

図2 第15回全国原発性肝癌追跡調査(1988~1999年)による肝細胞癌肝切除症例: 肝障害度別累積生存曲線(文献1から引用)

87.4%, 69.0%, 52.3%であり, 肉眼的進行度別累積5年生存率はStage I : 72.6% (n=2,546), Stage II : 59.9% (n=8,455), Stage III : 40.2% (n=4,191), Stage IV-A : 24.2% (n=1,184), Stage IV-B : 13.6% (n=215)であった(図1).

また, 肝障害度別の5年生存率は肝障害度A : 57.2% (n=13,020), 肝障害度B : 45.5% (n=6,006), 肝障害度C : 33.6% (n=741)であり(図2), 肉眼的進行度, 肝障害の進行に伴い生存率が低下した。しかし, HBsAg陽性例とHCV陽性例との比較では5年生存率はそれぞれ54.1%, 53.7%で差は認めていない。

1. 小肝癌に対する外科切除の予後

日本肝癌研究会では, 2000年に5cm以下の肝細胞癌の初回治療として肝切除, PEI, TAEが行われた症例について治療法別の予後を, 腫瘍径2cm以下と2~5cm, 腫瘍個数を1個, 2個, 3個以上に分けて障害度別に比較検討している¹³⁾。この報告では調査対象症例が1988年から1996年の新規登録症例のためMCTは検討対象から除かれている。

Stage Iに相当する単発・2cm以下の血管侵襲

を伴わない肝細胞癌では, 肝障害度Aで肝切除(5年生存率: 71.5%), PEI(5年生存率: 54.2%), TAE(5年生存率: 31.3%)の順に予後が良好であり, 肝障害度Bでは肝切除(5年生存率: 54.7%)はTAEに比較し予後は良好であるがPEIと差は認められず, 肝障害度Cでは治療法による予後の差は認められなかった。また, 腫瘍数2個以上では治療法(TAEは検討対象外)による差はなかったとしている。

一方, 2cm以上5cm未満の単発腫瘍ではどの肝障害度においてもPEIに比較し肝切除の予後が良好であり, 2個以上になると肝障害度A, Cでは差は認められなかったが, 肝障害度Bでは肝切除が良好であったと報告している。最近の内科的局所療法は局所制御能の優位性からRFAが積極的に行われているが, 追跡期間が短い肝切除と長期成績を比較するまでには至っていない。

2. 進行肝細胞癌に対する外科切除の予後

5cm以上の肝細胞癌について関ら¹⁴⁾の多施設調査では, 単発肝細胞癌の58%(307/527例)に肝切除が施行されているが, 内科的局所療法はわずか2%(10/527例)の症例に施行されているにすぎ

