

図 4 症例 3 (4 歳男児), 骨組織球症 (右鎖骨)

初診時 (初発より 1 カ月後)。

- A 単純 X 線正面像。右鎖骨遠位部の骨硬化および scalloping を伴う骨透亮像がみられる。
- B 単純 CT。骨膜反応および scalloping が捉えられる。
- C MRI (T1 強調冠状断)。病巣および周囲の髄内信号の低下がみられる。
- D MRI (T2 強調)。髄内および骨外のびまん性の信号上昇がみられる。骨外進展がみられる。
- E MRI (脂肪抑制 T1 強調造影後)。病巣周囲の髄内および骨外軟部組織の造影効果がみられ、皮下まで達している。
- F 生検 1 カ月後の単純 X 線正面像。
- G 1 年後の単純 X 線正面像。

punched out appearance を呈する。さらに外板と内板が二重のシルエットを呈する場合、double-contour あるいは beveled-edge appearance と呼ばれる¹⁸⁾。脊椎においては腰椎 (42%)、胸椎 (39%) が多い¹³⁾。主として椎体に発生し、後方要素は通常温存される。椎体の著しい圧迫骨折を生じ、扁平椎 (vertebra plana) あるいは silver-coin appearance と呼ばれる。椎体長は通常修復する。骨膜反応は 10% にみられ、急性期は単層または多層性の多様な厚みを有する¹⁸⁾。

病期について Mirra ら¹⁴⁾ は、初期、中期、後期

の三期に分類しており、Azouz ら¹⁹⁾ は急性期、慢性期の二期に分類している。急性期は数週間より、画像上辺縁が不明瞭で急速に骨溶解像を呈ユーイング肉腫などの悪性腫瘍や感染との鑑別困難である。初期は髄内の小さな骨破壊がみられこれが骨硬化を伴う辺縁明瞭な病変に縮小すると、endosteal scalloping, cortical erosion, 骨膜反応 (単層あるいは多層) に拡大する場合がある¹⁹⁾。一方、慢性期において扁平骨 (頭蓋骨、盤、鎖骨など) は辺縁が明瞭となり反応性骨硬が早期に現れる。病期について大きくは急性期

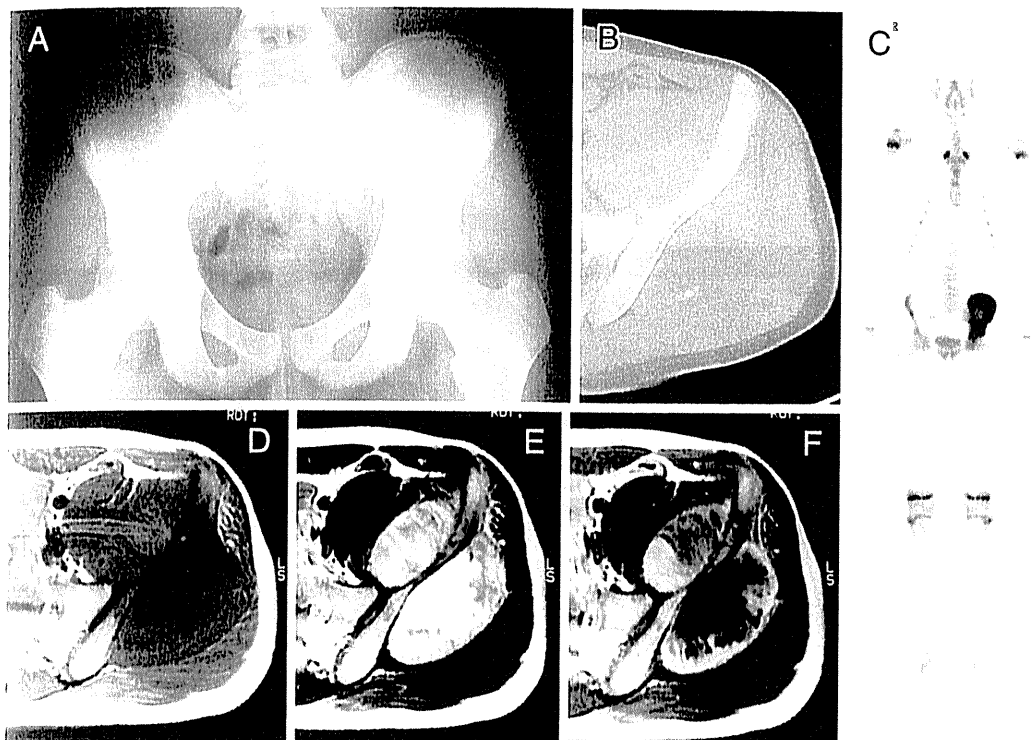


図 5 16歳男子，通常型骨肉腫（左腸骨）

検査所見は WBC : 5,900, CRP : 0.2, ALP : 1,305 であった。

- A 単純 X 線正面像。左腸骨周囲の軟部陰影の増強がみられる。骨の変化は明らかでない。
- B 単純 CT。左腸骨外板にごく一部骨皮質のびらんがみられる。骨外に淡い石灰化がみられる。
- C 骨シンチグラム。左腸骨に広範に高集積像がみられる。
- D MRI (T1 強調水平断)。髓内および骨外に筋と等～低信号の病変がみられる。骨外腫瘍は骨膜を大きく越えて全周性に進展している。
- E MRI (T2 強調)。病変は不均一な高輝度を呈している。病変周囲の骨髄および軟部組織の浮腫状変化は明らかではない。
- F MRI (T1 造影像)。病変は辺縁を中心に造影されている。周囲の造影効果は明らかではない。

慢性期の二期と考えるのがよいと思われる。

CT は特に骨破壊の描出に優れ，特に脊椎，骨盤において有用である。また，CT ガイド下経皮針生検は有用な生検法であり，当科でも積極的に行っている。

MRI は骨髄および軟部組織への進展の把握に有用である。MRI は頭蓋骨では硬膜や脳への進展の把握に有用である。脊椎でも椎間板の把握，特に感染（脊椎炎）との鑑別に有用である。長管骨では骨髄は境界が不明瞭，T1 で低信号，T2 で高信号を呈する。急性期では病巣周囲の骨髄，骨膜，

軟部組織の浮腫がとらえられ，著しい造影効果がみられることが多い。慢性期では単純 X 線像上の骨化の進行および軟部組織腫脹の改善とともに T2 の信号が低下していく¹⁹⁾。Aizawa ら²⁰⁾ は脊椎症例で定期的な造影 MRI が病巣の活動性の把握に有用であると報告している。

VI. 当科での経験

当科で過去 15 年に治療した骨組織球症のうち，生検で病理学的に確定診断を得ている 9 例について提示する。

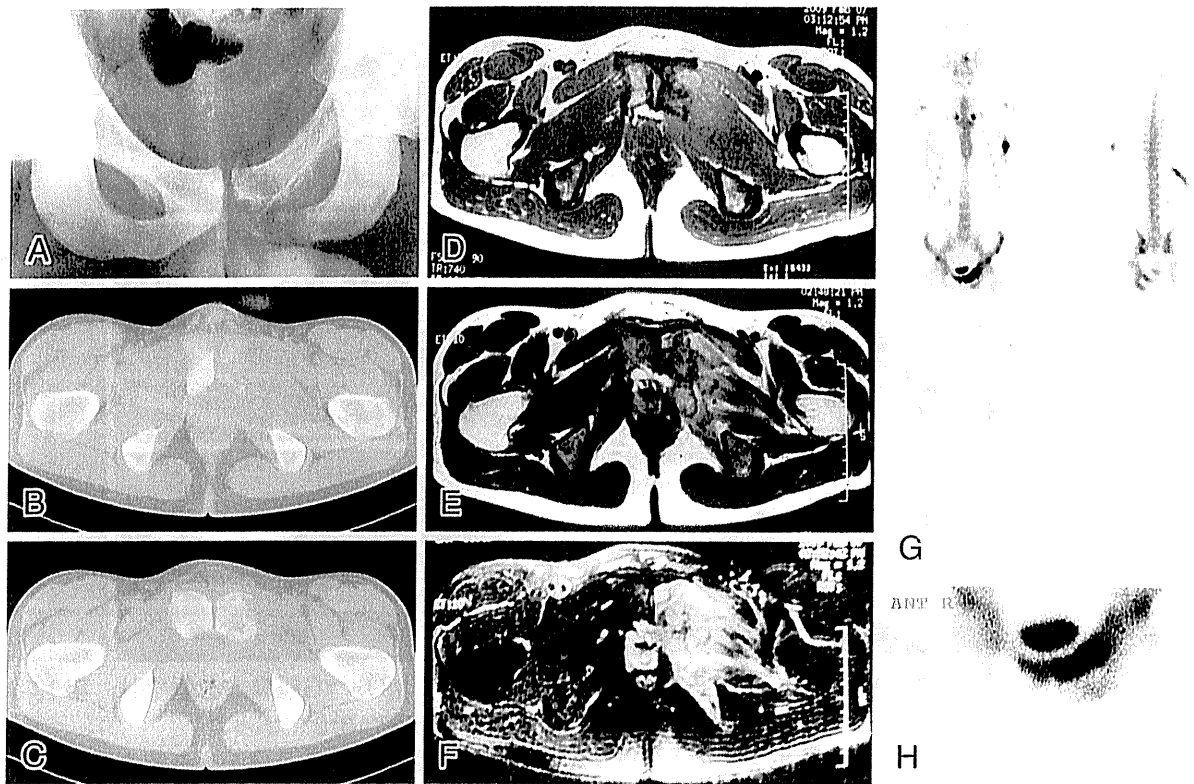


図 6 19歳男性，骨原発未分化大細胞型リンパ腫（左恥骨，両肋骨）

検査所見は WBC : 7,400, CRP : 4.2, IL-2R : 9,089 であった。

- A 単純 X 線正面像。左恥骨内側の辺縁不明瞭な骨透亮像がみられる。恥骨上枝に不連続な骨膜反応がみられる。
- B・C 単純 CT。骨内に不均一な骨吸収像がみられる。
- D MRI (T1 強調水平断)。髓内および骨外に筋と等信号の病変がみられる。
- E MRI (T2 強調)。病変は不均一な高信号を呈している。病変周囲の軟部組織の浮腫状変化がみられる。骨内より骨外（特に小骨盤腔）へ骨膜を越えて病変が進展している。
- F MRI (T2 脂肪抑制像)。病変周囲の軟部組織の浮腫状変化が明らかである。
- G 骨シンチグラム。左恥骨および両肋骨に高集積像が確認される。
- H 骨シンチグラム。左恥骨高集積部の拡大像。

