

表 3 骨障害症例

1	4 歳	39 歳	縦隔神経芽種	左胸部 (40)	側彎 (高度)	2 年	自家骨移植
2	2 歳	37 歳	縦隔神経芽種	右肺尖部 (30)	胸郭変形 (軽度)	3 年	経過観察
3	1 歳	35 歳	後腹膜血管肉腫	左腹部 (60)	側彎 (高度)	11 カ月	経過観察
4	1 歳	32 歳	縦隔神経芽種	左上胸部 (25)	側彎 (軽度)	3 年	経過観察
5	5 歳	38 歳	Wilms 腫瘍	左腹部 (35)	側彎 (軽度)	3 年	経過観察
6	6 カ月	26 歳	腋窩悪性ラブラド イド腫瘍	右肩部 (60) 左肩部 (30) 頸部 (30)	右上腕短縮 (高度)	7 カ月	装具装着 リハビリ
7	3 歳	27 歳	縦隔神経芽種	右胸部 (30)	側彎 (軽度)	3 年	経過観察

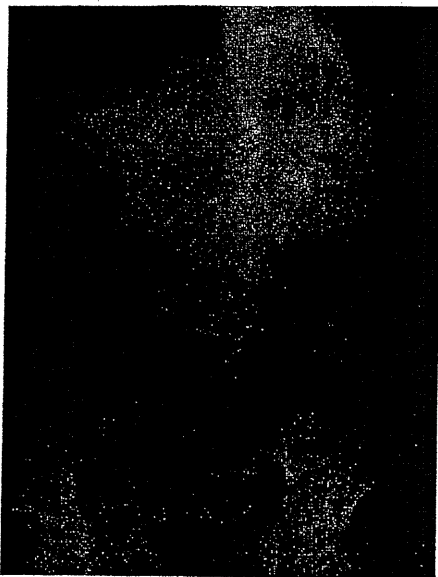


図 1 骨障害症例 (症例 1 治療開始 10 年後)

が 3 例、腎障害が 5 例、二次がんが 2 例、聴力障害を 2 例に認めており、このうち、局所治療 (外科手術と放射線療法) に起因する治療関連障害は、骨傷害、性腺・生殖器障害、腎障害、二次がんである。以下、治療関連障害別に詳細を述べる。

## II. 骨障害 (表 3)

椎体のそばに発生した腫瘍に対しての放射線照射が原因となる側彎が生じた症例が 6 例存在した。腫瘍の発生部位の特異性から神経芽腫群腫瘍が 4 例と過半数である。症例 1 は、1974 (昭和 49) 年の症例であるが、後縦隔のダンベル型の神経芽腫に対して椎弓切除とトータル 40 Gy の放射線

照射が試行されており、術後 2 年で側彎が顕著となり、整形外科にて治療後 6 年の 1980 (昭和 55) 年に左腸骨骨片を椎体に移植する手術が試行されている。図 1 は、治療 10 年後の左腸骨骨片移植後の状況であるが、高度の側彎が残っている。また、症例 6 は、腋窩原発の腫瘍に対する放射線照射に起因する上腕短縮症例である。障害発生時期に関しては、治療開始から 7 カ月から 3 年で発生している。現在は、化学療法の進歩からダンベル型の神経芽腫に関して椎弓切除と放射線照射を併用することは、ほとんどの症例において避けられると考えられる。

## III. 性腺、生殖器障害 (表 4)

症例 1 は、30 年前の症例であるが、腔原発の卵黄嚢癌に対して膣子宮全摘出が施行され、無月経、妊娠不能となった症例であり、症例 2, 3 は卵巣に対する 20 Gy 以上の放射線照射による卵巣機能低下の症例である。いずれの症例においても、現在では、効果的な全身化学療法を中心とした治療が施行され、このような治療関連障害は生じるような拡大外科手術や放射線照射を回避可能である<sup>3)</sup>。

## IV. 腎障害 (表 5)

腎障害をきたしたのは 5 例全例が神経芽腫であり、手術に起因する腎機能不全である。当科は、以前から放射線照射は、術中照射ではなく、術後体外照射であり、放射線照射に起因すると思われる腎機能障害は経験していない。障害発症までの

表 4 性腺 生殖器障害症例

症例	年齢	手術年齢	病変	手術	年齢	経過	予後
1	2歳	32歳	腔卵黄嚢癌	腔子宮全摘 両側卵巢温存	24	無月経 妊娠不能	将来 腔形成
2	9歳	32歳	左卵巢 未分化胚腫	左卵巢摘出	20	無月経	ホルモン 療法(改善)
3	1歳	32歳	後腹膜 神経芽腫	腫瘍切除	22	無月経	ホルモン 療法

表 5 腎障害症例

症例	年齢	手術年齢	病変	手術	経過	経過	経過
1	3歳	39歳	右後腹膜 神経節芽腫	腫瘍全摘 リンパ節生検	腎血管性 高血圧	9年	右腎摘出
2	8ヵ月	20歳	左副腎 神経芽腫	腫瘍切除 リンパ節郭清	左腎消失	8ヵ月	経過観察 (症状なし)
3	7ヵ月	19歳	右後腹膜 神経芽腫	腫瘍全摘 リンパ節郭清	急性腎不全 右腎萎縮	1日 3週	腹膜透析 →経過観察
4	8ヵ月	10歳	右後腹膜 神経芽腫	腫瘍全摘術	右腎萎縮	1ヵ月	経過観察 (症状なし)
5	7ヵ月	6歳	右副腎 神経芽腫	腫瘍全摘術	右腎萎縮	1ヵ月	経過観察 (症状なし)

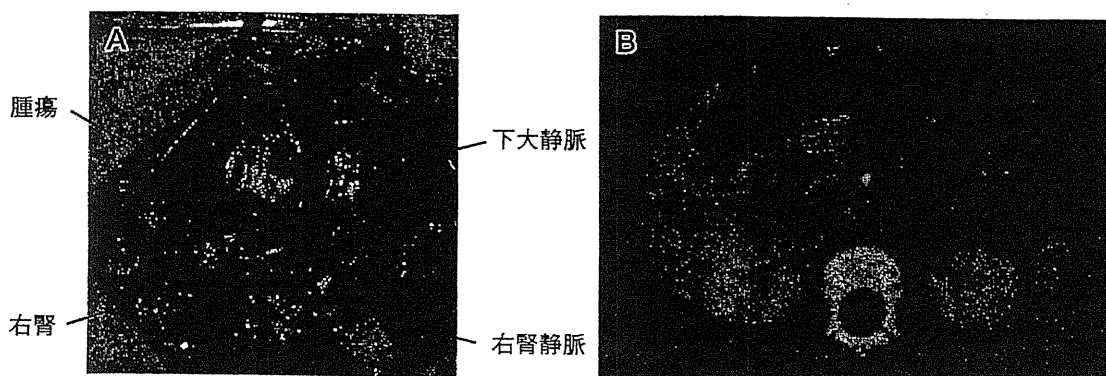


図 2 腎障害症例 (症例 5)  
 マスクリーニング陽性 (7ヵ月女児) 右副腎原発神経芽腫 4×3.5 cm  
 A. Stage 2A, 腫瘍全摘術。 B. IDRF (+) (Invading one renal pedicle)

時間は、急性期の術後1日から、晩期の術後9年に及んでいる。症例5は、比較的最近の症例であり、マスクリーニング陽性の7ヵ月女児の右副腎神経芽腫であり、全摘出可能と判断し、手術を試みたが、腫瘍が右腎門部で右腎動静脈を圧迫しており、結果的に全摘出となり、術後1ヵ月のCTで右腎萎縮を認めた。局所神経芽腫に関して

は、現在、国際的に手術による合併症を軽減することを目的とした術前画像診断による腫瘍による周囲の血管の圧迫や巻き込み、および臓器への浸潤などに基づいた Image Defined Risk Factors (IDRF) という概念が提唱されてきている<sup>4)</sup>。IDRFが陽性の症例は陰性の症例に比較して腫瘍摘出を試みた場合、合併症が生じる頻度が高いこ

表 6 二次がん発生症例

1	1 歳	28 歳	右頸部神経芽腫	頸部 (16)	甲状腺乳頭癌	照射野内	9 年
2	6 カ月	26 歳	右腋窩悪性ラブドイド腫瘍	右肩部 (60) 左肩部 (30) 頸部 (30)	甲状腺乳頭癌	照射野内	10 年

表 7 治療関連障害の発生時期および予防と対策

骨障害	7 カ月～3 年	照射以外の治療, 照射量の考慮 早期の手術または装具による矯正
性腺 生殖器障害	思春期以降に問題	生殖器温存手術, 照射以外の治療 ホルモン療法
腎障害	術後 1 日～9 年	術前画像評価, 術中の腎血管への注意 腎機能に対する対症療法
二次がん	9 年～10 年	頸部の照射の回避, 薬剤の考慮 二次がんの治療

とが後方視的研究から報告されている<sup>5)</sup>。症例 5 においても後方視的に術前の CT を見直した場合, 右腎動静脈は intact とはいえず, IDRF の概念からすると IDRF 陽性であった症例と思われる (図 2)。現在, 日本神経芽腫研究グループ (JNBSG) において登録が開始された低中間リスク群の臨床研究では, 低中間リスク群の神経芽腫は, 腫瘍のバイオロジーの悪性度が低く, 治療による副作用をできるだけ軽減すべきであるというコンセプトから, 局所神経芽腫に対して診断時術前画像診断により IDRF の判定を行い, 手術は陽性であれば生検のみにとどめ, 陰性であれば摘出を試みるというプロトコルが提示されている<sup>6)</sup>。

### V. 二次がん (表 6)

治療による二次がん発生症例の 2 例を示す。いずれも頸部放射線照射に起因する甲状腺乳頭癌であった。二次がん発生までの期間は 9 年と 10 年であり, 甲状腺がんに対して症例 1 は, 甲状腺両葉全摘出, 症例 2 は, 甲状腺左葉全摘出, 右葉腫瘍核出術を施行し, 両症例とも術後化学療法施行せず, 現在, 完治している。また, 死亡症例であり, 表 6 には加えてないが, 化学療法による二次がん症例として, 生後 3 カ月時に肝芽腫 (PRE-