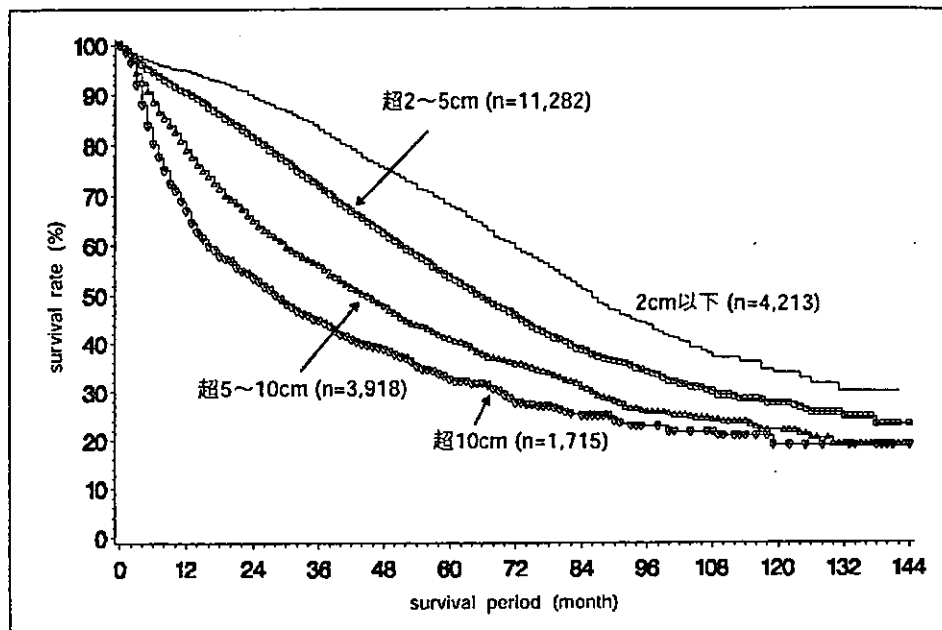


図3 第15回全国原発性肝癌追跡調査(1988~1999年)による肝細胞癌肝切除症例: 最大腫瘍径別累積生存曲線(文献1から引用)

ない。これは一般的に内科的局所療法では5cm以上の腫瘍を完全壊死させることが困難であり、適応外としている施設が多いためと考えられる。図3に第15回全国原発性肝癌追跡調査報告¹⁾による肝切除症例における腫瘍径別生存率を示した。最大腫瘍径5~10cm, 10cm超の肝切除の5年生存率はおのおの40.7%, 32.3%であった。

進行肝細胞癌のもう一つの要素として脈管侵襲がある。筆者らは門脈・肝静脈腫瘍栓肝癌切除例で少ないながらも長期生存例を得ている。門脈腫瘍栓の進展度については門脈一次分枝までであっても本幹まで進展していても生存率に差を認めていない⁸⁾。Ohkuboら¹⁵⁾は二次分枝までの門脈腫瘍栓切除例の5年生存率は23.9%, Minagawaら¹⁶⁾は術前TAEが有効であった二次分枝までの門脈腫瘍栓切除例の5年生存率は42%と報告している。また, Sakonら¹⁷⁾はインターフェロンアルファ(INF- α)+5-FU, Fukudaら¹⁸⁾はCDDP+5-FUの動注化学療法と肝切除を併用した集学的治療法の有用性を報告している。

一方, 肝静脈腫瘍栓症例では, 腫瘍栓が肝静脈にとどまるものについては長期生存例が得られて

いるが, 下大静脈にまで至ると予後はきわめて不良であり, 下大静脈腫瘍栓合併症例に対する外科治療の位置づけは現在のところ症状改善のための姑息療法である。また, “Icteric HCC” と呼称される胆管腫瘍栓症例はきわめて予後不良とされてきたが, このような症例も減黄術が有効で, 肝機能が改善すれば切除により長期生存例が得られている¹⁹⁾。

■ ■ ■

術後合併症, 手術死亡

術後合併症の発症率は低くはないが, 多くは胸水貯留, 腹水貯留, 胆汁漏や腹腔内感染などであり, 術後肝不全などの重篤な合併症は回避できるようになった。手術死亡は年々減少しており, 日本肝癌研究会追跡調査報告では1980~1981年は7.9%(49/619例)²⁰⁾であったものが, 1988~1989年では3.0%(66/2,180例)²¹⁾, 1998~1999年では0.9%(49/5,217例)¹⁾と著明に減少している。

■ ■ ■

術後の再発予防対策

肝細胞癌の肝切除後の5年再発率は約80%と報告されており, 予後改善のためには再発予防対

策がきわめて重要である。これまでランダム化比較試験において再発予防対策としてインターフェロンアルファ (INF- α)²²⁾, 免疫療法²³⁾, 非環式レチノイド²⁴⁾などが有効と報告されている。今後、大規模な比較試験の結果が期待される。

■□■

おわりに

術前の肝機能評価に基づく手術適応と術式の選択, 手術手技の改善, 周術期管理の向上により, 肝細胞癌の外科的治療は安全に行えるようになってきた。単発肝細胞癌の成績は良好で, 積極的な外科治療が望まれる。脈管侵襲症例では肝切除と術前・術後の補助療法を合わせた集学的治療が重要である。