全例男性で，初診時年齢は 2~33 歳（平均 13 歳），発生部位は骨盤が 5 例（腸骨 4 例，恥骨 1 例），脊椎が 2 例（T1, L5），鎖骨・橈骨が各 1 例である（表 3）。初発症状は疼痛が 6 例，跛行が 3 例，腫脹が 1 例にみられた。発症から生検までの期間は 2 週間から 5 カ月（平均 2 カ月），初診時局所所見は圧痛が 5 例，腫脹が 2 例，ほかに側弯（疼痛性）が 1 例にみられた。全身発熱は 1 例（37℃ 台）のみだった。

血液・生化学所見（表 4）では，当科初診時の白血球数は 5,300~14,200/mm³（平均 8,900）で，10,000/mm³ 以上はすべて 4 歳以下の症例であっ

た。好酸球数は 1 例（小児例で絶対数のみ高値）以外は正常範囲内であった。CRP は正常範囲から軽度上昇にとどまり，最高値で 0.9 であった。

画像所見は，単純 X 線像または CT で骨皮質の破壊，骨膜反応，endosteal scalloping，辺縁骨硬化を，MRI で骨髓内の浮腫，骨外軟部組織の浮腫，骨外軟部組織への進展の有無について検討した（表 5）。単純 X 線像および CT において全例に骨皮質の破壊がみられ，次いで辺縁の骨硬化像が 8 例に，endosteal scalloping が 6 例にみられた。骨膜反応は橈骨と鎖骨の 2 例にとどまった。いずれも単層あるいは多層性の骨膜反応であり，骨膜反

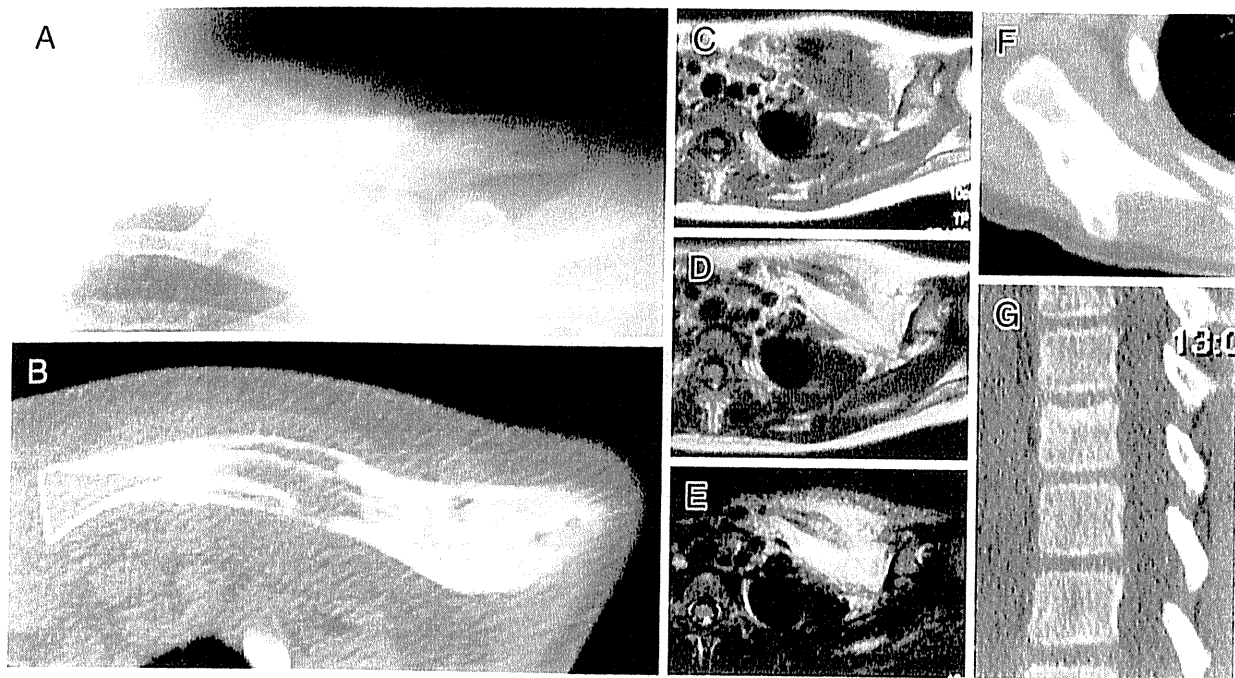


図 8 6歳女児，慢性再発性多巣性骨髓炎（CRMO）（右鎖骨，右肩甲骨，第12胸椎）

検査所見は WBC：5,900，CRP：3.0 であった。

- A 単純 X 線像。周囲の骨硬化を伴う虫喰いから地図様の骨透亮像がみられる。
- B 単純 CT。層状の骨膜反応を伴う骨透亮像がみられる。Endosteal scalloping は明らかではない。
- C MRI（T1 強調水平断）。髓内および骨外に等信号の病変がみられる。
- D MRI（T2 強調）。髓内および骨外にびまん性の高信号の病変がみられる。骨外の腫瘤性病変は明らかではない。
- E MRI（T2 脂肪抑制像）病変周囲の軟部組織の浮腫状変化がみられる。
- F 単純 CT。右肩甲骨に骨硬化を伴う虫喰い陰影がみられ，骨膜反応が確認される。
- G 単純 CT 矢状断再構築像。第12胸椎椎体の骨硬化像と頭側の圧潰がみられる。

（MRI は宮城県立こども病院 佐藤 篤 先生よりご提供）

脹および発熱の程度はユーイング肉腫より一般に穏やかであり，当科の症例でも1例に軽度の発熱（37℃台）をみるにとどまった。Widhe ら²¹⁾ はユーイング肉腫の64%に動作時痛が，19%に夜間痛が，34%に腫瘤が触知されたと報告している。当科の症例では局所症状としての腫脹については，画像上周囲の炎症，浮腫が強かった急性期の橈骨，鎖骨の2例にとどまった（図3，図4）。

検査所見では当科の症例では白血球数は5,300～14,200/mm³（平均 8,900）で，10,000/mm³ 以上はすべて4歳以下の小児症例であった。CRP は正常範囲から軽度上昇にとどまり，最高値で0.9であった。血液生化学上は，ユーイング肉腫，悪性リンパ腫，骨髓炎などの鑑別すべき疾患

と比べ，炎症所見が比較的軽度であることが特徴と思われた。また他の検査値としては，骨肉腫についてはALP値が（図5），骨原発悪性リンパ腫については可溶性インターロイキン2レセプター（IL-2R）測定が診断に有用であった（図6）。

画像所見では，Song ら²²⁾ は成人の四肢・骨盤発生の骨組織球症において，骨膜反応を伴う endosteal scalloping および budding appearance が診断に有用であると述べている。骨皮質に垂直性の骨膜反応は骨肉腫やユーイング肉腫に多く確認されるが，骨転移癌においても報告がみられる¹⁶⁾²³⁾。当科の症例では endosteal scalloping は6例にみられたが骨膜反応は2例にとどまり，骨皮質に垂直性の骨膜反応は確認されなかった。この点は鑑

特集 炎症など悪性骨・軟部腫瘍と見まちがう疾患 —診断のポイント—

骨組織球症

—臨床・画像上の特徴と悪性腫瘍との鑑別—

保坂正美^{*1)} 羽鳥正仁^{*2)} 常陸真^{*3)}
綿貫宗則^{*1)} 相沢俊峰^{*1)} 井樋栄二^{*1)}

要旨：当科で経験した骨発生ランゲルハンス細胞組織球症（骨組織球症）9例について臨床像，血液所見，および画像所見を検討した。初発症状は疼痛が多く，腫脹は1例にとどまった。血液所見では白血球値は正常から高値，CRPは正常から軽度上昇を示した。単純X線像およびCTでは辺縁骨硬化像と endosteal scalloping が多くみられた。MRIでは骨内および周囲軟部組織の浮腫性変化が多くみられたものの，骨外に大きく膨隆するような腫瘍性病巣は確認されなかった。初発症状として腫脹が軽微であること，血液・生化学所見で炎症反応が比較的軽度であること，画像上，病期による違いが大きく，病巣周囲の浮腫が顕著であるが骨外へ進展する大きな腫瘍性病変がみられないことが悪性骨腫瘍，特にユーイング肉腫との鑑別において重要な点と考えられた。本疾患を炎症性肉芽腫疾患の一つとして新たに捉え直すことが，診断へのアプローチとして重要と思われた。

I. 歴史的背景

ドイツの外科医である Paul Wilhelm Heinrich Langerhans (1847～1888) は，1868年に上皮に存在する非色素性樹状細胞を世界で初めて報告した（原題：Über die Nerven der menschlichen Haut, 英語名：On the Nerves of the Human Skin）。この細胞が現在ランゲルハンス細胞と呼ばれている¹⁾²⁾。1893年 Hand は口渇，多尿症，眼球突出，

^{*1)} Masami HOSAKA et al, 東北大学大学院医学系研究科, 整形外科

^{*2)} Masahito HATORI, 東北公済病院, 整形外科

^{*3)} Shin HITACHI, 東北大学病院, 放射線診断科

Langerhans cell histiocytosis of bone ; clinical and radiological aspects and differential points from malignant tumor