TEXT II) が発生し, 肝外側区域切除と投与総量 CDDP 294 mg/m<sup>2</sup>, THP-ADR 245 mg/m<sup>2</sup>, CBDCA 150 mg/m<sup>2</sup>の化学治療施行後に, 1 歳 5 カ月で急性骨髄性白血病 (M4) を発症し, 寛解導入療法と allo-PBSCT を行ったが, 2 歳 3 カ月で急性骨髄性白血病が再発し, 2 歳 8 カ月で腫瘍死した症例が存在した<sup>7)</sup>。

### VI. 治療関連障害の発生時期および予防と対策

局所治療に起因した治療関連障害の発生時期と予防と対策を表 7 にまとめた。小児固形悪性腫瘍疾患における局所療法の概念としては, 腫瘍の生物学的特性の十分な理解と全身化学療法の奏効を考慮して, それぞれの症例において, 生命を救うのに積極的に拡大的外科手術や放射線照射が必要であるのか, あるいは, 拡大的外科手術や大量局所照射を避けて長期の QOL を考えて臓器温存に努めるべきかを的確に判断して手術に望むべきと考える<sup>8)</sup>。

### おわりに

現在, 外科手術, および放射線療法による治療関連障害は, 以前より少なくなっている。それは, 小児固形悪性腫瘍においても, 外科手術,

および放射線療法で完治することは少なく、むしろ、治療の主体が化学療法であることがこの20年間で広く認識されてきたことによると考えられる。ところが、大量化学療法を中心とした現在の強力な化学療法による晩期障害の発生率は50%前後と高く、内分泌障害（とくに低身長などの成長発達障害、および、性腺機能障害）、心毒性、神経障害、二次がん、肝機能障害など、さらに多くの問題点がクローズアップされてきている<sup>9)</sup>。小児固形悪性腫瘍長期生存患者の今後の課題としては、腫瘍別、治療別の小児科、小児外科以外に一般外科、内科、産婦人科、整形外科、泌尿器科などの成人科との共同のフォローアップシステムおよび、フォローアップマニュアル構築が急務が、まずあげられる。また、晩期障害を避けるような新たな化学療法や免疫療法などの必要性も考慮すべきであろう。

## 文 献

- 1) 渡辺輝浩：小児がんの治ったその後に必要なこと。新潟がんセンター病看研 48：51-60, 2009
- 2) 菱木知郎, 齊藤 武, 照井慶太, 他：小児がん経験者の長期フォローアップ。小児外科 39：1241-1245, 2007
- 3) 高橋由紀子, 木下義晶, 田尻達郎, 他：難治性小児悪性胚細胞腫瘍に対する治療法の検討。小児がん 42：852-856, 2005
- 4) Cecchetto G, Mosseri V, De Bernardi B, et al：Surgical risk factors in primary surgery for localized neuroblastoma：the LNESG1 study of the European International Society of Pediatric Oncology Neuroblastoma Group. J Clin Oncol 23：8483-8489, 2005
- 5) Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, et al：The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system：an INRG Task Force report. J Clin Oncol 27：298-303, 2009
- 6) 米田光宏, 西川正則, 上原秀一郎, 他：神経芽腫におけるIDRFの概念。小児外科 42：627-632, 2010
- 7) Koga Y, Matsuzaki A, Suminoe A, et al：Treatment-related acute myelomonocytic leukemia with t(11;19) in a child following chemotherapy for hepatoblastoma. Pediatr Blood Cancer 50：943-944, 2007
- 8) 田尻達郎, 宗崎良太, 木下義晶, 他：進行神経芽腫治療に対する臓器温存手術と術後体外照射の意義。小児外科 40：624-628, 2008
- 9) 前田美穂：小児悪性腫瘍の晩期障害。医事新報 4205：61-68, 2004

\* \* \*

# センダイウイルスベクター 導入樹状細胞を用いた 神経芽腫の免疫治療

## KEY WORDS

- 免疫療法
- 神経芽細胞腫
- 樹状細胞
- センダイウイルス

Dendritic cell-based  
immunotherapy using Sendai  
virus vector for neuroblastoma

Tatsuro Tajiri(准教授)  
Yoshikazu Yonemitsu(教授)  
Kyojuku Tatsuta  
Sakura Tanaka  
Ryota Yosue  
Ryota Souzaki(助教)  
Yoshiaki Kinoshita(准教授)  
Tomoaki Taguchi(教授)

九州大学大学院医学研究院小児外科\*,  
九州大学大学院薬学研究院バイオ医薬創成学\*\*

田尻 達郎\*, 米満 吉和\*\*, 竜田 恭介\*  
田中 桜\*, 代居 良太\*, 宗崎 良太\*  
木下 義晶\*, 田口 智章\*

## はじめに

最近の集学的治療の進歩より、神経芽腫の治療成績は向上してきたが、年長児のstage 4症例やMYCN増幅症例のような高リスク群の治療成績は満足できるものではなく<sup>1)2)</sup>、難治性進行神経芽腫に対する新規治療法の開発は現在、神経芽腫の研究分野のなかで最重要課題の1つである。このような難治性神経芽腫症例への新しい治療の試みとして、数年前から樹状細胞を用いた免疫治療の臨床試験が開始されている。最初の報告では、神経芽細胞腫3人を含む15人の固形悪性腫瘍に罹患した小児に対して樹状細胞療法が施行され<sup>3)</sup>、引き続き他のグループがstage 4神経芽細胞腫患者11人に、腫瘍のRNAを

曝露した樹状細胞を投与した報告を行っている<sup>4)</sup>。しかし、これらの臨床試験は、腫瘍特異的な免疫反応は認められたものの、臨床的効果は標準的な治療レベルには至っていない。

最近われわれは、組み換えセンダイウイルスベクター(rSeV)によって活性化させた樹状細胞を用いた治療を、B16F10メラノーマ<sup>5)</sup>、MH134肝細胞癌<sup>5)</sup>、SCC VII扁平上皮癌<sup>6)</sup>など、高悪性度腫瘍のマウスモデルに対して行い、抗腫瘍効果の顕著な改善を認め、これをImmunostimulatory virotherapyとして提唱している。

rSeVは細胞質にてRNAゲノムを鋳型として遺伝子を発現する点において、既存ベクターと比較して安全と考えられ、また強力な遺伝子導入・発現を可

能にする方法である<sup>7-9)</sup>。さらに、rSeVによる樹状細胞の活性化は、宿主細胞におけるRNAセンサーであるRIG-Iに依存性であり<sup>10)</sup>、一方で肺転移抑制効果はRIG-I非依存性(例：NKp46などのヘマグルチニン認識シグナル)であることも明らかになりつつある<sup>11)</sup>。

以上の背景のもとに、rSeV導入樹状細胞を用いた神経芽腫に対する免疫治療の開発を目的に前臨床試験として、マウス神経芽腫細胞株1300を皮下接種したマウス担癌モデルを用いて、従来のものより細胞変性効果の少ない温度感受性変異導入型非伝播性組み換え型センダイウイルス(ts-rSeV/dF)<sup>9)12)13)</sup>によって活性化させた樹状細胞による免疫治療を行い、その抗腫瘍効果について検討した<sup>14)</sup>。

## I. 実験方法

### 1. 樹状細胞の産生調整とrSeVによる遺伝子導入

マウス骨髄由来の樹状細胞(mBM-DCs)は以前報告した方法に従って調整し<sup>5)6)</sup>、エンドトキシンフリーの環境下で培養した。簡潔に述べると、A/Jマウスの骨髄を集めて、これをナイロンメッシュにて濾過し、SpinSep mouse hematopoietic progenitor enrichment kit (Stem cell Technologies Vancouver, BC, Canada)を用いて赤血球、系列陽性細胞(B220, CD5, CD11b, Gr-1, TER119.7/4)を除去した。残る系列陰性の細胞( $5-10 \times 10^4/5$  mL/well)を50ng/mLのGM-CSF (PeproTech, London, UK)と、25ng/mLのIL-4 (PeproTech)のエンドトキシンフリーの培養液で6皿プレートを用い

て培養した。培養4日目に同濃度のGM-CSFとIL-4を添加した新たな培養液に交換した。培養7日目に樹状細胞を回収して、その後の実験に用いた。ts-rSeVを介した遺伝子導入は<sup>5)6)</sup>、樹状細胞( $1 \times 10^6$  cells/mL)とrSeVsをMOI 100で培養することのみで行った。この環境下での遺伝子導入率は95%以上で、安定的に遺伝子導入することを確認した。この実験では、以前報告した実験と同様に、樹状細胞は腫瘍抗原に曝露せず、直接腫瘍内に投与した<sup>6)</sup>。

### 2. マウス担癌(c1300)モデルに対する樹状細胞を用いた治療実験

#### 1) 早期治療レジメ

未熟樹状細胞をts-rSeV/dF-nullまたはts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ と一緒に以前述べたように8時間培養した<sup>5)6)</sup>。すべての樹状細胞に50mg/mLのポリミキシンB (Sigma-Aldrich)を加え、投与前に2回リン酸緩衝食塩水100 $\mu$ Lで溶解し丁寧に洗浄した。腫瘍内への樹状細胞の投与は、腹部皮下にc1300細胞を $1 \times 10^6$ 個投与したマウスに、 $1 \times 10^6$ の樹状細胞をday3, 10, 17の3回、腫瘍内に直接投与した。腫瘍サイズの測定はノギスを用いて週に3回行い、腫瘍体積は以下の計算式によって求めた。腫瘍体積=0.5236 $\times$ (長径) $\times$ (短径) $\times$ (高さ)<sup>5)6)</sup>。

#### 2) 後期治療レジメ

直径が7~9 mm<sup>5)6)</sup>、病理学的に血管新生を有意に認めている十分成長した腫瘍を用いて後期治療レジメを行った。 $\gamma$ 放射線による治療前照射(<sup>60</sup>Co source, 2 Gy/日 $\times$ 3日)を必要に応じて行った。樹状細胞は前述のように回収した。A/Jマウスの腹部または右大腿部(放射線治療による大腸炎など

