	G0	NE	Acute pancreatitis	1	Dead (acute pancreatitis)
3	Not achieved	NE	NE	NO	7	Dead (acute GVHD after re-CBT)
4	13	G0	Mild (skin: 1)	NO	54	Dead (BM relapse at day135, MOF after re-HSCT)
5	14	G0	Mild (mouth: 1)	RPLES, hemorrhagic cyctitis, CMV reactivation	57	Alive without disease, 100%
6	14	G0	NO	CMV reactivation, zoster	9	Dead (disease progression)
7	15	G2 (3, 1, 1)	Severe (PS: 3, skin: 3, mouth: 1, GI: 1, lungs: 2) ^b	Sepsis	48	Dead (chronic GVHD)
8	16	G2 (3, 0, 1)	NO	NO	9	Dead (disease progression)
9	16	G2 (3, 0, 0)	Severe (skin: 3, mouth: 1)	NO	41	Alive (BM relapse at day 472), 100%
10	16	G0	Moderate (mouth: 2, eyes: 2)	Zoster	29	Alive (disease progression), 100%
11	15	G2 (2, 0, 1)	Severe (skin: 3, mouth: 1, eyes: 1)	Zoster	29	Alive without relapse, 100%
12	20	G2 (3, 0, 0) ^c	Moderate (skin: 2, mouth: 1)	Abcess (neck), EBV reactivation, CMV reactivation	27	Alive without relapse, 100%
13	15	G0	NO	NO	24	Alive without relapse, 100%
14	16	G0	NO	NO	12	Dead (disease progression)
15	15	G0	NE	EBV-LPD	2	Dead (EBV-LPD)
16	15	G0	Moderate (mouth: 1, GI: 2)	NO	15	Alive without disease progression, 100%
17	15	G1 (2, 0, 0) ^c	NO	CMV reactivation	13	Alive without disease, 100%
18	14	G2 (3, 0, 1)	NO	Abcess (penis), CMV reactivation	12	Alive without relapse, 100%
19	12	G3 (3, 0, 4) ^d	NO	IPS, avascular necrosis of the femoral head	11	Alive without disease progression, 100%
20	15	G2 (3, 0, 1) ^d	NO	CMV reactivation	10	Alive without relapse, 100%
21	12	G2 (3, 0, 0) ^d	NO	NO	8	Alive without relapse, 100%

NE, not evaluated; NO, not observed; GI, gastrointestinal tract; PS, performance status; RPLES, reversible posterior leukoencephalopathy syndrome; LPD, lymphoproliferative disease; KPS, Karnofsky performance scale; CBT, cord blood transplantation; CMV, cytomegalovirus; MOF, multiple organ failure; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; GF, graft failure; GVHD, graft-versus-host disease; IPS, idiopathic pneumonia syndrome.

^aSecondary graft failure.

^bSteroid refractory.

^cLate onset acute GVHD.

^dRecurrence of acute GVHD.

presented by the National Cancer Institute. TRM was defined as death during continuous post-transplantation remission. The cumulative incidence of GVHD and provability of overall survival were estimated using the Kaplan–Meier method.

Results

Engraftment

Twenty (95%) of the 21 patients achieved primary engraftment with the median time of neutrophil recovery of 15 d (range: 12–20 d) (Table 2). Among them, one patient with chronic granulomatous disease (No. 1) experienced secondary graft failure, 73 d after haploidentical HSCT. The

platelet engraftment was evaluated in 20 patients who survived longer than 50 d, and 19 patients (95%) met the criteria of platelet recovery with the median time of 33 d (range: 22–45 d). Although there were three urgent cases (Nos. 7, 11, and 13) as the result of primary graft failure of CBT, all of them achieved engraftment after haploidentical re-HSCT. Moreover, all the patients who achieved engraftment established complete donor chimerism by day + 30 except one who experienced secondary graft failure.