Key words : Langerhans cell histiocytosis of bone, Eosinophilic granuloma of bone, Ewing sarcoma

肝脾腫を呈する3歳の男児の報告を行った。これがランゲルハンス細胞組織球症（以下，LCH）についての最も信頼性の高い最初の報告である。原因は当初，結核と考えられていた。1953年 Lichtenstein が好酸球性肉芽腫症，Hand-Schüller-Christian 病，Letterer-Siwe 病などの組織球の浸潤・増殖を組織学的特徴とする疾患を Histiocytosis X と名づけた³⁾⁴⁾。1987年に国際組織球学会が，微細形態および免疫組織化学的研究を踏まえ，組織球症を3つに分類した⁵⁾⁶⁾。Histiocytosis X は，このときに Langerhans cell histiocytosis (LCH) と正式に呼称されるようになった。

II. LCH の分類

LCH の臨床分類は現在，主に病巣の広がりによってなされている^{6)~8)}（表1）。本稿では LCH のうち単一臓器発生（SS-LCH）のうち骨に局限し

表 1 LCH の分類^{6)~8)}

1. 単一臓器発生 (single-system disease : SS-LCH)
(1) 単発型 (single site, unifocal)
骨, リンパ節, 肺など単一臓器に単独に発生する。
(2) 多発型 (multiple site, multifocal)
骨やリンパ節などに複数発生する。
2. 多臓器発生 (multi-system disease : MS-LCH)
(1) 臓器不全を伴わないもの
(2) 臓器不全を伴うもの
低リスク群 : 皮膚, 骨, リンパ節
高リスク群 : 肺, 肝, 脾, 造血器

表 2 X線像上の発育速度の分類¹⁶⁾¹⁷⁾

Grade I A : Geographic lesion with sclerotic margin
Grade I B : Geographic lesions with sharp nonsclerotic margin
Grade I C : Geographic lesions with poorly defined margin
Grade II : Geographic lesions with moth-eaten or permeative component
Grade III A : Moth-eaten component
Grade III B : Permeative component

表 3 当科の骨組織球症症例 (臨床所見)

症例	年齢 (歳)	性	部位	生検方法	生検までの期間	初発症状	局所所見
1	2	男	橈骨	open	2週間	夜間痛 (夜泣き)	硬性腫脹 (発赤, 発熱なし)
2	2	男	腸骨	針 (CTガイド下), open	1カ月	跛行	特になし
3	4	男	鎖骨	open	1カ月	腫脹	腫脹
4	4	男	腸骨 (白蓋)	針 (X線透視下)	2カ月	跛行	圧痛
5	6	男	腸骨 (白蓋)	open	3カ月	跛行, 疼痛 (安静, 動作時)	Patrick (+)
6	9	男	L5	針 (X線透視下)	5カ月	疼痛	圧痛, 側弯
7	28	男	腸骨	針 (CTガイド下)	2カ月	疼痛	圧痛
8	28	男	T1	針 (X線透視下)	1カ月	疼痛	圧痛, 上肢しびれ感
9	33	男	恥骨	針 (CTガイド下)	3カ月	疼痛	圧痛 (違和感程度)

表 4 当科の骨組織球症症例 (血液・生化学所見)

症例	年齢 (歳)	部位	白血球数	好酸球 (%)	CRP
1	2	橈骨	10,600	記録なし	0.9
2	2	腸骨	11,460	2.8	0.23
3	4	鎖骨	14,200	4.9	0.87
4	4	腸骨 (白蓋)	8,520	記録なし	0.3 以下
5	6	腸骨 (白蓋)	7,800	4.7	0.58
6	9	L5	5,300	2	0.2
7	28	腸骨	7,800	1	0.6
8	28	T1	6,600	1	0.5
9	33	恥骨	8,100	4	0.1 以下

て発生する症例について骨発生ランゲルハンス細胞組織球症 (以下, 骨組織球症) として表記する。

これは従来より呼称されている (骨) 好酸球性肉芽腫とはほぼ合致する。

表 5 当科の骨組織球症症例（画像所見）

症例	年齢 (歳)	部位	単純 X 線/CT				MRI		
			骨皮質 破壊	骨膜反応	Endosteal scalloping	辺縁硬化	髄内浮腫	骨外浮腫	骨外膨隆
1	2	橈骨	○	○	○	○	○	○	×
2	2	腸骨	○	×	×	×	○	○	○ (一部)
3	4	鎖骨	○	○	○	○	○	○	○
4	4	腸骨 (臼蓋)	○	×	○ (一部)	○ (一部)	○	×	×
5	6	腸骨 (臼蓋)	○	×	×	○	○	○	×
6	9	L5	○	×	○	○	○	○	×
7	28	腸骨	○	×	×	○	○	○	○ (一部)
8	28	T1	○	×	○ (一部)	○ (一部)	○	○	○
9	33	恥骨	○	×	○	○ (一部)	○	×	×

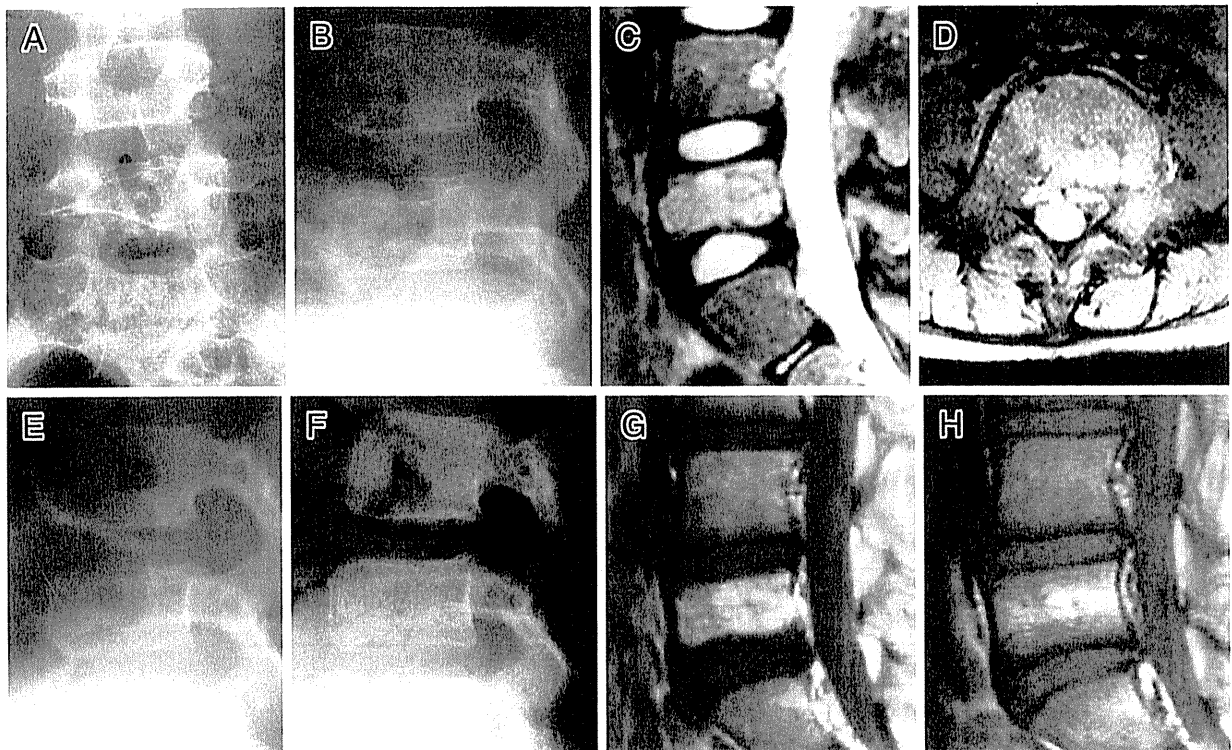


図 1 9 歳男児 (症例 6), 骨組織球症 (L5)

- A 初診時単純 X 線正面像。L5 椎体左側の圧潰がみられる。
 B 同側面像。椎体の骨溶解像がみられる。
 C 初診時 MRI (T2 強調矢状断)。病変は骨髄より高信号である。
 D 同 MRI (T2 強調水平断)。骨外病巣は明らかではない。
 E 10 カ月後の単純 X 線側面像。
 F 3 年後の単純 X 線側面像。椎体の圧潰は徐々に改善した。
 G 10 カ月後の MRI (T1 脂肪抑制造影後矢状断)。骨内に造影効果がみられる。
 H 3 年後の MRI (T1 脂肪抑制造影後矢状断)。造影効果が減弱した。



図 2 2歳男児 (症例 2), 骨組織球症 (左腸骨)

- A～D 初回生検時 (初発より 1 カ月後)。
 A 単純 X 線正面像。左腸骨内側, 仙腸関節部の辺縁不明瞭な骨透亮像がみられる。
 B 単純 CT。軟骨下骨の消失がみられる。骨膜反応や周囲の骨硬化像は明らかでない。
 C MRI (T2 強調水平断)。髓内および骨外のびまん性の信号の上昇がみられる。仙腸関節部前方で骨外進展がみられる。
 D MRI (T1 強調脂肪抑制造影像)。髓内および骨外軟部組織のびまん性造影効果がみられる。
 E～H 第 2 回生検時 (初回生検より 1 カ月後)
 E 単純 X 線正面像。左腸骨内側の骨透亮像の拡大がみられるが, 辺縁の骨硬化像が出現している。
 F CT。病巣の外側部で周囲の骨硬化と endosteal scalloping が捉えられる。
 G MRI (T2 強調水平断)。髓内より骨外へ病巣の拡大がみられる。
 H MRI (T1 強調脂肪抑制造影後)。髓内および骨外のびまん性の造影効果がみられる。
 I 第 2 回生検 7 カ月後単純 X 線正面像。辺縁の骨硬化が進行している。
 J 7 カ月後単純 CT。骨の再生がみられるが変形が残存している。
 K 4 年後単純 X 線像。変形が残存しているが特に愁訴はみられない。