を防止するため)の皮下に $5 \times 10^5$ のc1300細胞をday0に投与した。 $1 \times 10^6$ の樹状細胞をday10, 17, 24に腫瘍内に投与した。腫瘍サイズの測定は前述と同様に行った。

## II. マウス担癌モデルにおけるts-rSeV/dF-DCs療法の治療効果

### 1. 樹状細胞を用いた免疫治療に強い抵抗性を示すc1300

本研究の予備実験において、*ex vivo*における樹状細胞への抗原曝露は、ts-rSeV/dFにより活性化させた樹状細胞(ts-rSeV/dF-DCs)の腫瘍内直接投与による抗腫瘍効果を増強しないことがc1300においても明らかになってきたため、以下の実験では抗原パルスは一切実施していない。このことはわれわれが以前示したB16メラノーマ<sup>5)</sup>やSCC VII扁平上皮癌<sup>6)</sup>で示した結果と同様であった。

まずts-rSeV/dF-nullによって活性化された樹状細胞を用いた免疫治療における至適投与量を決定するため、われわれはまず雌性A/Jマウスの腹壁皮下c1300担癌モデルに対する最適な樹状細胞投与量について検討した。同時に、c1300に対する治療効果を、B16F10メラノーマに対する治療効果と比較した。

図1に示すごとく、 $10^6$ 個のts-rSeV/dF-DCsを週1回、3週間投与する早期治療レジメ<sup>5)</sup>においては、B16F10メラノーマモデルに対して50%の腫瘍消失を認め、最も効果的な投与量であった。対照的にc1300モデルにおいては、同量のts-rSeV/dF-DCsでは腫瘍を消失させることができず、わずかに腫瘍の発育を抑制しただけであった。この

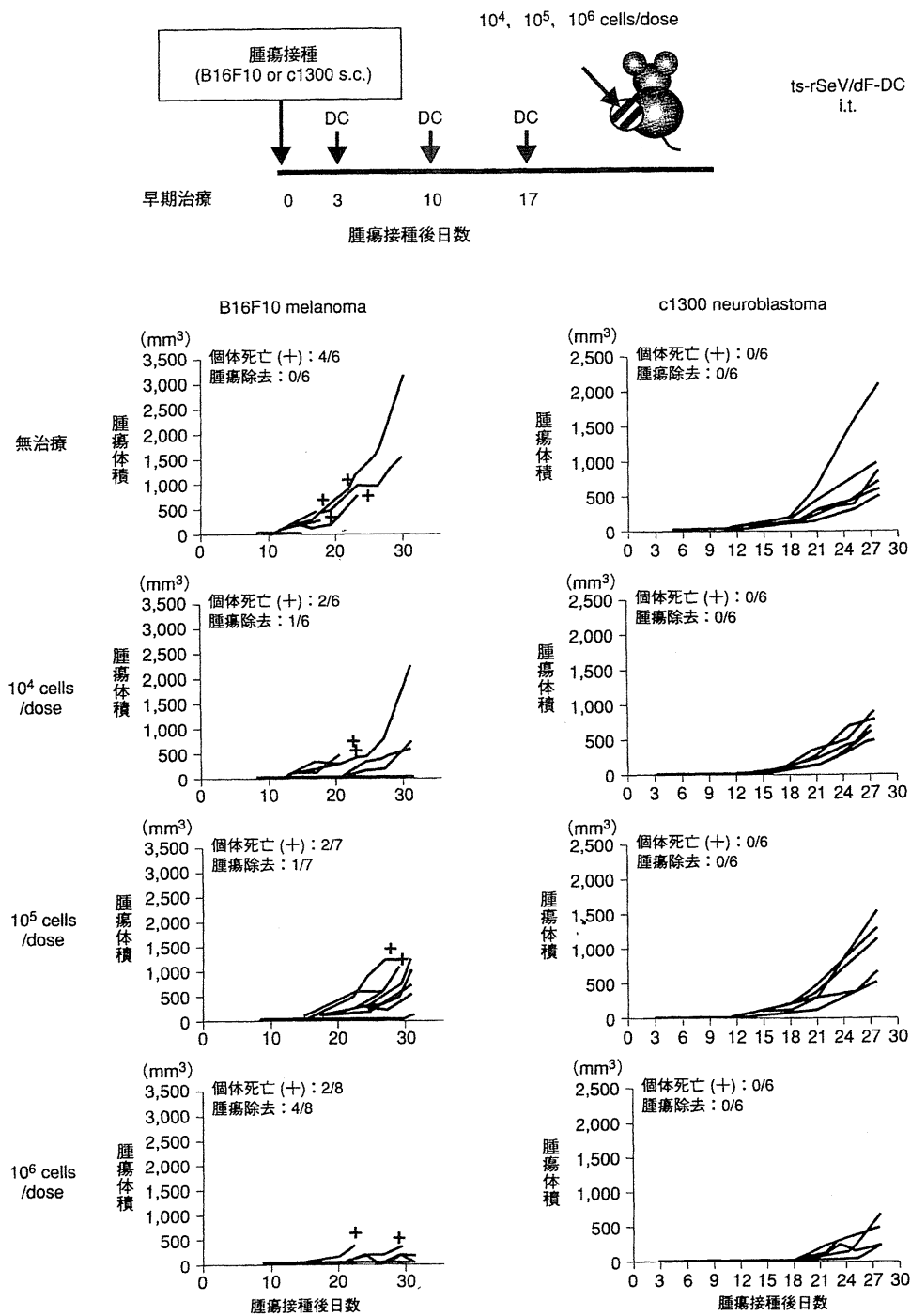


図1. 早期治療レジメにおけるts-rSeV/dF-DCs抗腫瘍効果

早期治療レジメとして、腫瘍接種3日後からさまざまな量の樹状細胞を直接腫瘍内に、毎週計3回投与し、腫瘍体積を計測した。右パネルがc1300、左パネルがB16F10である。パネルの線は、個体それぞれにおける腫瘍体積を経時的に示している。明らかな用量依存的な効果は、B16F10において認められ、 $10^6$ の樹状細胞を投与した際、8頭中4頭において完全な腫瘍の拒絶を認めた。反対にc1300においては、どの樹状細胞投与量においても、腫瘍拒絶も有意な腫瘍サイズの減少も認めなかった。パネル中の+は観察中に個体が死亡したことを示している。(文献<sup>14)</sup>より一部抜粋)

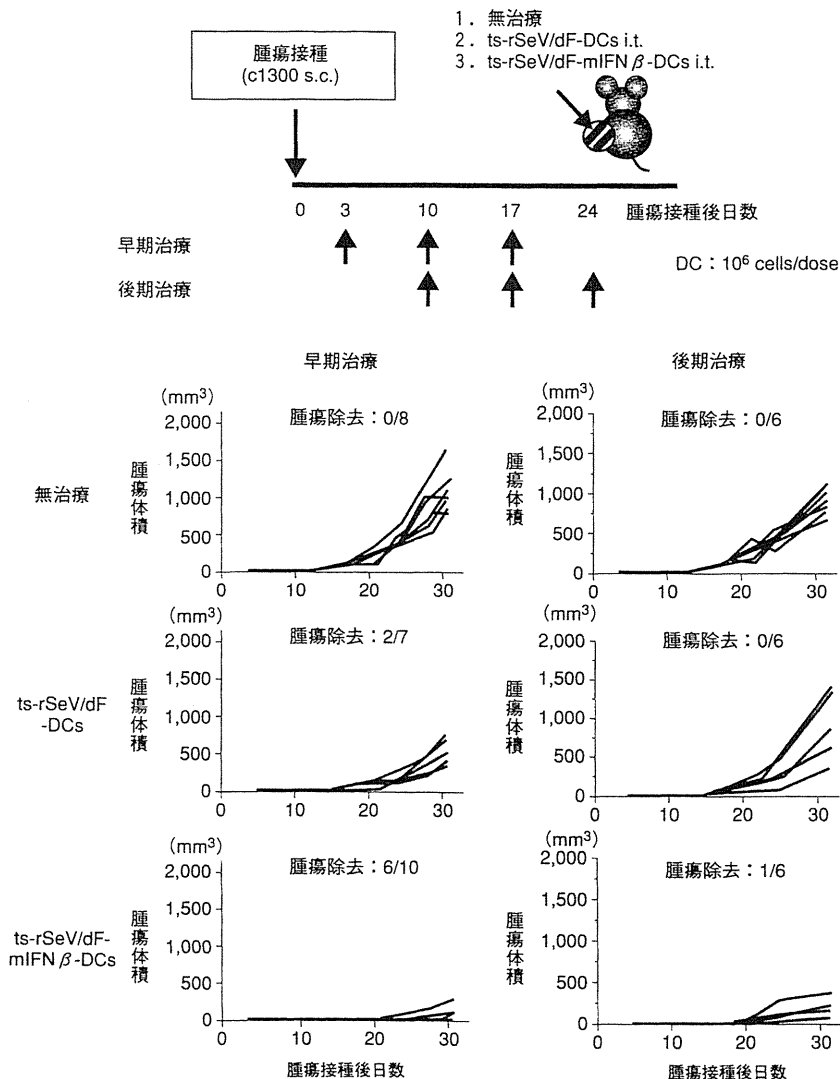


図2. ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsの抗腫瘍効果

c1300接種後3日目から治療を開始する早期治療レジメ、または10日目から治療を開始する後期治療レジメにおいて、mIFN $\beta$ を発現もしくは発現しない $10^6$ のts-rSeV/dF-DCsを毎週計3回腫瘍内に投与し、腫瘍体積を測定した。後期治療レジメにおける接種後10日目の腫瘍径はすべて7mmを超えていた。それぞれの個体における腫瘍体積の経時的変化を、早期治療レジメを左パネルに、後期治療レジメを右パネルに示した。ts-rSeV/dF-DCsを用いた場合は、どちらの治療レジメにおいてもC1300は治療抵抗性であった(中段の2つのパネル)。一方、IFN- $\beta$ を発現するts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsを用いた際には腫瘍排除と腫瘍の発育抑制において明らかな効果を認めた。

(文献<sup>14)</sup>より一部抜粋)