GVHD

Acute GVHD was evaluated in 20 patients who achieved primary engraftment, and those of grades

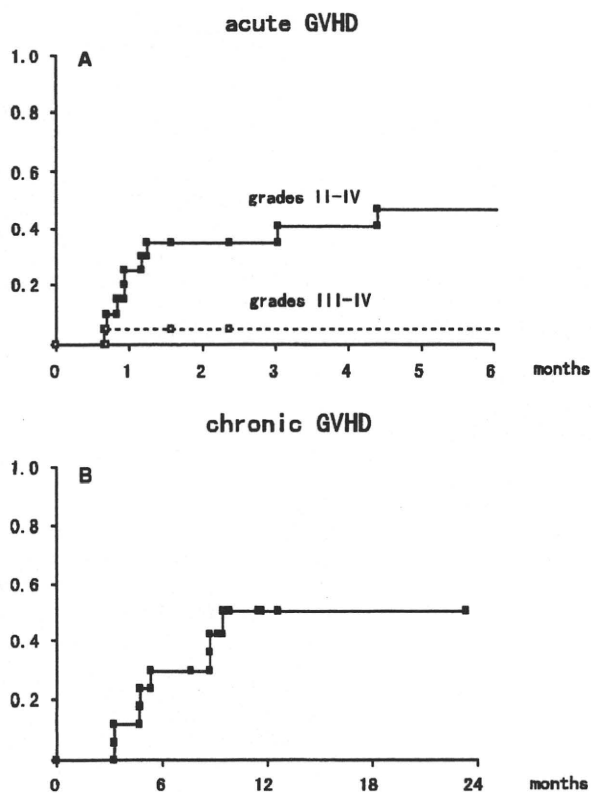


Fig. 1. (A) Cumulative incidence of acute graft-versus-host disease (GVHD) after ($n = 20$). Solid line indicates acute GVHD of grade II-IV, and dotted line indicates that of grade III-IV. (B) Cumulative incidence of chronic GVHD ($n = 17$). Eight of the 17 patients who survived longer than 100 d after non-T-cell-depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation developed chronic GVHD.

I, II, and III occurred in one, eight, and one patient, respectively (Fig. 1a, Table 2). No patient developed acute GVHD of grade IV in this study. Clinical manifestations included skin rash in nine (90%), severe diarrhea in six (60%), and hepatic dysfunction in one (10%), all of which responded to steroids: temporary augmentation of PSL (1–2 mg/kg/d) (Nos. 7, 9, 11, 12, 18, and 21), methyl PSL pulse therapies (Nos. 8, 19, and 20), or oral administration of beclomethasone dipropionate (Nos. 20 and 21).

Chronic GVHD was evaluated in 17 patients who achieved engraftment and survived longer than 100 d after transplantation, and it was observed in eight patients (51%) (Fig. 1b). One patient (No. 7) who received haploidentical HSCT as his third transplantation, developed steroid refractory chronic GVHD. The other patients' symptoms of chronic GVHD were mainly skin or mouth lesions, which were manageable with PSL and tacrolimus.

Complications

One patient (No. 5) developed reversible posterior leukoencephalopathy syndrome, and another patient (No. 19) developed idiopathic pneumonia syndrome, both of which recovered following conventional treatment (Table 2). The latter patient also developed avascular necrosis of the femoral head on both sides. Infectious complications including cytomegalovirus (CMV) antigenemia ($n = 7$), temporary elevation of EBV-DNA ($n = 1$), EBV-lymphoproliferative disease (EBV-LPD) ($n = 1$), zoster ($n = 3$), hemorrhagic cystitis because of BK virus ($n = 1$), and severe bacterial infections ($n = 3$) were observed within 100 d after transplantation. These infectious complications, except one case of EBV-LPD, were controllable by using conventional anti-microorganism therapies or decreasing immune suppression. Other grade III to IV toxicities observed within 100 d after transplantation were as follows: grade III oral mucositis in five patients, grade III hypertension in four patients, and grade IV hyperglycemia in another patient. TRM occurred in three patients (15%) as a result of acute pancreatitis (No. 2), chronic GVHD (No. 7), and EBV-LPD (No. 15).

Survival

The median follow-up of the 13 survivors was 24 months (range: 8–71 months). The two-yr probability of overall survival in this study was 68%. The quality of life of all 13 survivors was evaluated to be 100% according to the Karnofsky performance scale (KPS).

Discussion

Allogeneic HSCT is the only curative approach for a number of patients with malignant or non-malignant diseases. In this study, we showed the feasibility of our GVHD prophylaxis in non-T-cell-depleted haploidentical HSCT for children. Concerning engraftment after haploidentical HSCT, an allograft needs to traverse HLA-mismatched barriers. According to other clinical studies, high engraftment rates (96–100%) were reported in non-T-cell-depleted haploidentical HSCT (3–5, 8). In this study of pediatric patients, 95% of the recipients achieved primary engraftment, which was comparable to previous reports. Moreover, 11 of the 13 patients who received RIC at the initial HSCT achieved long-term engraftment. In particular, high engraftment rate can be expected for patients who had received several courses of

chemotherapies prior to the haploidentical RIC-HSCT.