Ⅲ. LCH の病態

LCH は上皮に存在する正常樹状細胞と同様の形態を有する組織球であるランゲルハンス細胞の異常増殖と播種が特徴である²⁾。ランゲルハンス

細胞は上皮, リンパ節, 胸腺, 消化管, 呼吸器および子宮頸部の粘膜上皮に存在し, 正常な樹状細胞の表面抗原を多数有する抗原提示細胞である²⁾⁹⁾。免疫組織化学的には HLA-DR, CD1-a, S100, Fc-receptor 陽性, Lysozyme 陰性であり

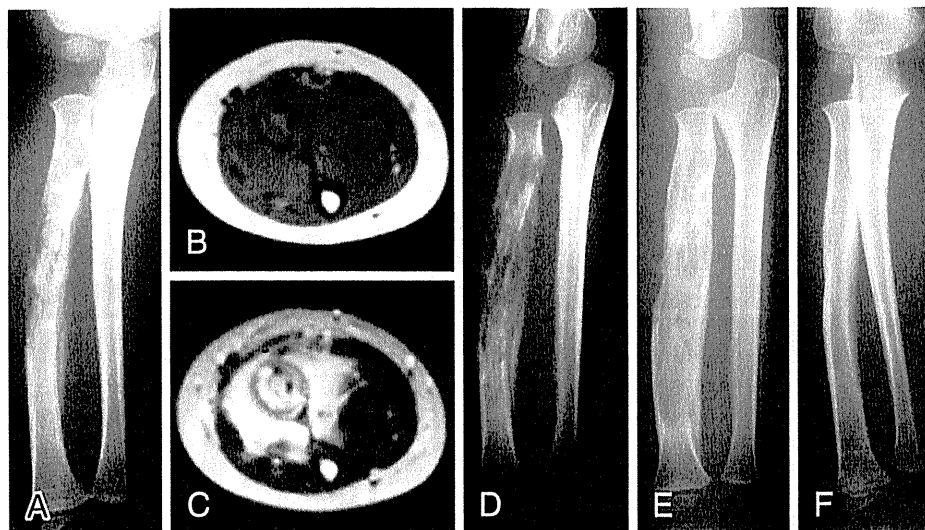


図 3 症例 1 (2 歳男児), 骨組織球症 (右橈骨)

- A 初診時単純 X 線正面像。虫喰い状陰影，骨膜反応がみられる。辺縁が比較的明瞭である。
- B 初診時 MRI T1 強調 (水平断)。髓内信号の低下がみられる。
- C 初診時 MRI (T2 強調)。骨外の信号上昇がみられる。
- D 生検時 (初診より 1 週後，発症より 2 週後) の単純 X 線像。虫喰い陰影とともに周囲の硬化性変化や scalloping がみられる。
- E 1 カ月後の単純 X 線像。骨透亮像が軽快している。
- F 1 年後の単純 X 線像。骨透亮像は消失している。

細胞内小器官である Birbeck 顆粒が電子顕微鏡で観察される⁹⁾¹⁰⁾。LCH は現在，CD1-a 陽性の樹状細胞であるランゲルハンス細胞の制御困難なクローン性増殖により特色づけられる組織球性疾患として位置づけられている¹⁰⁾¹¹⁾。LCH は歴史的に腫瘍説，非腫瘍説 (結核などの感染症を含め) について議論がなされているが，現在のところ真の腫瘍ではなく，ランゲルハンス細胞から放出されるサイトカインによる急性から慢性の炎症性肉芽腫と理解される。

IV. 臨床所見

骨組織球症の臨床症状としては Arckader ら¹²⁾によると，小児において疼痛 (79%) が最も多く，特に脊椎症例の 94% は疼痛を伴っていた。次いで腫脹 (15%)，歩容異常 (11%)，知覚異常 (5%)，ほかに斜頸，高熱，咳，発疹，尿崩症，病的骨折などを呈した。病的骨折はまれとされる¹³⁾。血液所見の特徴としては血沈の軽度亢進，まれに末梢

血好酸球の増加がみられるとされる¹³⁾。

V. 画像所見

骨組織球症の画像所見は多様であり，部位および病期によって大きく異なることが特徴である¹⁴⁾¹⁵⁾。長管骨においては骨幹部に多発する。骨幹部の発生は少ない。まれに骨端線を越え骨端に至る。骨端の発生はまれである。多くは楕円形の骨溶解像を呈し，ゆっくりした進行 (Grade I A ~ Grade II : 辺縁明瞭な地図状陰影 ~ 虫喰い状または浸潤部位を含む地図状陰影) を示すが，急速な骨破壊 (Grade III : 虫喰いまたは浸潤性) を示す場合もある¹⁶⁾¹⁷⁾ (表 2)。Endosteal scalloping, cortical thinning, intracortical tunneling, 髓腔の拡大が一般的な X 線像である。多発小病巣が合体したり重なり合うと，hole-within-a-hole appearance と呼ばれる¹⁸⁾。頭蓋骨においては直径 1~4 cm の円形から類円形の複数の溶骨性陰影がみられることが多い。辺縁は明瞭であり，

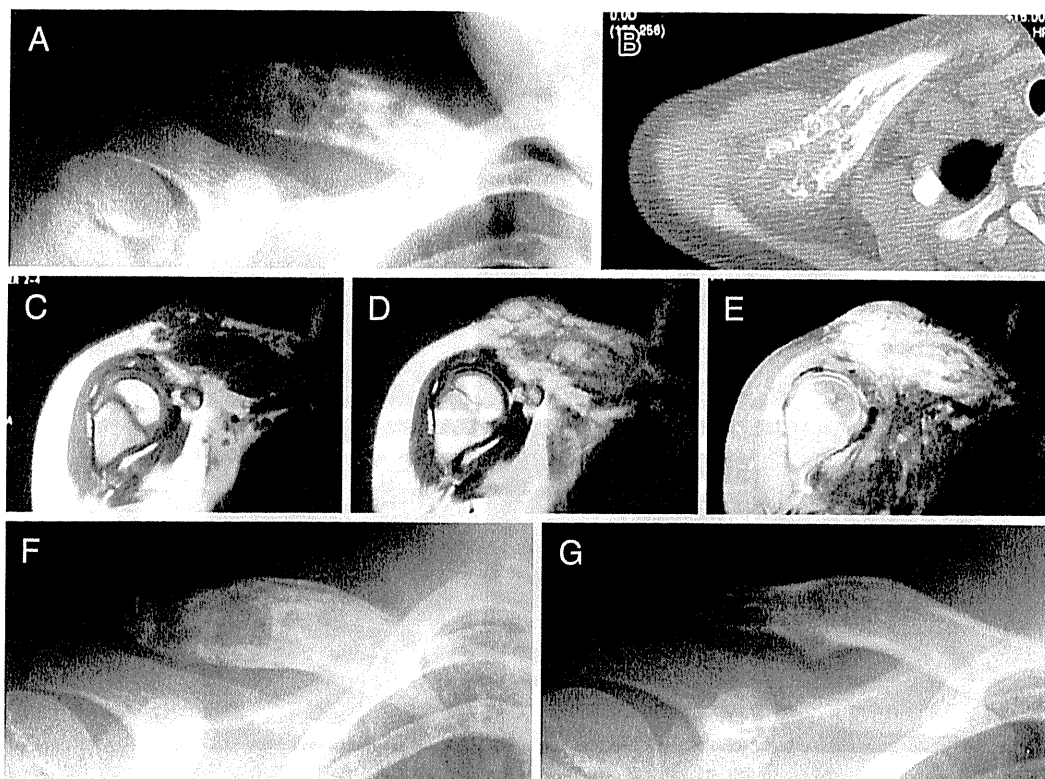


図 4 症例 3 (4 歳男児), 骨組織球症 (右鎖骨)

初診時 (初発より 1 カ月後)。

- A 単純 X 線正面像。右鎖骨遠位部の骨硬化および scalloping を伴う骨透亮像がみられる。
- B 単純 CT。骨膜反応および scalloping が捉えられる。
- C MRI (T1 強調冠状断)。病巣および周囲の髄内信号の低下がみられる。
- D MRI (T2 強調)。髄内および骨外のびまん性の信号上昇がみられる。骨外進展がみられる。
- E MRI (脂肪抑制 T1 強調造影後)。病巣周囲の骨髓内および骨外軟部組織の造影効果がみられ、皮下まで達している。
- F 生検 1 カ月後の単純 X 線正面像。
- G 1 年後の単純 X 線正面像。

punched out appearance を呈する。さらに外板と内板が二重のシルエットを呈する場合、double-contour あるいは beveled-edge appearance と呼ばれる¹⁸⁾。脊椎においては腰椎 (42%)、胸椎 (39%) が多い¹³⁾。主として椎体に発生し、後方要素は通常温存される。椎体の著しい圧迫骨折を生じ、扁平椎 (vertebra plana) あるいは silver-coin appearance と呼ばれる。椎体長は通常修復する。骨膜反応は 10% にみられ、急性期は単層または多層性の多様な厚みを有する¹⁸⁾。

病期について Mirra ら¹⁴⁾ は、初期、中期、後期

の三期に分類しており、Azouz ら¹⁹⁾ は急性期と慢性期の二期に分類している。急性期は数週間であり、画像上辺縁が不明瞭で急速に骨溶解像を呈し、ユーイング肉腫などの悪性腫瘍や感染との鑑別が困難である。初期は髄内の小さな骨破壊がみられ、これが骨硬化を伴う辺縁明瞭な病変に縮小する場合と、endosteal scalloping, cortical erosion, 骨膜反応 (単層あるいは多層) に拡大する場合がある¹⁹⁾。一方、慢性期において扁平骨 (頭蓋骨、骨盤、鎖骨など) は辺縁が明瞭となり反応性骨硬化が早期に現れる。病期について大きくは急性期と