ことはB16F10メラノーマと比較して、c1300神経芽細胞腫はts-rSeV/dF-DCsを用いた免疫治療に抵抗性であることを示した。

## 2. ts-rSeV/dFを用いてIFN- $\beta$ 遺伝子を樹状細胞に導入することによるc1300に対する抗腫瘍効果の増強

このc1300に対するts-rSeV/dF-DCs

の低反応性を克服するため、われわれはB16メラノーマにおいて抗腫瘍効果を効率よく増強することのできたマウスIFN- $\beta$ 遺伝子を、ts-rSeV/dFを用いて樹状細胞へと導入した。ts-rSeV/



dF-nullの代わりにts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ を用いたところ、c1300に対する抗腫瘍効果は劇的に改善し、*in vivo*における早期治療レジメにおいては60%の腫瘍消失率を示した(図2左パネル)。

引き続き、腫瘍接種後10日目より治療する後期治療レジメを行うことによって、7~9mm大に確立されたc1300に対して、ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsが有効であるのか検討した。後期治療レジメにおいて、ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsは有意にc1300の発育を抑制したが、腫瘍の排除率は予想ほど高くなかった(6頭中、1頭の割合で腫瘍の完全な排除を認めた。図2右パネル)。この実験において、腫瘍を完全排除したマウスを除いては、120日以上の生存を認めなかった。

このことからts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsは腫瘍発育の抑制に対しては大きく関与しているが、担癌マウスの生存期間の延長に対する寄与は小さいと考えられた。

### 3. $\gamma$ 放射線前治療によるts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCs療法 のc1300に対する抗腫瘍効果の相乗的作用

以上のデータより、ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsを用いた免疫治療のみでは、抗原性の低いc1300に対しては、効果は不十分であると考えられた。そこで、樹状細胞を用いた免疫治療の効果増強法を検討した。最近の研究では、放射線治療によって、照射部位とは別の遠隔転移巣に対して遠達効果と呼ばれる腫瘍縮小効果を認めることが報告されている(アブスコパル効果)<sup>15)16)</sup>。これは局所への放射線照射によって患者の抗腫瘍免疫力が高まったためと想

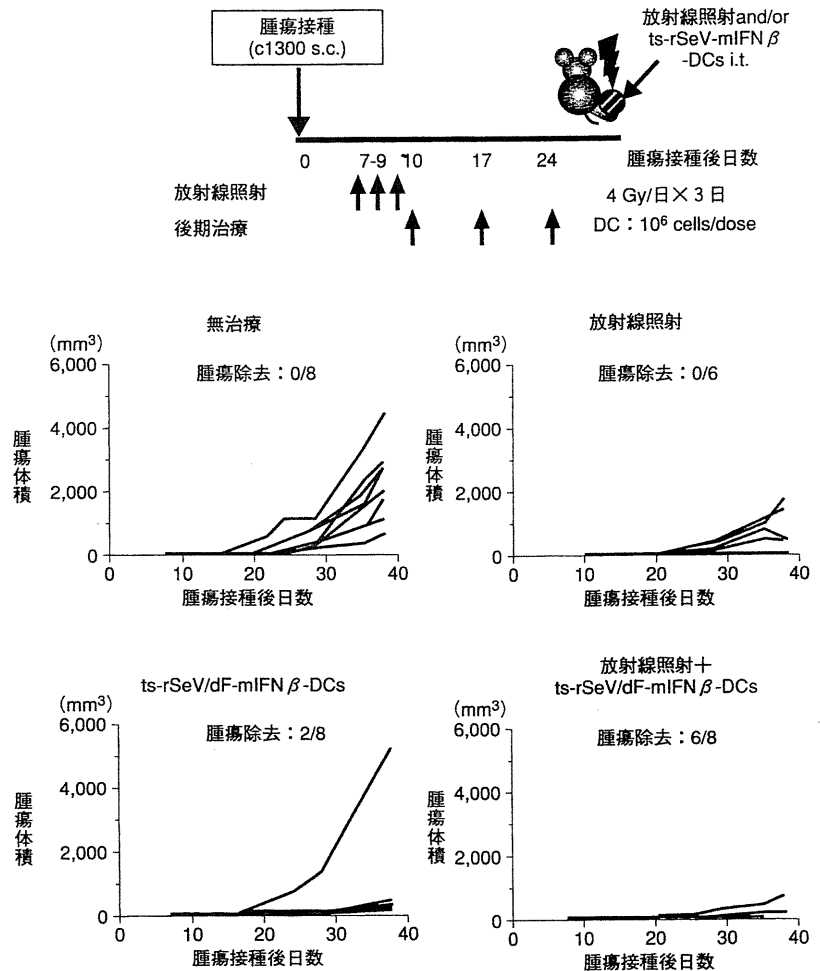


図3. 放射線前照射併用ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsの抗腫瘍効果

左大腿部の皮下に腫瘍を接種して7日目から、3日間連日4 Gyの放射線照射を行った。その後、後期治療レジメに準じて腫瘍接種後10日目から10<sup>6</sup>のts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsを腫瘍内に毎週投与し、腫瘍体積を計測した。腫瘍接種後10日目の腫瘍直径はすべての個体において7 mmを超えていた。放射線照射のみを行ったグループにおいては腫瘍の消失は認めなかったが、無治療群と比較して腫瘍抑制効果を認めた。対照的にts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsを用いたグループでは、強力な腫瘍抑制効果を認めたが、さらに放射線治療と組み合わせることにより抗腫瘍効果は劇的に増強され、その結果8頭中6頭(75%)で腫瘍の拒絶を認めた。

(文献<sup>14)</sup>より一部抜粋)

定されている<sup>17)</sup>。われわれはこれに注目し、後期治療レジメにおいて、臨床的用量である4 Gy $\times$ 3日の $\gamma$ 放射線照射を腫瘍接種後7~9日目に行い、その後にts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsの腫瘍内投与を週に1回、3週間連続して行った。この実験では、放射線によ

る重要臓器への影響をさけるため、右大腿部の皮下に腫瘍を接種した。

図3に示すごとく、 $\gamma$ 放射線単独治療、およびts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCs単独治療のみでも効果的に腫瘍体積を減少させることはできるものの、確立された腫瘍を完全排除することは困難

であった(腫瘍の完全排除は $\gamma$ 放射線単独治療では6頭中0頭, ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCs単独治療では8頭中2頭であった)。一方, この2つの治療を組み合わせた場合, 8頭中6頭において腫瘍接種後38日目には, 確立された腫瘍の完全排除が可能となった。結果としては,  $\gamma$ 放射線とts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsを組み合わせた治療においては8頭中5頭が無腫瘍状態で200日を超える生存を認めた。

#### 4. ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCs療法によるc1300に対する永続的な防御免疫の確立

次にc1300を完全に排除することが, 永続する防御免疫の獲得に貢献するかどうかについて調べた。

まず樹状細胞治療を行ったマウスの脾細胞を用いてCTL活性を測定した。その結果,  $\gamma$ 放射線前治療とts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsとの併用治療を行った個体においてのみ, c1300に特異的かつ強力なCTL活性を認めた。このようなCTL活性の上昇は, サードパーティーとして用いたA/Jマウスより発生した悪性線維性組織球腫(MuSS)<sup>18)</sup>に対しては認められなかった。

次に腫瘍接種後186日目に, c1300とMuSSを同時に接種する再接種実験を行った。この実験には, 34Gy $\times$ 3日の過剰放射線を照射し, 高いc1300の排除率を示したグループをコントロールとして追加した(われわれの予備試験において70%以上の腫瘍排除率を示した)。

図4に示すごとく, 無治療, または臨床的に適切な放射線照射のみをした個体においては腫瘍接種後120日以内に全例が死亡した。ts-rSeV/dF-mIFN

$\beta$ -DCsを用いた樹状細胞治療のみを行った個体4頭のうち, 1頭は120日以上, 無腫瘍状態で生存したが, この個体にはMuSSやc1300の再接種により, 双方の腫瘍が生着した。放射線を過剰照射した個体4頭のうち, 3頭は無腫瘍状態で120日以上生存したが, MuSS, c1300の再接種に対し, 双方とも生着した。このことは,  $\gamma$ 放射線照射のみでは腫瘍の拒絶はできるものの, 防御免疫の確立には不十分であることを示唆している。一方,  $\gamma$ 放射線照射と樹状細胞治療との併用治療を行った個体では, 4頭中3頭が無腫瘍状態で120日以上生存し, さらに3頭すべてにおいてc1300の再接種を特異的に拒絶した。

以上の結果から,  $\gamma$ 放射線照射とts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsの組み合わせによる相乗効果は腫瘍体積の減少のみではなく, 腫瘍に対する永続的な防御免疫の確立に大きく寄与していると考えられた。

### III. まとめ

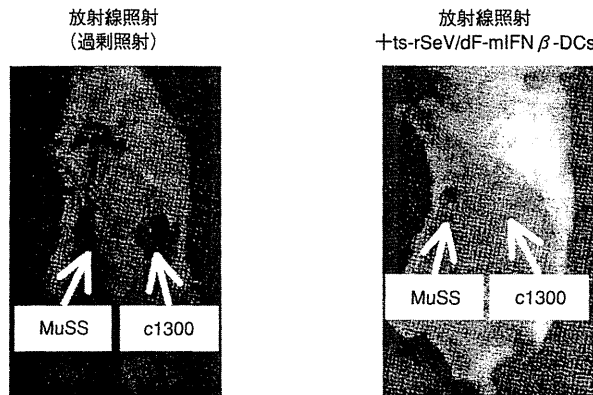
本研究において得られた所見は, 以下の通りに要約される。

- ①B16F10メラノーマにおいて有効であったts-rSeV/dF-DCを用いた早期治療レジメにおいて, c1300は抵抗性であった。このことはc1300がB16F10メラノーマに比べて抗原性が低いことを示唆している。
- ②IFN- $\beta$ 遺伝子を発現させることにより, 以前報告したメラノーマにおける結果と同様に, 早期治療レジメにおけるc1300への抗腫瘍効果は劇的に向上した<sup>5)</sup>。
- ③しかしながら, 十分に成長した腫瘍に対する治療である, 後期治療レジ