One of the major problems associated with the non-T-cell-depleted haploidentical HSCT is severe GVHD. According to Liu et al. (9), in their series of haploidentical HSCT without *in vitro* T-cell depletion, by using ATG (10 mg/kg) (Thymoglobulin; Genzyme, Cambridge, MA, USA) in the conditioning regimen and CsA + MTX + MMF as the GVHD prophylaxis, the cumulative incidences of acute GVHD of grades II–IV, III–IV, and that of chronic GVHD were 57.2%, 13.8%, and 52.7%, respectively. In this study, nearly half of the patients developed acute GVHD of grade II or III, but no patient developed that of grade IV, and all the symptoms of acute GVHD were controllable by steroids. On the other hand, TRM associated with chronic GVHD occurred in one case, while most of the other patient's symptoms of chronic GVHD were manageable with PSL or tacrolimus. Therefore, we believe that our GVHD prophylaxis, which includes tacrolimus, MTX, and PSL, suppresses the incidence of severe acute and chronic GVHD within an acceptable range after ATG containing non-T-cell-depleted haploidentical HSCT.

The probability of infectious complications after non-T-cell-depleted haploidentical HSCT was considered to be high because intensive immune suppressive regimens for GVHD prophylaxis are usually adopted. In this study, the incidence of viral infections, especially CMV reactivation, was higher than that in HSCT from HLA-identical donors. However, most of these complications were manageable by conventional anti-viral treatment or decreasing immune suppression. The high incidence of viral infections after haploidentical HSCT might be owing to the administration of ATG in the conditioning regimen; and therefore, an optimal dose of ATG needs to be determined carefully.

The reported incidence of TRM after HSCT from matched related, matched unrelated, or cord blood were about 20–30% (10–12). In this study, TRM occurred in three patients (15%), which were thought to be within an acceptable range because more than one-third of the patients had complications prior to HSCT. Moreover, the KPS scores of the survivors were all 100%, and most of them have obtained an excellent prognosis. The results described here indicate the feasibility of our

GVHD prophylaxis with tacrolimus, MTX, and PSL in non-T-cell-depleted haploidentical HSCT for children. Further clinical studies are warranted to determine the effectiveness of this approach.

References

1. KOH LP, RIZZIERI DA, CHAO NJ. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant using mismatched/haploidentical donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007; 13: 1249.
2. YOSHIHARA T, OKADA K, KOBAYASHI M et al. Outcome of non-T-cell-depleted HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation from family donors in children and adolescents. *Int J Hematol* 2007; 85: 246.
3. LU DP, DONG L, WU T et al. Conditioning including antithymocyte globulin followed by unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation can achieve comparable outcome with HLA-identical sibling transplantation. *Blood* 2006; 107: 3065.
4. OGAWA H, IKEGAME K, YOSHIHARA S et al. Unmanipulated HLA 2-3 antigen-mismatched (haploidentical) stem cell transplantation using nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 1073.
5. OGAWA H, IKEGAME K, KAIDA K et al. Unmanipulated HLA 2-3 antigen-mismatched (haploidentical) bone marrow transplantation using only pharmacological GVHD prophylaxis. *Exp Hematol* 2008; 36: 1.
6. PRZEPIORKA D, WEISDORF D, MARTIN P et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 825.
7. FILIPOVICH AH, WEISDORF D, PAVLETIC S et al. National Institutions of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: 945.
8. HUNG XJ, LIU DH, LIU KY et al. Treatment of acute leukemia with unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15: 257.
9. LIU D, HUANG X, LIU K et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation without *in vitro* T cell depletion for treatment of hematological malignancies in children. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008; 14: 469.
10. THOMSON BG, ROBERTSON KA, GOWAN D et al. Analysis of engraftment, graft versus host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 2000; 96: 2703.
11. YAKOUB-AGHA I, MESNIL F, KUENTZ M et al. Allogeneic marrow stem-cell transplantation from human leukocyte antigen-identical siblings versus human leukocyte antigen-allelic-matched unrelated donors (10/10) in patients with standard-risk hematologic malignancy: a prospective study from French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapy. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5695.
12. KURTZBERG J, PRASAD VK, CARTER SL et al. Results of Cord Blood Transplantation Study (COBLT): clinical outcomes of unrelated donor cord blood transplantation in pediatric patients with hematologic malignancies. *Blood* 2008; 112: 4318.