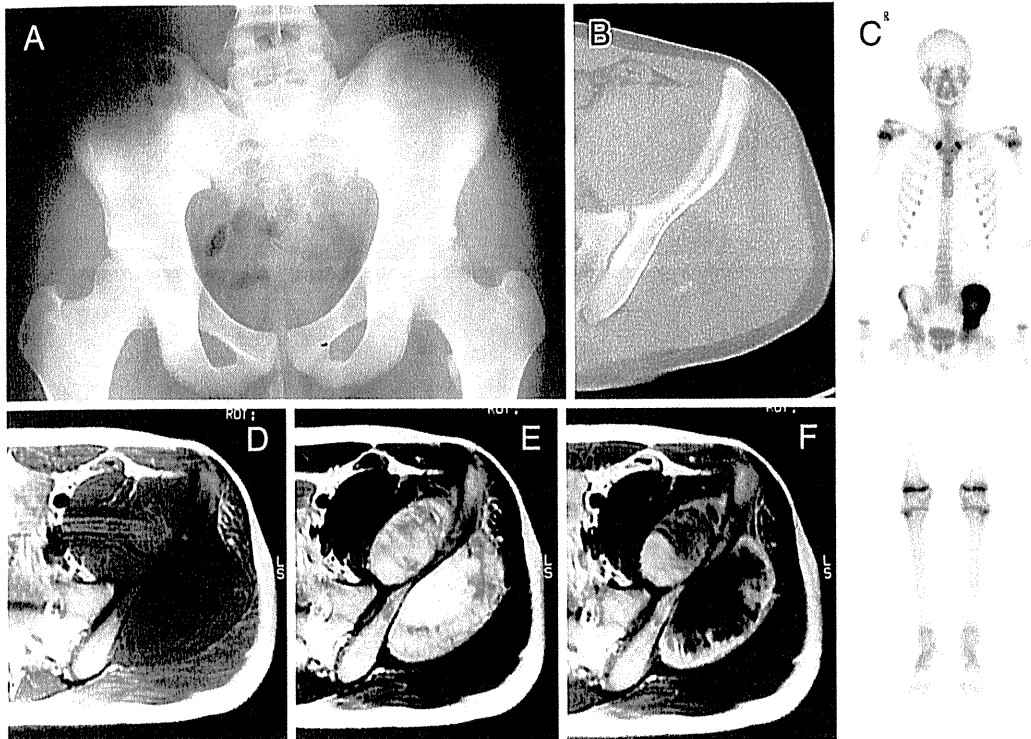


図 5 16歳男子，通常型骨肉腫（左腸骨）

検査所見は WBC : 5,900, CRP : 0.2, ALP : 1,305 であった。

- A 単純 X 線正面像。左腸骨周囲の軟部陰影の増強がみられる。骨の変化は明らかでない。
- B 単純 CT。左腸骨外板にごく一部骨皮質のびらんがみられる。骨外に淡い石灰化がみられる。
- C 骨シンチグラム。左腸骨に広範に高集積像がみられる。
- D MRI (T1 強調水平断)。髓内および骨外に筋と等～低信号の病変がみられる。骨外腫瘍は骨膜を大きく越えて全周性に進展している。
- E MRI (T2 強調)。病変は不均一な高輝度を呈している。病変周囲の骨髓および軟部組織の浮腫状変化は明らかではない。
- F MRI (T1 造影像)。病変は辺縁を中心に造影されている。周囲の造影効果は明らかではない。

慢性期の二期と考えるのがよいと思われる。

CT は特に骨破壊の描出に優れ，特に脊椎，骨盤において有用である。また，CT ガイド下経皮針生検は有用な生検法であり，当科でも積極的に行っている。

MRI は骨髓および軟部組織への進展の把握に有用である。MRI は頭蓋骨では硬膜や脳への進展の把握に有用である。脊椎でも椎間板の把握，特に感染（脊椎炎）との鑑別に有用である。長管骨では骨髓は境界が不明瞭，T1 で低信号，T2 で高信号を呈する。急性期では病巣周囲の骨髓，骨膜，

軟部組織の浮腫がとらえられ，著しい造影効果がみられることが多い。慢性期では単純 X 線像上の骨化の進行および軟部組織腫脹の改善とともに T2 の信号が低下していく¹⁹⁾。Aizawa ら²⁰⁾ は脊椎症例で定期的な造影 MRI が病巣の活動性の把握に有用であると報告している。

VI. 当科での経験

当科で過去 15 年に治療した骨組織球症のうち，生検で病理学的に確定診断を得ている 9 例について提示する。

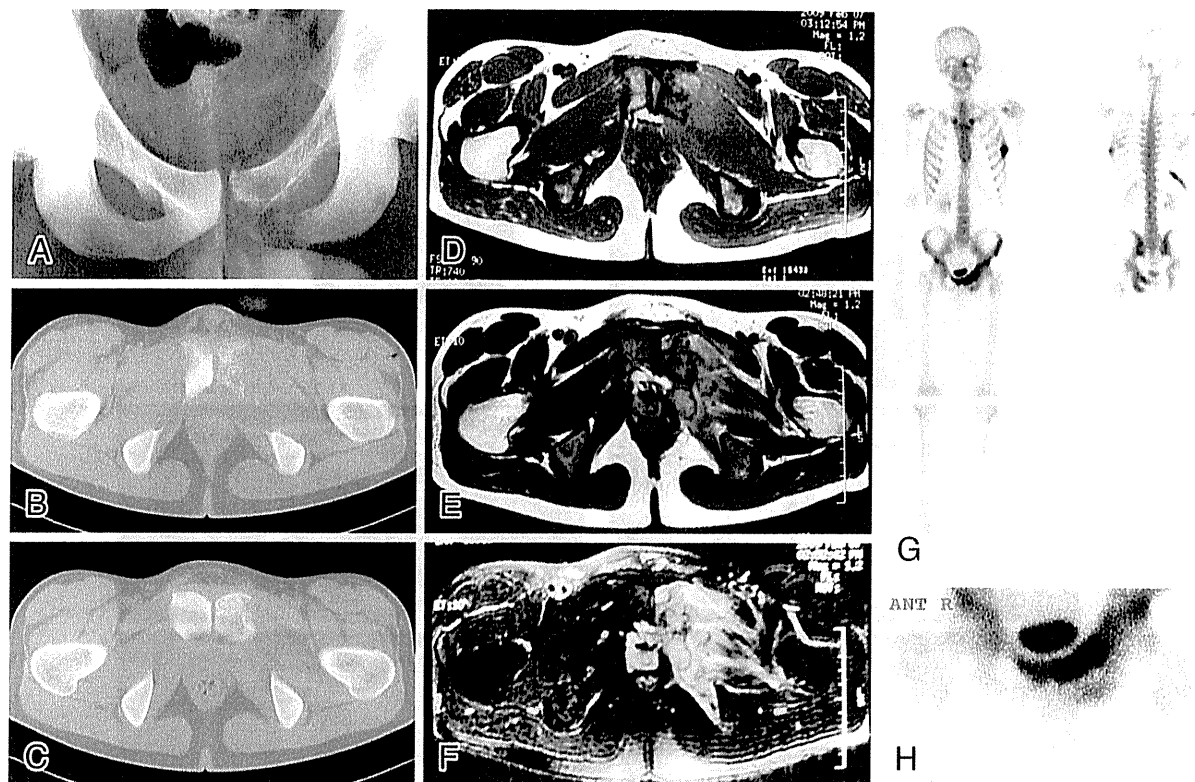


図 6 19 歳男性，骨原発未分化大細胞型リンパ腫（左恥骨，両肋骨）

検査所見は WBC : 7,400, CRP : 4.2, IL-2R : 9,089 であった。

- A 単純 X 線正面像。左恥骨内側の辺縁不明瞭な骨透亮像がみられる。恥骨上枝に不連続な骨膜反応がみられる。
- B・C 単純 CT。骨内に不均一な骨吸収像がみられる。
- D MRI (T1 強調水平断)。髓内および骨外に筋と等信号の病変がみられる。
- E MRI (T2 強調)。病変は不均一な高信号を呈している。病変周囲の軟部組織の浮腫状変化がみられる。骨内より骨外（特に小骨盤腔）へ骨膜を越えて病変が進展している。
- F MRI (T2 脂肪抑制像)。病変周囲の軟部組織の浮腫状変化が明らかである。
- G 骨シンチグラム。左恥骨および両肋骨に高集積像が確認される。
- H 骨シンチグラム。左恥骨高集積部の拡大像。

全例男性で，初診時年齢は 2~33 歳（平均 13 歳），発症部位は骨盤が 5 例（腸骨 4 例，恥骨 1 例），脊椎が 2 例（T1, L5），鎖骨・橈骨が各 1 例である（表 3）。初発症状は疼痛が 6 例，跛行が 3 例，腫脹が 1 例にみられた。発症から生検までの期間は 2 週間から 5 カ月（平均 2 カ月），初診時局所所見は圧痛が 5 例，腫脹が 2 例，ほかに側弯（疼痛性）が 1 例にみられた。全身発熱は 1 例（37℃ 台）のみだった。

血液・生化学所見（表 4）では，当科初診時の白血球数は 5,300~14,200/mm³（平均 8,900）で，10,000/mm³ 以上はすべて 4 歳以下の症例であっ

た。好酸球数は 1 例（小児例で絶対数のみ高値）以外は正常範囲内であった。CRP は正常範囲から軽度上昇にとどまり，最高値で 0.9 であった。

画像所見は，単純 X 線像または CT で骨皮質の破壊，骨膜反応，endosteal scalloping，辺縁骨硬化を，MRI で骨髓内の浮腫，骨外軟部組織の浮腫，骨外軟部組織への進展の有無について検討した（表 5）。単純 X 線像および CT において全例に骨皮質の破壊がみられ，次いで辺縁の骨硬化像が 8 例に，endosteal scalloping が 6 例にみられた。骨膜反応は橈骨と鎖骨の 2 例にとどまった。いずれも単層あるいは多層性の骨膜反応であり，骨膜反