メにおいてはts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsの治療効果はなお不十分であった。

- ④臨床的に施行可能な $\gamma$ 放射線照射(4Gy $\times$ 3日)を前治療として行い, その後ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ を用いた樹状細胞治療を行うことにより, 劇的に抗腫瘍効果は改善し, 十分に成長したc1300に対して高率に腫瘍消失を得ることが可能であった。
- ⑤放射線治療とそれに続くts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ を用いた樹状細胞治療を行うことによって得られたc1300の排除は, 同時に永続する腫瘍特異的免疫をも誘導することができた。これは放射線を過剰に投与することによって得られる腫瘍消失効果においては認められなかった。

以前より悪性腫瘍に対する放射線治療は, 抗腫瘍免疫を賦活化させ, 転移巣への縮小効果(いわゆるアブスコパル効果)と呼ばれる効果を示すとされている<sup>15)16)</sup>。しかしながら, この機序に関与する分子細胞学的・免疫学的なメカニズムはほとんど解析されていない。加えて放射線治療と免疫治療との組み合わせは新しいコンセプトではなく, 抗腫瘍免疫における放射線治療の有用性はいくつかの論文で報告されている。放射線照射はアポトーシスやネクローシスを介して細胞死を誘導するし, その後アポトーシスやネクローシスに陥った細胞は樹状細胞に取り込まれ, 抗原暴露により抗腫瘍効果を誘導することが可能となることが想定されている<sup>19)21)</sup>。これらの死んだ種々の細胞は炎症性サイトカインを誘導するのみでなく<sup>22)</sup>, 腫瘍血管構造を刺激し接着分子の発現を亢進させることにより, 免疫細胞の腫瘍細胞への輸送を促進



腫瘍再接種の概要

	総数	再接種 (c1300, MuSS)			
		生存 (無腫瘍状態)	再接種 施行	拒絶 c1300	拒絶 MuSS
無治療	4	0	—	—	—
放射線照射 (4 Gy×3)	3	0	—	—	—
放射線照射 (過剰照射: 34Gy×3)	4	3	3	0	0
ts-rSeV/dF-mIFNβ-DCs	4	1	1	0	0
放射線照射 (4 Gy×3) +ts-rSeV/dF-mIFNβ-DCs	4	3	3	3	0

図4. 放射線前照射併用ts-rSeV/dF-mIFNβ-DCsによる永続的な腫瘍特異的防御免疫の誘導  
腫瘍接種後186日目に、c1300とMuSSを同時に接種する再接種実験を行った。無治療、または臨床的に適切な放射線照射のみをした個体においては腫瘍接種後120日以内に全例が死亡した。ts-rSeV/dF-mIFNβ-DCsを用いた樹状細胞治療のみを行った個体4頭のうち、1頭は120日以上、無腫瘍状態で生存したが、この個体にはMuSSやc1300の再接種により、双方の腫瘍が生着した。放射線を過剰照射した個体4頭のうち、3頭は無腫瘍状態で120日以上生存したが、MuSS、c1300の再接種に対し、双方とも生着した。一方、γ放射線照射と樹状細胞治療との併用治療を行った個体では、4頭中3頭が無腫瘍状態で120日以上生存し、さらに3頭すべてにおいてc1300の再接種を特異的に拒絶した。

(文献<sup>14)</sup>より一部抜粋)

していると考えられ、このようなメカニズムにより放射線照射によって生じる死細胞は、アブスコパル効果の要因を担っていると考えられる。

興味深いことに、ある種の腫瘍細胞に対するアブスコパル効果は動物実験レベルでは認められないのに、臨床レベルにおいては低頻度ではあるが認めることがある<sup>23)</sup>。実際に、本研究における放射線過剰照射した腫瘍排除モデルにおいては、c1300の再接種に対す

る防御免疫を認めることができなかったが、樹状細胞治療を追加することにより防御免疫を確立することができた。この結果は、T細胞を介したアブスコパル効果は腫瘍特異的であると報告した論文と合致するものであった<sup>17)</sup>。それゆえ、腫瘍細胞が放射線治療によって破壊された際、防御免疫を取得するためには樹状細胞を用いた免疫治療が有用であると考えられる。

ただ、疑問点として、なぜ、放射線

過剰照射モデルにおいて、c1300を排除できたにもかかわらず、防御免疫を獲得できなかったのかについては、現時点で明確なデータはない。このモデルにおいては、真皮の炎症と火傷が持続していたため、放射線の過剰照射により生じた、持続する真皮の炎症が抗腫瘍免疫の確立を阻害している可能性が考えられる。したがって、腫瘍細胞の崩壊および腫瘍ただ抗原の提示に適していると思われる、すなわち臨床的

本臨床研究の対象患者 (Eligibility Criteria)

発症時が1歳以上の進行神経芽腫 (stage 3かつMYCN増幅あり、あるいはstage 4)患者で、寛解導入療法後の状態において、外科的切除術を試みても完全寛解状況とならないと判断された例。あるいは、標準的治療後の再燃、再発症例

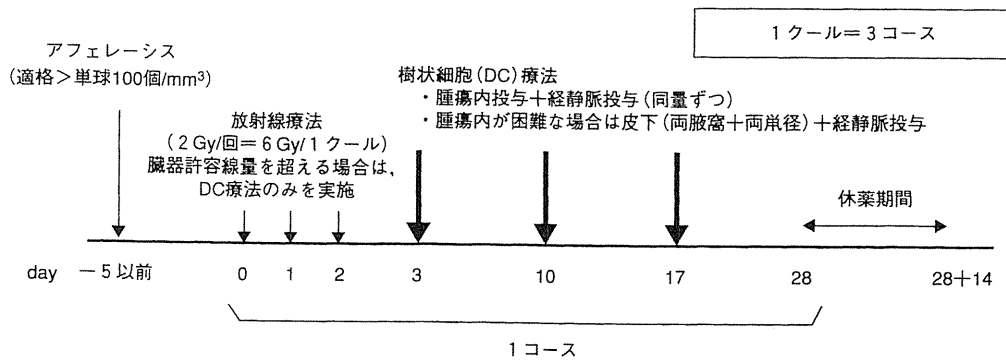


図5. 「センダイウイルスベクターによる活性化樹状細胞を用いた難治性進行神経芽腫に対する放射線併用免疫遺伝子治療臨床研究」の試験デザイン

に適切な放射線量を用いることが、引き続き行う樹状細胞療法における抗腫瘍免疫反応を誘導するために必要ではないか、と考えられる。

また、未発表データであるが、この系における細胞除去抗体によるエフェクター細胞の探索では、原発巣の縮小にはCD4陽性細胞が、再移植時にはCD8陽性細胞が重要であることが明らかになっている。

さらに、毒性に関する非臨床データとして独立法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにて霊長類を用いたts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ 感染樹状細胞 (ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCs) 移植の短期 (2ヵ月: 2個体) および長期 (15ヵ月: 1個体) の安全性試験を行った。その結果、カニクイザルに対して重篤な毒性を発現しなかったことから、ts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsの静脈内および皮下接種における毒性は低いものと判断された。

## おわりに

これらの結果より、放射線治療とts-rSeV/dF-mIFN $\beta$ -DCsを用いた免疫遺伝子治療との併用は、今後臨床において有望な治療となりえることが示唆された。この前臨床試験のデータをもとに、現在、九州大学病院において、図5に対象患者と試験デザイン案を示すような神経芽腫患者に対する臨床試験「センダイウイルスベクターによる活性化樹状細胞を用いた難治性進行神経芽腫に対する放射線併用免疫遺伝子治療臨床研究」を準備中である。本臨床試験は、遺伝子治療の範疇に含まれることから、今後、九州大学病院の臨床試験倫理審査委員会の承認後に厚生科学審議会への提出および承認を得て、早期の臨床試験開始を目指している。

## 文 献

- 1) Suita S, Tajiri T, Kaneko M, et al : Implications of MYCN amplification in patients with stage 4 neuroblastoma who undergo intensive chemotherapy. J Pediatr Surg 42 : 489-493, 2007
- 2) Suita S, Tajiri T, Sera Y, et al : Improved survival for patients with advanced neuroblastoma after high-dose combined chemotherapy based in part on N-myc amplification. J Pediatr Surg 35 : 1737-1741, 2000
- 3) Geiger JD, Hutchinson RJ, Hohenkirk LF, et al : Vaccination of pediatric solid tumor patients with tumor lysate-pulsed dendritic cells can expand specific T cells and mediate tumor regression. Cancer Res 61 : 8513-8519, 2001
- 4) Caruso DA, Orme LM, Amor GM, et al : Results of a Phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children with Stage 4 neuroblastoma. Cancer 103 : 1280-1291, 2005
- 5) Shibata S, Okano S, Yonemitsu Y, et al : Induction of efficient antitumor im-