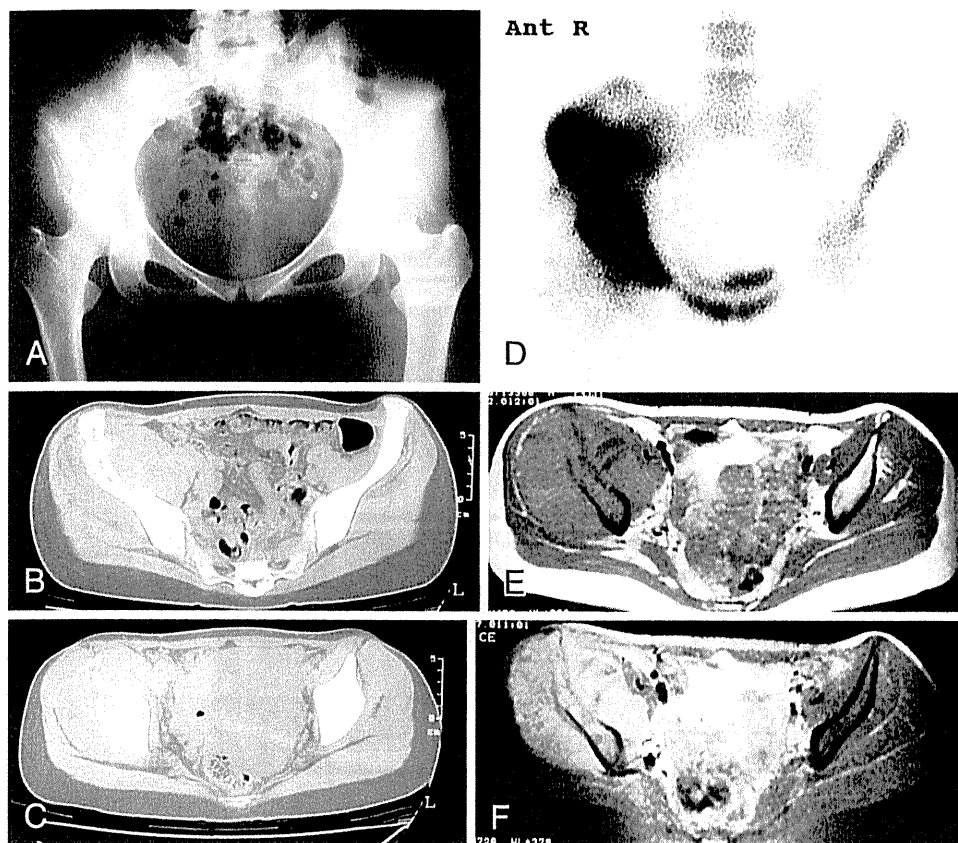


図 7 25歳女性, Ewing肉腫(右腸骨)

- A 単純 X 線像。右腸骨に辺縁不明瞭な骨透亮像がみられ、骨内の不均一な骨硬化像も認める。外側骨皮質の不連続性と骨膜反応 (sun-ray appearance 様) がみられる。
- B・C 単純 CT。腸骨外板を中心に悪性を示唆させる骨膜反応 (sun-ray appearance および Codman 三角様) がみられる。
- D 骨シンチグラム。右腸骨に広範に高集積像がみられる。
- E MRI (T1 強調水平断)。髓内および骨外に筋と等信号の病変がみられる。病変は骨膜を大きく越えて骨外腫瘤を形成している。
- F MRI (T2 強調)。病変は不均一な高信号を呈しているが、病変周囲の軟部組織の浮腫状変化は明らかではない。

応の断絶や骨皮質に垂直性(放射性)の骨膜反応は確認されなかった。MRIにおいて、病巣周囲の骨髓の浮腫状変化が全例にみられた。また軟部組織の浮腫状変化が7例にみられた。病巣の骨外への進展は4例にみられたものの、いずれも大きな腫瘤形成には至らなかった。脊椎症例においては長期的観察により椎体高の改善がみられた(図1)。竹盤発生例では経皮的針生検を行った後、病巣の増悪がみられ、仙腸関節の変形が残存している例があった(図2)。橈骨発生例では骨膜反応お

よび骨外軟部組織の浮腫が著しかったが、骨外軟部腫瘤形成はみられなかった(図3)。

Ⅶ. 考 察

骨組織球症との鑑別を要する悪性腫瘍の代表であるユーイング肉腫は臨床所見上、疼痛と腫脹が最も一般的な症状である。さらに発熱(弛張熱、約38℃)、貧血、乳酸脱水素酵素(LDH)上昇、白血球増多、血沈の亢進がしばしばみられる¹³⁾。骨組織球症においても同様の所見が報告される。腫

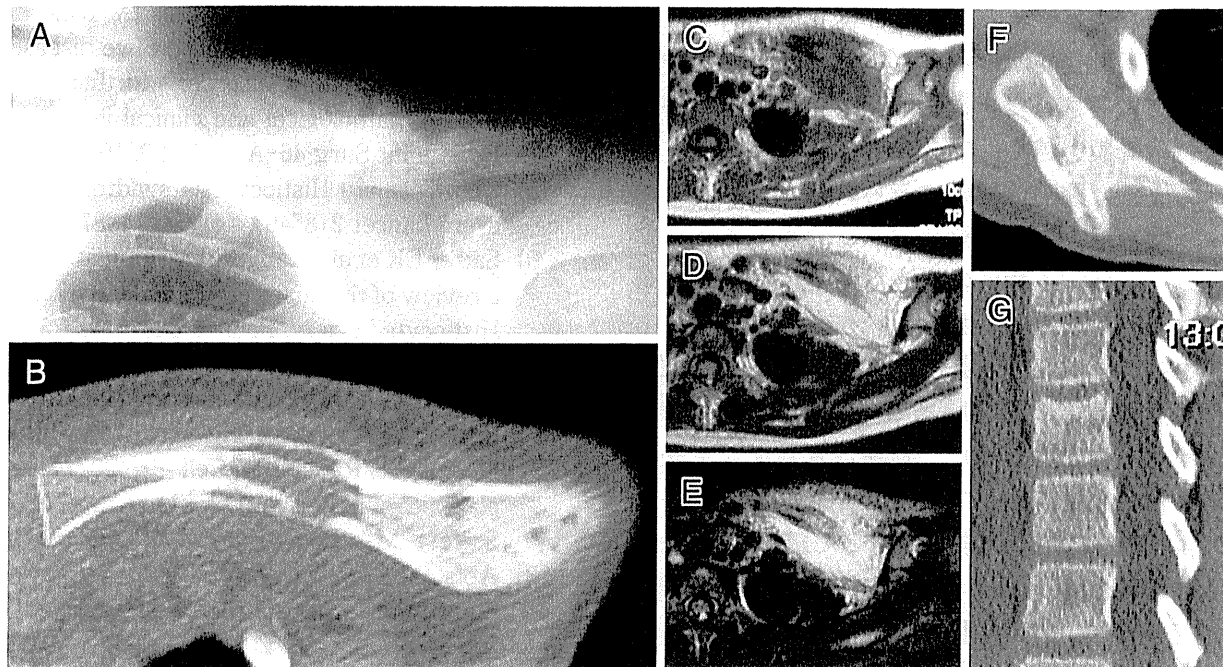


図 8 6歳女児，慢性再発性多巣性骨髄炎（CRMO）（右鎖骨，右肩甲骨，第12胸椎）

検査所見は WBC：5,900，CRP：3.0であった。

- A 単純 X 線像。周囲の骨硬化を伴う虫喰いから地図様の骨透亮像がみられる。
- B 単純 CT。層状の骨膜反応を伴う骨透亮像がみられる。Endosteal scalloping は明らかではない。
- C MRI（T1 強調水平断）。髓内および骨外に等信号の病変がみられる。
- D MRI（T2 強調）。髓内および骨外にびまん性の高信号の病変がみられる。骨外の腫瘍性病変は明らかではない。
- E MRI（T2 脂肪抑制像）病変周囲の軟部組織の浮腫状変化がみられる。
- F 単純 CT。右肩甲骨に骨硬化を伴う虫喰い陰影がみられ，骨膜反応が確認される。
- G 単純 CT 矢状断再構築像。第12胸椎椎体の骨硬化像と頭側の圧潰がみられる。

（MRI は宮城県立こども病院 佐藤 篤先生よりご提供）

脹および発熱の程度はユーイング肉腫より一般に穏やかであり，当科の症例でも 1 例に軽度の発熱（37℃台）をみるにとどまった。Widhe ら²¹⁾ はユーイング肉腫の 64% に動作時痛が，19% に夜間痛が，34% に腫瘤が触知されたと報告している。当科の症例では局所症状としての腫脹については，画像上周圍の炎症，浮腫が強かった急性期の橈骨，鎖骨の 2 例にとどまった（図 3，図 4）。

検査所見では当科の症例では白血球数は 5,300～14,200/mm³（平均 8,900）で，10,000/mm³ 以上はすべて 4 歳以下の小児症例であった。CRP は正常範囲から軽度上昇にとどまり，最高値で 0.9 であった。血液生化学上は，ユーイング肉腫，悪性リンパ腫，骨髄炎などの鑑別すべき疾患

と比べ，炎症所見が比較的軽度であることが特徴と思われた。また他の検査値としては，骨肉腫については ALP 値が（図 5），骨原発悪性リンパ腫については可溶性インターロイキン 2 レセプター（IL-2R）測定が診断に有用であった（図 6）。

画像所見では，Song ら²²⁾ は成人の四肢・骨盤発生の骨組織球症において，骨膜反応を伴う endosteal scalloping および budding appearance が診断に有用であると述べている。骨皮質に垂直性の骨膜反応は骨肉腫やユーイング肉腫に多く確認されるが，骨転移癌においても報告がみられる¹⁶⁾²³⁾。当科の症例では endosteal scalloping は 6 例にみられたが骨膜反応は 2 例にとどまり，骨皮質に垂直性の骨膜反応は確認されなかった。この点は鑑