- munity using dendritic cells activated by Sendai virus and its modulation of exogenous interferon- $\beta$  gene. *J Immunol* 177 : 3564–3576, 2006
- 6) Yoneyama Y, Ueda Y, Akutsu Y, et al : Development of immunostimulatory virotherapy using non-transmissible Sendai virus-activated dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 355 : 129–135, 2007
  - 7) Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S, et al : Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol* 18 : 970–973, 2000
  - 8) Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K, et al : Recombinant Sendai Virus-mediated gene transfer to vasculature : a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J* 15 : 1294–1296, 2001
  - 9) Tanaka S, Yonemitsu Y, Yoshida K, et al : Impact of deletion of envelope-related genes of recombinant Sendai viruses on immune responses following pulmonary gene transfer of neonatal mice. *Gene Ther* 14 : 1017–1028, 2007
  - 10) Okano S, Yonemitsu Y, Shirabe K, et al : Provision of continuous maturation signaling to dendritic cells by RIG-I-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus. *J Immunol* 186 : 1828–1839, 2011
  - 11) Kato T, Ueda Y, Kinoh H, et al : RIG-I helicase-independent pathway in sendai virus-activated dendritic cells is critical for preventing lung metastasis of AT6.3 prostate cancer. *Neoplasia* 12 : 906–914, 2010
  - 12) Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, et al : Nontransmissible virus-like particle formation by F-deficient Sendai virus is temperature sensitive and reduced by mutations in M and HN proteins. *J Virol* 77 : 3238–3246, 2003
  - 13) Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, et al : Further attenuation of gene(s)-deleted Sendai virus vectors : modification of transcription and replication caused weakened cytotoxicity. *Mol Ther* 7 (Suppl.) : S37, 2003
  - 14) Tatsuta K, Tanaka S, Tajiri T, et al : Complete elimination of established neuroblastoma by synergistic action of g-irradiation and DCs treated with rSeV expressing interferon- $\beta$  gene. *Gene Ther* 16 : 240–251, 2009
  - 15) Ohba K, Omagari K, Nakamura T, et al : Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis. *Gut* 43 : 575–577, 1998
  - 16) Nam SW, Han JY, Kim JI, et al : Spontaneous regression of a large hepatocellular carcinoma with skull metastasis. *J Gastroenterol Hepatol* 20 : 488–492, 2005
  - 17) Demaria S, Ng B, Devitt ML, et al : Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58 : 862–870, 2004
  - 18) Watanabe I, Kurosawa N, Nishihira T : Establishment and characterization of a murine cell-line derived from malignant fibrous histiocytoma of A/Jackson mouse. *Tohoku J Exp Med* 184 : 173–187, 1998
  - 19) Bhardwaj N : Processing and presentation of antigens by dendritic cells : implications for vaccines. *Trends Mol Med* 7 : 388–394, 2001
  - 20) Sauter B, Albert ML, Francisco L, et al : Consequences of cell death : exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191 : 423–434, 2000
  - 21) Hong JH, Chiang CS, Campbell IL, et al : Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 33 : 619–626, 1995
  - 22) Quarmby S, Kumar P, Kumar S : Radiation-induced normal tissue injury : role of adhesion molecules in leukocyte endothelial cell interactions. *Int J Cancer* 82 : 385–395, 1999
  - 23) Kaminski JM, Shinohara E, Summers JB, et al : The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev* 31 : 159–172, 2005

## 神経芽腫高リスク群に対する JNBSG 臨床試験

七野 浩之\*

### 1. 背景

#### 1. 多施設共同臨床試験の必要性

日本における神経芽腫の発症数は近年の調査では年間で 90~130 人と推測され、そのうち高リスク神経芽腫は 50~70 人である<sup>1~4)</sup>が、その生命予後は非常に不良であり、多くの人々の力を必要としている。高リスク神経芽腫に対する日米欧の臨床研究では、非常に強力な集学的治療を採用することが一般的である。すでに 30 年にわたりこの戦略による研究が継続されているが、現時点での 3 年無増悪生存割合は 30~40% 台の報告にとどまっている<sup>2)</sup>。さらに、強力な治療のため急性期や遠隔期（晩期）の合併症も質量ともに大きな問題となっている<sup>5)</sup>。全世界の神経芽腫患者・家族・医療関係者は、より優れた治療法の開発に日夜努力しているが、その答えを得るためには、多施設が協力し、多数の症例に対し、厳格に規定された臨床研究計画を順守して治療を行い、得られたデータを科学的に収集して評価を行い、そこから問題点の抽出・考察を行って結論を導き、それをもとに次なる臨床研究計画の最適化をはかるといふ一連の作業を行う多施設共同臨床試験が必要である<sup>6)</sup>。

#### 2. 日本における多施設共同臨床研究の開始

日本では 1980 年代のなかごろから全国的な共同研究体制が開始された。その一つとして、厚生省がん研究助成金による研究班が組織され、1985 年澤口重徳班、1991 年土田嘉昭班、1998 年金子道夫班として臨床研究が行われてきた。そのもつ

とも大きな功績は、A1 療法および A3 療法の開発と MEC 療法などによる大量化学療法の導入普及である<sup>7)</sup>。

85 年研究では A1 療法 (CPA 1,200 mg/m<sup>2</sup>+VCR 1.5 mg/m<sup>2</sup>+THP 40 mg/m<sup>2</sup>+CDDP 90 mg/m<sup>2</sup>) が開発され、日本小児外科学会分類の III 期と IV 期神経芽腫を対象とし、寛解導入率 93%・4 年生存率 75% (III 期)・39% (IV 期) と、その当時の欧米諸国よりも良い成績を報告した<sup>7)</sup>。

次の 91 年研究では、A3 療法 (CPA 1,200 mg/m<sup>2</sup>×2+VP-16 100 mg/m<sup>2</sup>×5+THP 40 mg/m<sup>2</sup>+CDDP 25 mg/m<sup>2</sup>×5) が開発され、また A1 療法の VCR は VP-16 100 mg/m<sup>2</sup>×5 に変更された (new A1 療法)。この結果は、寛解導入率 92%、5 年無イベント生存割合 (EFS) は MYCN 増幅例の A3 療法群では 49.0%、new A1 療法群で 37.0% (大量化学療法併用)・47.0% (大量化学療法非併用) であった<sup>8,9)</sup>。しかし MYCN 非増幅例の 5 年 EFS は、85 年研究では 33.3%、91 年研究でも 32.2% であった<sup>8,9)</sup>。また二次性白血病/骨髄異形成症候群の発生がみられた<sup>9)</sup>。

これを受けた 98 年研究では、INSS 病期分類とリスク群を 3 群に分けた層別化治療を採用した。また VP-16 を二次性白血病発生を受けて VCR に戻している (98A1・98A3)。2003 年 12 月の中間解析報告では、解析可能 134 例で、4 期の 5 年無増悪生存割合 (PFS) は 50% と報告されている。

#### 3. 日本神経芽腫研究グループの発足

21 世紀を迎えると、これまでの研究体制のより一層の整備の必要性が認識され、欧米型臨床研究体制の構築を目指す動きが活発となった。その結果、上記の厚生省研究班を中核に複数の研究グループが協力しあい、2006 年に全国的な組織として日本神経芽腫研究グループ (Japan Neuroblas-

Hiroyuki Shichino

\* 日本大学医学部小児科学系小児科学分野日本神経芽腫研究グループ

〔〒173-8610 東京都板橋区大谷口上町 30-1〕

toma Study Group : JNBSG) が発足した。JNBSG の目的は、神経芽腫に対する安全かつ有効な標準的治療法の確立と、より優れた新たな治療法の継続的な開発である。2011 年 5 月現在全国 112 の主要な小児がん治療施設が参加し、グループ代表 (JNBSG 会長) は、初代は金子道夫 (筑波大学)、現在は池田 均 (獨協医科大学) が就任している。また運営委員長は原 純一 (大阪市立総合医療センター)、事務局長は福島 敬 (筑波大学) である。

JNBSG では、各リスク群や再発例などに対しての臨床試験を計画し実施している。また、中央病理診断や中央分子生物学的診断体制を整備している。さらにトランスレーショナル研究・データセンター・組織バンク・種々の治療相談体制などの整備・運営を行っている。

## II. これまでに行われた JNBSG 高リスク 神経芽腫多施設共同臨床試験

### 1. 2 つの臨床試験

JNBSG ではすでに 2 つの高リスク神経芽腫に対する多施設共同臨床試験が終了している。

2006 年 6 月から「進行神経芽腫に対し原発巣切除術を含む局所療法を大量化学療法後に遅延させて行う治療計画の早期第 II 相臨床試験」(以下、旧遅延局所試験) を開始した。研究代表は麦島秀雄 (日本大学) である。ついで 2007 年 3 月から「高リスク神経芽腫に対する標準的集学的治療の後期第 II 相臨床試験」(以下、標準的治療検証試験) を開始した。研究代表は熊谷昌明 (国立成育医療研究センター) である。この両試験は、それまでの比較的緩やかな試験体制を改め、厳格なデータ管理を行った初めての神経芽腫に対する多施設共同臨床試験である。

### 2. 標準的治療検証試験

標準的治療検証試験の概要を述べる。米國小児腫瘍グループ (COG) リスク分類で高リスクと判定される 1 歳以上 18 歳未満の神経芽腫患者を対象としている。治療計画は以下の通りである。寛解導入化学療法は、これまでの A1・A3 療法実施により明らかとなった種々の有害事象を軽減する目的で修正が行われた 05A1・05A3 療法を採用し

た。初回は 05A1 療法を行い、その後 2~3 コースの 05A3 療法を行ったのちに外科療法を行い、その後さらに 05A3 療法を 1~2 コース追加する。大量化学療法は、全身放射線照射 (TBI) を採用せず、05MEC 療法とし最後に行う。ただし、INSS 3 期・日齢 547 日以上・MYCN 増幅なし・予後不良組織型をすべて満たす群に関しては、大量化学療法を行わず、代わりに 05A3 を 1 コース追加して終了する。試験の目的は、臨床試験計画の治療法の安全性と有効性の評価である。プライマリー・エンドポイントは 3 年 PFS, セカンダリー・エンドポイントは 3 年全生存割合 (OS) と有害事象発生割合である。予定登録数は 40 例で、登録期間は 2 年、観察期間は 3 年、総研究期間は 5 年の計画である。

現在登録は終了し、参加施設は 68 施設、登録症例数は 50 例で、観察期間を継続しデータを収集中である。

### 3. 旧遅延局所試験

旧遅延局所試験の概要は以下の通りである。対象は INSS 4 期の 1 歳以上の神経芽腫患者である。治療計画は、すべての化学療法を局所療法よりも先行させ、局所療法としての外科療法および放射線療法は全化学療法終了後に遅延させて行うものである。試験の目的はこの計画の安全性と有効性の評価である。プライマリー・エンドポイントは治療第 12 週を起点とした 1 年 PFS で、セカンダリー・エンドポイントは 2 年 PFS および OS と治療第 12 週および外科療法前における奏効割合および有害事象発生割合である。寛解導入化学療法は 05A3 療法を 5 コース連続して行う。その後続けて 05MEC 療法による大量化学療法を行い、最後に外科療法および放射線療法を施行する。施設限定臨床試験として実施し、予定登録数は 16 例、登録期間は 2 年、観察期間は 15 カ月である。現在登録は終了し、参加施設は 10 施設、登録症例数は 11 例であった。すでに観察期間が終了し、データ解析中である。

### 4. 遅延局所療法の設定根拠

遅延局所療法の設定根拠を説明する。現在世界中の標準的治療計画は、JNBSG 標準的治療検証試験と同様の組み立てによるものである。まず高リ

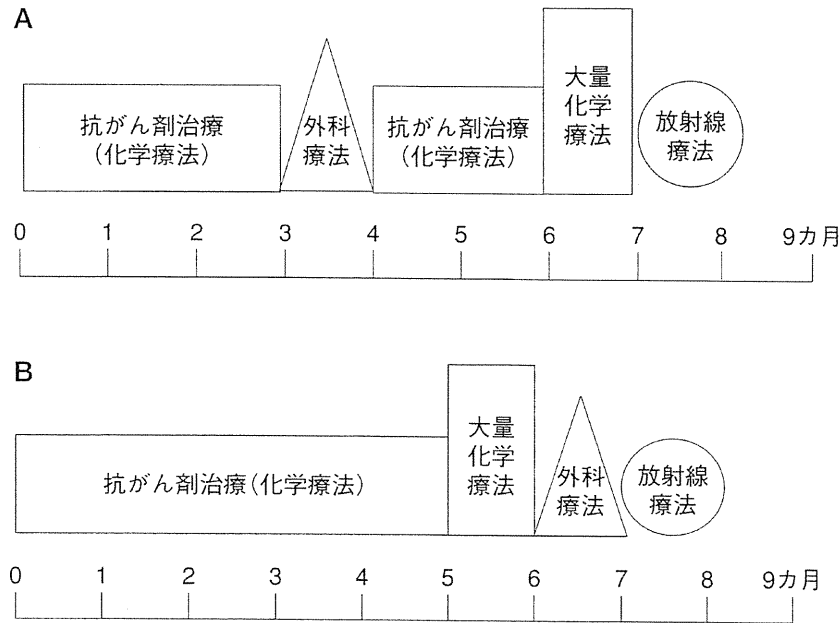


図 治療骨格

スク神経芽腫では、発症時に原発巣を一次的に全摘出できる症例はほとんどなく、腫瘍の進行も速く、また骨・骨髄転移合併例がほとんどのため、速やかに全身化学療法を開始することが必要である。寛解導入療法を数コース行ったのちに行われるのは、局所療法としての外科切除術および局所放射線療法である。その終了後には再度強化した化学療法を数回行い、そのちに骨髄破壊的大量化学療法による地固め療法を行う。これをまとめると、生検→多剤併用寛解導入化学療法→二次的外科切除術（→放射線療法）→多剤併用強化化学療法→地固め療法としての骨髄破壊的大量化学療法±全身放射線療法を用いた造血幹細胞移植という治療骨格である（図 1A）<sup>2)</sup>。

ところで高リスク神経芽腫では、治療終了後だけでなく、寛解導入から強化・地固め療法などの化学療法中のどの時期でも、また外科・放射線による局所療法中でも原発部位の増悪や再燃あるいは新たな転移巣の出現などが度々経験される。このため高リスク神経芽腫の治療は原発腫瘍を標的とするだけでなく、治療初期から全身に散在する転移腫瘍細胞を早期に根絶することにも向けられている。

また、化学療法の中断による神経芽腫細胞の増悪も懸念されている。日本では、外科療法後のリ

ンパ漏や bacterial translocation による敗血症などの術後合併症により、また放射線治療による腸管合併症などにより、化学療法の継続が中断される時期が長くなることが多く経験される。あるいは種々の要因により計画された時期に局所療法が実施できないことも多い。このような理由により化学療法の中断や減量をせざるをえない事態が多くみられる。化学療法の治療間隔があくことは薬剤耐性の早期獲得につながり好ましくないと考えられる<sup>10)</sup>。

遅延局所療法では、局所療法を全化学療法終了後に行う計画とすることにより、局所療法による化学療法の中断減量を必要とせず、一気に全身に播種している腫瘍細胞を破壊し治療を完遂するという戦略である。これをまとめると、生検→多剤併用寛解導入化学療法→地固め療法としての骨髄破壊的大量化学療法を用いた造血幹細胞移植→二次的外科切除術→放射線療法という骨格である（図 1B）。

### III. 新遅延局所試験

#### 1. 試験の概要

現在進行中の JNBSG 高リスク神経芽腫に対する臨床試験は、2011年2月から行われている「高リスク神経芽腫に対する遅延局所療法第II相臨床



表 1 寛解導入療法 05A1/05A3

薬の種類	薬の量 mg/m <sup>2</sup> /日	方法	治療日				
			1	2	3	4	5
シクロフォスファミド	1200	点滴 1 時間	↑	↑*			
ピンクリスチン	1.5	静注	↑				
ピラルピシン	40	静注			↑		
シスプラチン	20	点滴 24 時間	↑	↑	↑	↑	↑

\*シクロフォスファミドは、05A1 では 1 日目だけ投与し、05A3 では 1 日目と 2 日目に投与する。

表 2 大量化学療法 09MEC

薬の種類	薬の量 mg/m <sup>2</sup> /日	方法	治療日										
			-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	
メルファラン	100	静注または点滴	↑	↑									移植日
エトポシド	200	点滴 2 時間程度			↑	↑	↑	↑					
カルボプラチン	400	点滴 24 時間			↑	↑	↑	↑					

試験」(以下、新遅延局所試験)である。

本試験の目的は、遅延局所療法により治療全体の強度を増強し治療成績を向上させることであり、そのための治療計画の安全性と有効性の評価である。プライマリー・エンドポイントは 3 年 PFS, セカンダリー・エンドポイントは 3 年 OS と有害事象発生割合および自家造血幹細胞移植後(外科療法前)における奏効割合である。

対象は、登録時の年齢が 180 日以上 18 歳 0 日以下で、原発巣または転移巣の開創生検で組織学的に神経芽腫または神経節芽腫と診断されている初発患者で、COG リスク分類で高リスクと判定され、診断時原発腫瘍を切除することが不適格であると判断される患者である。具体的には以下の条件を満たす患者を対象とする。MYCN 増幅例では年齢が 180 日以上の INSS 3 期または 4 期例を対象とする。また、MYCN 非増幅例では、① 生後 365 日以上 546 日以下の INSS 4 期で INPC で unfavorable histology か、または DNA index=1 の患者、② 生後 547 日以上の INSS 3 期で INPC で unfavorable histology の患者、③ 生後 547 日以上の INSS 4 期の患者である。

試験治療は以下の順で行う一連の治療である。

- ① 寛解導入化学療法として 05A1 療法(表 1)を 1 コース施行する。
- ② 引き続いて寛解導入化学療法として 05A3 療法を 4 コース繰り返す。
- ③ 寛解導入化学療法第 3~4 コース目に自家末梢血幹細胞採取を施行する。
- ④ 寛解導入化学療法終了後、大量化学療法(09MEC 療法)を施行する(表 2)。
- ⑤ 大量化学療法後の状態が安定したのち、速やかに外科療法を施行する。
- ⑥ 外科療法後に局所放射線療法を施行する(または術中放射線照射を施行する)。予定登録数は 66 例で、登録期間は 3 年、観察期間は 3 年の計画である。

## 2. 臨床試験への参加の手順

本臨床試験に参加するためには、まず治療施設が「JNBSG 施設」であることが必要である。そのうえで、本臨床試験の「参加施設登録」・試験登録予定患者の「JNBSG 登録」・登録患者の「症例登録」を順に行う必要がある。

(1) JNBSG 施設となるためには、JNBSG 事務局に申請し、運営委員会の審査を経て承認される。

(2) 参加施設登録は以下の手順で行う。① 施設研究責任者は施設倫理委員会(IRB)へ本臨床研

究計画書の審査を依頼し承認を得る。② IRB の承認が得られたのち「承認文書」と「IRB 承認報告書」をデータセンターへ送付する。③ データセンターは、参加施設へ「施設登録確認書」と「症例登録セット」を送付する。この時点で参加施設登録が完了する。

(3) JNBSG 登録は以下の通りである。① 担当医師は、神経芽腫あるいはその疑いと診断された患者あるいは代諾者に、説明文書を用いて本臨床試験について説明を行い同意を得る。② 同意が得られたら JNBSG 登録票を記入しデータセンターに FAX で送付する（以下、データセンターとのやり取りはすべて FAX で）。③ データセンターは、記載内容をチェックしたうえで JNBSG 登録を行い JNBSG 番号を発行する。④ 担当医師は「中央診断用検体送付票」を記入してデータセンターに送信し、「JNBSG 検体取扱い手順書」にしたがって検体を提出する。以上で JNBSG 登録は終了であるが、この時点ではまだ臨床試験治療は開始できない。

(4) 臨床試験症例登録は以下の手順で行う。JNBSG 登録後、① 担当医師は病理確定診断が得られ、対象症例が患者選択規準に該当することを確認したのちに、「臨床試験症例登録票」をデータセンターへ送付する。② データセンターは、症例適格性の確認を行い、「プロトコル登録コード」を発行し、担当医師に「症例登録確認書」を送付する。これで、症例登録が完了し、臨床試験治療を開始することが可能となる。治療開始後の臨床試験症例登録は認められない。ただしやむをえない事情により、祝祭日・土日曜日・夜間に治療を開始する必要がある場合は、担当医師は「臨床試験症例登録票」を送付したのちに臨床試験治療を開始することができる。この場合には、データセンターが後日「臨床試験症例登録票」を確認し、適格と判断した時点で「プロトコル登録コード」が発行される。

### 3. 臨床試験研究組織

本臨床試験研究代表は麦島秀雄（日本大学）、研究事務局は七野浩之（日本大学）である。中央病理診断事務局は藤本純一郎および中澤温子（国立成育医療研究センター）、中央分子生物学的診断事

務局は中川原 章（千葉県がんセンター）である。放射線療法研究事務局は正木英一（国立成育医療研究センター）、外科療法研究事務局は田尻達郎（九州大学病院小児外科）である。データセンターは国立成育医療研究センター臨床研究センターで、データセンター長は瀧本哲也である。統計解析は高橋秀人（筑波大学大学院）、効果安全性評価委員会は武田晃司（委員長：大阪市立総合医療センター）、岡田昌史（筑波大学大学院）、細野亜古（国立がん研究センター中央病院）である。