別上重要な点といえる。MRI では全例に病巣周囲骨髄の浮腫性変化がみられ、骨外軟部組織の浮腫も多数に観察された。骨肉腫やユーイング肉腫のように、骨膜を越え、既存の骨皮質から大きく膨隆するような腫瘍性病巣はみられなかった(図5, 図7)。MRI 上、周囲の浮腫および骨膜を越えて軟部組織へ進展する骨外の大きな腫瘍の有無を確認することが重要と思われた。

他の鑑別として、炎症としては骨髄炎(化膿性、結核性、無菌性)、悪性腫瘍として血液腫瘍(悪性リンパ腫、骨髄腫など)と転移性骨腫瘍が重要と思われる。小児においては神経芽細胞腫の転移、慢性再発性多巣性骨髄炎(以下、CRMO)を特に留意する必要がある。CRMOは当科の症例では単純X線像上、骨組織球症との鑑別が困難であった。CRMOは画像上、周囲の浮腫性変化が強いわりに骨内の腫瘍様病変が明らかではないこと、単純X線像上でendosteal scallopingが見られないことが注目すべき点と思われた(図8)。

生検については急性期において針生検を行った後、さらに骨外に病巣が拡大したため、再度開放生検を行った症例があった(図2)。通常、生検後に病変が沈静化する 경우가多いが、急性期においては、さらに病巣が拡大する可能性があることを十分に念頭に置く必要があると思われた²⁴⁾。

おわりに

骨組織球症は未だに病態が不明な疾患といえるが、本疾患を炎症性肉芽腫疾患の一つとして捉え直し、臨床像、検査所見および画像所見を検討することが、診断への重要なアプローチと思われた。

文 献

- 1) Broadbent V et al : Langerhans cell histiocytosis ; clinical and epidemiological aspects. Br J Cancer Suppl **23** : S11-16, 1994
- 2) Leonidas JC et al : Langerhans' cell histiocytosis. Lancet **361** (9365) : 1293-1295, 2003
- 3) Lichtenstein L : Histiocytosis X ; integration of eosinophilic granuloma of bone, Letterer-Siwe disease, and Schüller-Christian disease as related manifestations of a single nosologic entity. AMA Arch Pathol. **56** : 84-102, 1953
- 4) Lichtenstein L : Histiocytosis X (eosinophilic granuloma of bone, Letterer-Siwe disease, and Schüller-Christian disease) ; further observations of pathological and clinical importance. J Bone Joint Surg **46-A** : 76-90, 1964
- 5) Chu T et al : Histiocytosis syndromes in children. Lancet **2** (8549) : 41-42, 1987
- 6) Satter EK et al : Langerhans cell histiocytosis ; a review of the current recommendations of the Histiocyte Society. Pediatr Dermatol **25** : 291-295, 2008
- 7) Favara BE et al : Contemporary classification of histiocytic disorders. The WHO Committee On Histiocytic/Reticulum Cell Proliferations. Reclassification Working Group of the Histiocyte Society. Med Pediatr Oncol **29** : 157-166, 1997
- 8) Ablu O et al : Langerhans cell histiocytosis ; current concepts and treatments. Cancer Treat Rev **36** : 354-359, 2010
- 9) 石田 剛ほか : Langerhans 細胞組織球症. 非腫瘍性骨関節疾患の病理, 文光堂, 268-277, 2003
- 10) Willman CL et al : Langerhans'-cell histiocytosis (histiocytosis X) ; a clonal proliferative disease. N Engl J Med **331** : 154-160, 1994
- 11) Morimoto A et al : Nationwide survey of single-system single site Langerhans cell histiocytosis in Japan. Pediatr Blood Cancer. **54** : 98-102, 2010
- 12) Arkader A et al : Primary musculoskeletal Langerhans cell histiocytosis in children ; an analysis for a 3-decade period. J Pediatr Orthop **29** : 201-207, 2009
- 13) Campanacci M : Langerhans' cell histiocytosis. Bone and Soft Tissue Tumors, 2nd ed, Springer, 857-876, 1999
- 14) Mirra JM et al : Histiocytoses. Bone Tumors, Lea & Febiger, 1023-1059, 1989
- 15) Kricun ME : Tumors of long bones. Imaging of Bone Tumors, Saunders, 68-75, 1983
- 16) Kricun ME : Parameters of Diagnosis. Imaging of Bone Tumors, Saunders, 2-45, 1983
- 17) Lodwick GS et al : Determining growth rates of focal lesions of bone from radiographs. Radiology **134** : 577-583, 1980
- 18) David R et al : Radiologic features of eosinophilic granuloma of bone. AJR Am J Roentgenol **153** : 1021-1026, 1989
- 19) Azouz EM et al : Langerhans' cell histiocytosis ; pathology, imaging and treatment of skeletal involvement. Pediatr Radiol **35** : 103-



ORIGINAL ARTICLE

Transfection of NF- κ B decoy oligodeoxynucleotide suppresses pulmonary metastasis by murine osteosarcoma

A Nishimura¹, K Akeda¹, T Matsubara¹, K Kusuzaki¹, A Matsumine¹, K Masuda², T Gemba³, A Uchida¹ and A Sudo¹

¹Department of Orthopaedic Surgery, Mie University Graduate School of Medicine, Mie, Japan; ²Department of Orthopaedic Surgery, University of California, San Diego, CA, USA and ³AnGes MG, Osaka, Japan

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) has a pivotal role in the progression and distant metastasis of cancers, including malignant bone tumors. To inhibit NF- κ B activation, a new molecular therapy using synthetic double-stranded oligodeoxynucleotide (ODN) as a 'decoy' *cis* element against NF- κ B has been developed. To determine whether pulmonary metastasis of osteosarcoma is reduced by inhibiting the action of NF- κ B, NF- κ B decoy ODN was transfected into the nuclei of murine osteosarcoma cells with high pulmonary metastatic potential, the LM8 cell line, using a three-dimensional alginate spheroid culture model. An *in vitro* study demonstrated the successful transfection of LM8 cells cultured in alginate beads by 'naked' NF- κ B decoy ODN and that the activation of NF- κ B signaling was significantly suppressed. Tumor growth was not affected by transfection of NF- κ B decoy ODN, however, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) mRNA was markedly decreased. Furthermore, the transfection of 'naked' NF- κ B decoy ODN effectively suppressed pulmonary metastasis in an *in vivo* alginate bead transplantation model. Our results suggest that NF- κ B has a central and specific role in the regulation of tumor metastasis and could be a molecular target for development of anti-metastatic treatments for osteosarcoma.

Cancer Gene Therapy (2011) 18, 250–259; doi:10.1038/cgt.2010.75; published online 24 December 2010

Keywords: osteosarcoma; nuclear factor-kappa B; synthetic double-stranded oligodeoxynucleotide

Introduction

Osteosarcoma is the most common primary malignant tumor of bone in children. Despite multidisciplinary treatments for this tumor, a significant proportion of patients developed pulmonary metastasis and eventually succumbed to the disease. Therefore, there is an urgent need to develop new approaches to suppress the progression to pulmonary metastasis.¹

The transcription factor nuclear factor-kappa B (NF- κ B) is a heterodimeric DNA-binding protein that consists of two major polypeptides, p50 and p65.² In resting cells, NF- κ B is sequestered in the cytoplasm by I κ B proteins. Stimulus-mediated phosphorylation and subsequent proteolytic degradation of I κ B allows the release and nuclear translocation of NF- κ B, where it transactivates several target genes, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), inter-cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), interleukin-1 (IL-1) and matrix metalloproteinases (MMPs).³ As these NF- κ B-related gene expressions

are considered to be involved in a series of sequential steps, including invasion, intravasation, survival in the circulation, adhesion and growth in distant organs, it is generally thought that NF- κ B has an essential role in tumor progression and metastasis.⁴ Increased and aberrant NF- κ B signaling activity has been extensively documented in cancer cells, with implications for cellular proliferation, antiapoptosis, promotion of angiogenesis and metastatic tumor spread.^{5–8} Moreover, blocking the NF- κ B signaling pathway has been reported to inhibit bone metastasis of breast cancer,⁹ and the angiogenesis, invasion and metastasis of prostate cancer¹⁰ and melanoma.¹¹ Importantly, an increased activation of NF- κ B has also recently been identified in a human osteosarcoma cell line and is thought to contribute to the maintenance of a highly proliferative malignant phenotype.^{12–17}

To inhibit NF- κ B activation, a new molecular therapy using synthetic double-stranded oligodeoxynucleotide (ODN) as a 'decoy' *cis* element against NF- κ B has been developed.¹⁸ When the NF- κ B decoy ODN is transfected into cells, it binds competitively to activated NF- κ B and prevents transactivation of the target genes. The NF- κ B decoy ODN strategy has been applied to various diseases, such as re-stenosis after angioplasty or stenting, glomerulonephritis, rheumatoid arthritis and atopic dermatitis (see review¹⁹). In oncology, it has been reported that the intra-tumor injection of NF- κ B decoy ODN inhibited

Correspondence: Dr K Akeda, Department of Orthopaedic Surgery, Mie University Graduate School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu city, Mie 514-8507, Japan.

E-mail: k_akeda@clin.medic.mie-u.ac.jp

Received 2 April 2010; revised 17 July 2010; accepted 26 September 2010; published online 24 December 2010

the cachexia induced by adenocarcinoma²⁰ and that intravenous treatment with NF- κ B decoy ODN inhibited the hepatic metastasis of M5076 reticulosarcoma in mice.²¹ Therefore, we hypothesized that transfection with NF- κ B decoy ODN would suppress the tumor growth and pulmonary metastases of osteosarcoma. Using murine osteosarcoma cells from two metastatic clones, the parental Dunn cell line and its derivative LM8 with greater metastatic potential to the lung,²² we have recently established a novel alginate-encapsulated tumor spheroid model²³ to mimic the *in vivo* microenvironment. The purpose of this study was to examine the effects of NF- κ B decoy ODN on tumor progression and metastasis-related gene expression *in vitro*, as well as pulmonary metastasis *in vivo*, using the LM8 cell line in the alginate-encapsulated tumor spheroid model.

Materials and methods

Three-dimensional alginate spheroid culture

The LM8 murine osteosarcoma cell line, which has a high pulmonary metastatic potential, was used for this study. The LM8 cell line was derived from the original Dunn cell line²⁴ by *in vivo* selection.²² In this study, LM8 cells were seeded at a density of 2.0×10^6 cells in 175 cm^2 culture flasks. When $>90\%$ confluency was reached at day 2, the cells were digested using 0.05% trypsin and encapsulated in 1.2% low-viscosity alginate (Keltone LV; Kelco, Chicago, IL) in 0.15 M sodium chloride (NaCl) at a concentration of 4.0×10^6 cells per ml.²³ Encapsulation was achieved by gently expressing drops of the cell suspension through a 21 gauge needle from a 10 ml syringe into 102 mM calcium chloride; each drop was instantly transformed into a semisolid microspheric bead. After 10 min of incubation to allow further polymerization, the newly formed beads were washed three times with normal saline, followed by one wash with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY) to remove excess calcium chloride. The beads were then cultured in complete medium: DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Gaithersburg, MD) and $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicin (Gibco BRL). The cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% carbon dioxide.

Animals

Five-week-old C3H male mice were purchased from Japan Oriental Yeast (Tokyo, Japan). All mice were housed under specific pathogen-free conditions with a 12-h light and dark cycle. Housing, animal care and experimental protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Mie University.

Transfection of NF- κ B decoy ODN

Phosphorothioate double-stranded ODN, for which sequences have been reported,¹⁸ was used:

NF- κ B decoy ODN: 5'-CCTTGAAGGGATTCCCTCC-3' and 3'-GGAAGGATTCCTAAAG GGAGG-5'.

Scrambled decoy ODN (SCD): 5'-TTGCCGTACCTGACTTAGCC-3' and 3'-AACGGCATGGACTGAATCGG-5'.

The SCD was used as an ODN control. NF- κ B decoy ODN and SCD were provided by AnGes MG (Osaka, Japan). After 24 h of pre-culture in serum-free medium (SFM), naked NF- κ B decoy ODN or SCD were transfected for 4 h into LM8 cells encapsulated in alginate beads as follows: 1. Control (SFM); 2. Scrambled decoy ODN at 100 nM (SCD); 3. NF- κ B decoy ODN at 100 nM (Decoy 100 nM); and 4. NF- κ B decoy ODN at 10 μM (Decoy 10 μM). The beads of all experimental groups were then cultured in DMEM with 10% FBS.

Transfection efficiency

FITC-labeled decoy ODN (1 μM) was used to determine transfection efficiency. FITC-labeled phosphorothioate ODN labeled on the 3' and 5' ends of NF- κ B decoy ODN were provided by AnGes MG. The intensity of fluorescence was observed using confocal microscopy (FLUOVIEW FV1000, Olympus, Tokyo, Japan). Nuclei were counter-stained with propidium iodide (Invitrogen, Carlsbad, CA).

NF- κ B (p65) ELISA

LM8 cells were serum-starved for 24 h and treated with SFM, SCD, decoy 100 nM and decoy 10 μM for 4 h. The original Dunn cell line was used as a control (in SFM). To extract LM8 and Dunn cells from the alginate beads, each treatment group of 100 beads was dissolved with dissolving buffer (0.15 M NaCl, 30 mM l^{-1} ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 55 mM sodium citrate; pH 6.8) at 4°C for 10 min with gentle shaking. The cells were recovered by centrifugation at 100 g for 5 min.²⁵ The cells were then resuspended in hypotonic buffer (Active Motif, Carlsbad, CA), and the cytoplasmic fraction was isolated by centrifugation (14 000 g, 4°C). The nuclear fraction was separated by resuspending the residual pellet in complete lysis buffer (Active Motif) followed by centrifugation (14 000 g, 4°C). The binding of NF- κ B p65 subunits to the NF- κ B binding consensus sequence 5'-GGGACTTCC-3' of the nuclear fraction was measured using a TransAM NF- κ B enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Active Motif) according to manufacturer's instructions.²⁶ The activated NF- κ B (p65 subunits) in the nuclear fraction, which was bound to 96-well microtiter plates coated with an oligonucleotide containing the NF- κ B binding consensus sequence, was detected by an anti-p65 subunit antibody followed by the addition of a horseradish peroxidase conjugated secondary antibody and measured spectrophotometrically (Multiskan JX; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at 450 nm wavelength with a reference wavelength of 650 nm.

Cell proliferation assay

The bromodeoxyuridine (BrdU) assay (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric), Roche, Penzberg, Germany) was used to evaluate the effect of NF- κ B decoy ODN on

cell proliferation of LM8 osteosarcoma cells *in vitro*. Cells cultured in alginate beads following 4 h of transfection were incubated in 12-well plates (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Tokyo, Japan) at 100 beads per 2 ml DMEM supplemented with 10% FBS and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicin at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 24 h. The alginate beads were then separated into 96-well microtiter plates (CELLSTAR, Greiner Bio-One) with three beads in 200 μl of medium per well ($n=10$). BrdU labeling solution (20 μl per well) was added. After 8 h, the supernatant was discarded and the beads were dissolved with 200 μl dissolving buffer per well at 4 °C for 20 min. The plate was centrifuged at 300 g for 10 min and the medium was removed, and the samples were stored at -20 °C until used. This procedure was repeated daily from day 2 to day 7 of culture. According to the manufacturer's instructions, metabolic activity was measured using an ELISA plate reader at 450 nm wavelength with a reference wavelength of 650 nm.

RNA extraction and cDNA synthesis for quantitative real-time PCR

Alginate beads containing LM8 cells were treated with SFM, SCD, decoy 100 nM and decoy 10 μM for 4 h and cultured with SFM for 24 h. To extract LM8 cells from the alginate beads (each group of 100 beads), the beads were dissolved with dissolving buffer at 4 °C for 10 min with gentle shaking,²⁷ and the LM8 cells were separated by mild centrifugation. The pellet (containing LM8 cells) was washed three times with cold PBS. RNA was isolated using RNeasy-4PCR kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed by oligo (dT) 15 priming from 1 μg of total RNA using a cDNA synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocols. The cDNA was subjected to real-time PCR quantitative-PCR using the ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). TaqMan PCR was performed in 25 μl volumes using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). TaqMan probe/primers specific for glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; code number Ma99999915_g1), VEGF (code number Ma00437304_al) and ICAM-1 (code number Ma00516023_al) were purchased from TaqMan Assays-on-Demand Gene Expression Products (Applied Biosystems). All PCR assays were performed in triplicate. The reaction conditions were 50 °C for 2 min; 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s (denaturation) and 60 °C for 1 min (annealing and elongation). The reaction mixture without cDNA was utilized as a control. Threshold cycle numbers (CT) were determined with an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (version 1.1 software). GAPDH was used as the house-keeping gene for an internal control. Each mRNA level was divided by the GAPDH level of each sample.²⁸ The levels were expressed as an x-fold induction compared with control group. All samples were analyzed in triplicate.

Cell detachment assay

One bead containing either the Dunn or LM8 cell line was cultured in 100 μl of DMEM with 10% FBS ($n=10$) in a 96-well plate (CELLSTAR, Greiner Bio-One) for 24 h, following which the bead was transferred to a new well. The number of cells that detached from the alginate bead and adhered to the bottom of the culture plate during the next 24-h culture period was determined. The adhered cells were fixed in 4% paraformaldehyde, stained with Hematoxylin and manually counted under a light microscope. This assay was repeated daily until day 7 of culture.

In vivo study

Five-week-old male C3H mice ($n=40$) were used to estimate the *in vivo* pulmonary metastatic potential.²³ Mice were divided into four experimental groups with 10 mice in each group. The mice were anesthetized with ketamine (80 mg kg⁻¹) and xylazine (7 mg kg⁻¹). In each experimental group, five alginate beads containing LM8 cells ($\sim 2.0 \times 10^5$ cells) pre-transfected with NF- κ B decoy ODN (100 nM, 10 μM) or SCD were transplanted subcutaneously into the dorsal skin of mice through a 5 mm longitudinal skin incision. After transplantation of the beads, the skin was closed with No. 5-0 vicryl sutures. Weight and tumor volume, calculated as (minor axis)² \times (major axis)/2 mm³ were measured every other day. After killing the mice on day 35, the lungs were removed, fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 μm) were cut and stained with Hematoxylin-Eosin. On the maximal area of thin sections of each tissue, the number of metastatic tumor nodules was counted microscopically.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm s.d. The association among the variables was determined by one way ANOVA with Fisher's PLSD *post hoc* test using Stat-view software (Abacus Concepts, Berkeley, CA). A *P* value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Distribution of FITC-labeled decoy ODN

We first examined the presence and distribution of 'naked' NF- κ B decoy ODN in murine osteosarcoma. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled decoy ODN was used to evaluate the transfection efficiency of 'naked' NF- κ B decoy ODN in the three-dimensional alginate culture system. After a 4-h transfection of FITC-labeled decoy ODN, confocal analysis revealed that the FITC-fluorescence was distributed in a punctuate pattern throughout the nuclei of LM8 cells (Figure 1). FITC-fluorescence was seen in the nuclei of all cells within the alginate beads, including those of dividing cells (Figures 1d-f). FITC-fluorescence was equally distributed to all LM8 cells within the alginate beads.

NF- κ B DNA-binding capacity

To evaluate the inhibitory effect of NF- κ B decoy ODN on activation of NF- κ B in the LM8 cell line, the