プロトコル作成は、JNBSG プロトコル検討委員会高リスク神経芽腫プロトコル作業部会（原 純一、七野浩之、熊谷昌明、松本公一、黒田達夫、菱木知郎、副島俊典、田尻達郎、正木英一）と、JNBSG 化学療法委員会（麦島秀雄、杉本徹、飯塚 進、家原知子、今泉益栄、小川 淳、菊田 敦、菊地 陽、高嶋能文、西村真一郎、小阪嘉之）、JNBSG データセンター、JNBSG 会長および JNBSG 事務局が行った。

### IV. 新遅延局所試験の意義と次期臨床試験

本臨床試験は、日本における高リスク神経芽腫に対する標準治療の確立を目指すものであり、その意義は以下の通りである。① 05A1+05A3 による寛解導入化学療法の安全性と有効性の評価を行い、寛解導入療法の最適化をはかる。② 遅延局所療法という新たな概念を適用することによって、総合的な治療強度を上げる戦略の安全性と有効性を評価する。③ 外科療法および放射線療法は、可能な限り統一したガイドラインに基づいて行うことにより施設間の手技格差を最小化し、神経芽腫治療の均てん化をはかる。

検討中の次期臨床試験は以下の通りである。本試験と平行して、大量化学療法の治療計画の異なる早期第 II 相試験を施行する計画であり、一定の実行可能性と有効性が示されれば、次期臨床試験として、どちらの大量化学療法が有効であるのかを比較する試験を検討する。また、研究期間内に別の有望な治療が開発されれば、それも取り入れた形のランダム化第 II 相試験などを企画する可能性もある。

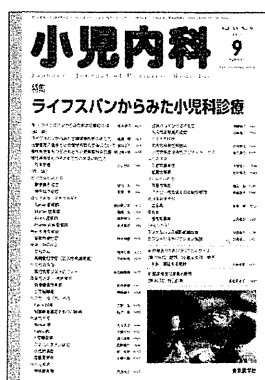
全世界の神経芽腫患者・家族・医療関係者は、

より優れた治療法の開発に日夜努力しているが、その答えを一日でも早く得るためにも、多施設が協力して行う JNBSG 臨床試験への参加を切にお願いしたい。

## 文 献

- 1) <http://www.ccaj-found.or.jp/jspo/member/kokei20082009.pdf>
- 2) 七野浩之, 陳 基明, 麦島秀雄: 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. 小児がん 47: 46-52, 2010
- 3) Ikeda H, Iehara T, Tsuchida Y, et al: Experience with International Neuroblastoma Staging System and Pathology Classification. Br J Cancer 86: 1110-1116, 2002
- 4) Iehara T, Hosoi H, Akazawa K, et al: MYCN gene amplification is a powerful prognostic factor even in infantile neuroblastoma detected by mass screening. Committee of Neuroblastoma in the Japanese Society of Pediatric Oncology. Br J Cancer 94: 1510-1515, 2006
- 5) 七野浩之: 進行神経芽腫の TBI 併用大量化学療法. 小児外科 40: 653-657, 2008
- 6) 七野浩之: <臨床試験に参加しよう>ガイドライン診療と臨床試験は何が違うのですか? 小児内科 39: 2121-2123, 2007
- 7) Sawaguchi S, Kaneko M, Uchino J, et al: Treatment of advanced neuroblastoma with emphasis on intensive induction chemotherapy. Cancer 66: 1879-1887, 1990
- 8) Kaneko M, Nishihira H, Mugishima H, et al: Stratification of treatment of stage 4 neuroblastoma patients based on N-myc amplification status. Med Pediatr Oncol 31: 1-7, 1998
- 9) Kaneko M, Tsuchida Y, Mugishima H, et al: Intensified chemotherapy increases the survival rates in patients with stage 4 neuroblastoma with MYCN amplification. J Pediatr Hematol Oncol 24: 613-621, 2002
- 10) Pearson AD, Pinkerton CR, Lewis IJ, et al: High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. Lancet Oncol 9: 247-256, 2008

## 好評発売中



雑誌『小児内科』43巻9号(2011年9月号) 定価2,730円

## 特集 ライフスパンからみた小児科診療

序 —ライフスパンからみた病気の節目とは

### 【総論】

ライフスパンからみた定期健康診断のあり方  
治療管理の進歩と小児慢性疾患の予後について  
慢性疾患をもつ子どもたちの思春期外来診療  
慢性疾患をもつ子どもたちの生活の自立と将来計画

### 【各論】

先天性骨系統疾患  
軟骨無形成症  
骨形成不全症  
遺伝子異常・染色体異常症  
Turner 症候群  
Marfan 症候群  
Down 症候群  
Prader-Willi 症候群  
神経皮膚症候群  
結節性硬化症  
精神・神経疾患  
てんかん  
高機能自閉症(広汎性発達障害)  
先天性筋疾患  
進行性筋ジストロフィー  
腫瘍性疾患—晩期障害  
血液腫瘍性疾患  
小児脳腫瘍  
先天性、後天性心疾患  
Fallot 四徴

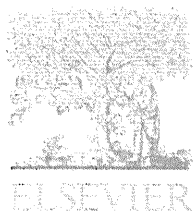
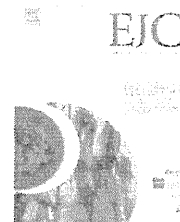
冠動脈後遺症をもつ川崎病  
代謝性疾患  
Wilson 病  
Fabry 病  
1 型糖尿病  
フェニルケトン尿症  
小児肥満症  
脂質異常症  
内分泌疾患  
甲状腺疾患  
成長ホルモン分泌不全症  
先天性副腎過形成症  
リウマチ性疾患  
若年性特発性関節炎  
小児期発症全身性エリテマトーデス  
消化器疾患  
炎症性腸疾患  
短腸症候群  
アレルギー疾患  
気管支喘息  
アトピー性皮膚炎の年齢別管理  
血液凝固異常症  
血友病  
腎疾患  
慢性腎臓病

### 【トピックス】

ランゲルハンス細胞組織球症  
カロリーリストリクション仮説

東京医学社

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町 2-20-13 Y's コーラルビル TEL 03-3265-3551 FAX 03-3265-2750  
E-mail: hanbai@tokyo-igakusha.co.jp URL: <http://www.tokyo-igakusha.co.jp/>

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.ejconline.com](http://www.ejconline.com)

## 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

Veronica Moroz <sup>a,\*</sup>, David Machin <sup>a</sup>, Andreas Faldum <sup>b</sup>, Barbara Hero <sup>c</sup>, Tomoko Iehara <sup>d</sup>, Veronique Mosseri <sup>e</sup>, Ruth Ladenstein <sup>f</sup>, Bruno De Bernardi <sup>g</sup>, Hervé Rubie <sup>h</sup>, Frank Berthold <sup>c</sup>, Katherine K. Matthay <sup>i</sup>, Tom Monclair <sup>j</sup>, Peter F. Ambros <sup>k</sup>, Andrew D.J. Pearson <sup>l</sup>, Susan L. Cohn <sup>m</sup>, Wendy B. London <sup>n,\*</sup>

<sup>a</sup> Children's Cancer and Leukaemia Group Data Centre, University of Leicester, Leicester, UK

<sup>b</sup> Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics, University of Mainz, Germany

<sup>c</sup> Department of Pediatric Oncology and Hematology, Children's Hospital, University of Cologne, Germany

<sup>d</sup> Department of Pediatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan

<sup>e</sup> Service de Biostatistiques, Institut Curie, Paris, France

<sup>f</sup> St. Anna Children's Hospital, Kinderspitalgasse 6, 1090 Vienna, Austria

<sup>g</sup> Department of Hematology-Oncology, Giannina Gaslini Children's Hospital, Genova, Italy

<sup>h</sup> Department of Hematology-Oncology, Hôpital des Enfants, Toulouse, France

<sup>i</sup> Department of Pediatrics, and the University of California School of Medicine, San Francisco, CA, USA

<sup>j</sup> Section for Paediatric Surgery, Division of Surgery, Rikshospitalet University Hospital, Oslo, Norway

<sup>k</sup> Children's Cancer Research Institute, St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria

<sup>l</sup> Section of Paediatrics, Institute of Cancer Research and Royal Marsden Hospital, Surrey, UK

<sup>m</sup> Department of Pediatrics, The University of Chicago, Chicago, IL, USA

<sup>n</sup> Children's Oncology Group Statistics and Data Center, Dana Faber Children's Hospital Cancer Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 28 July 2010

Received in revised form 21 October 2010

Accepted 27 October 2010

Available online 26 November 2010

#### Keywords:

Neuroblastoma  
Outcome

### ABSTRACT

**Purpose:** Increasing age has been an adverse risk factor in children with neuroblastoma (NB) since the 1970's, with a 12-month age-at-diagnosis cut-off for treatment stratification. Over the last 30 years, treatment intensity for children >12 months with advanced-stage disease has increased; to investigate if this strategy has improved outcome and/or reduced the prognostic influence of age, we analysed the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) database.

**Patients and methods:** Data from 11,037 children with NB (1974–2002) from Australia, Europe, Japan, North America. Cox modelling of event-free survival (EFS) tested if the era and prognostic significance of age-of-diagnosis, adjusted for bone marrow (BM) metastases and MYCN status, effects on outcome had changed.

\* Corresponding authors: Addresses: Children's Oncology Group (COG) Statistics and Data Center, Dana-Farber Cancer Institute and Children's Hospital Boston, 1 Autumn Street, AU 022, Boston, MA 02215, USA. Tel.: +1 857 218 5124; fax: +1 617 730 0934 (W.B. London); Nottingham Clinical Trials Unit, B39, School of Community Health Sciences, University of Nottingham Medical School, Nottingham NG7 2UH, UK. Tel.: +44 1158 230523 (V. Moroz).

E-mail address: [wendy@cog.ufl.edu](mailto:wendy@cog.ufl.edu) (W.B. London).

0959-8049/\$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.ejca.2010.10.022