文 献

- 1) 日本肝癌研究会：第15回全国原発性肝癌追跡調査報告 (1998-1999)。日本肝癌研究会事務局, 2002
- 2) 日本肝癌研究会：臨床・病理原発性肝癌取扱い規約, 第4版。金原出版, 2000
- 3) Kwon AH, Ha-Kawa SK, Uetsuji S, et al : Preoperative determination of the surgical procedure for hepatectomy using technetium-99m-galactosyl human serum albumin (99mTc-GSA) liver scintigraphy. *Hepatology* 25 : 426-429, 1997
- 4) Makuuchi M, Hasegawa H, Yamazaki S : Ultrasonically guided subsegmentectomy. *Surg Gynecol Obstet* 161 : 346-350, 1985
- 5) Takasaki K, Kobayashi S, Tanaka S, et al : Highly anatomically systematized hepatic resection with Glissonian sheath code transection at the hepatic hilus. *Int Surg* 75 : 73-77, 1990
- 6) Yamaoka Y, Ozawa K, Tanaka A, et al : New devices for harvesting a hepatic graft from a living donor. *Transplantation* 52 : 157-60, 1991
- 7) Yamamoto Y, Ikai I, Kume M, et al : New simple technique for hepatic parenchymal resection using a Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator and bipolar cautery equipped with a channel for water dripping. *World J Surg* 23 : 1032-1037, 1999
- 8) Ikai I, Yamaoka Y, Yamamoto Y, et al : Surgical intervention for patients with stage IV-A hepatocellular carcinoma without lymph node metastasis : proposal as a standard therapy. *Ann Surg* 227 : 433-439, 1998
- 9) Imamura H, Shimada R, Kubota M, et al : Preoperative portal vein embolization : an audit of 84 patients. *Hepatology* 29 : 1099-1105, 1999
- 10) Yamanaka N, Okamoto E, Toyosaka A, et al : Prognostic factors, after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 65 : 1104-1110, 1990
- 11) Imamura H, Matsuyama Y, Miyagawa Y, et al : Prognostic significance of anatomical resection and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 86 : 1032-1038, 1999
- 12) Okada S, Shimada K, Yamamoto J, et al : Predictive factors for postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 106 : 1618-1624, 1994
- 13) Arii S, Yamaoka Y, Futagawa S, et al : Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas : a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Hepatology* 32 : 1224-1229, 2000
- 14) 関 寿人, 大崎往夫, 春日井博志, 他 : 多施設 (18施設) 調査に基づく単発肝細胞癌の治療成績の現状. *肝臓* 41 : 169-182, 2000
- 15) Ohkubo T, Yamamoto J, Sugawara Y, et al : Surgical results for hepatocellular carcinoma with macroscopic portal vein tumor thrombosis. *J Am Coll Surg* 191 : 657-660, 2000
- 16) Minagawa M, Makuuchi M, Takayama T, et al : Selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus. *Ann Surg* 233 : 379-384, 2001
- 17) Sakon M, Nagano H, Dono K, et al : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94 : 435-442, 2002
- 18) Fukuda S, Okuda K, Imamura M, et al : Surgical resection combined with chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombus : report of 19 cases. *Surgery* 131 : 300-310, 2002
- 19) Satoh S, Ikai I, Honda G, et al : Clinicopathologic evaluation of hepatocellular carcinoma with bile duct thrombi. *Surgery* 128 : 779-783, 2000
- 20) 日本肝癌研究会：原発性肝癌に関する追跡調査—第6報—。 *肝臓* 26 : 254-262, 1985
- 21) 日本肝癌研究会：原発性肝癌に関する追跡調査—第10報—。 *肝臓* 34 : 805-813, 1993
- 22) Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, et al : Randomized clinical trial of long-term outcome after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma by postoperative interferon therapy. *Br J Surg* 89 : 418-422, 2002
- 23) Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, et al : Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, poly-prenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* 334 : 1561-1567, 1996
- 24) Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, et al : Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma : a randomised trial. *Lancet* 356 : 802-807, 2000

(IKAI Iwao, et al 京都大学大学院医学研究科消化器外科 : 606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54)

外科治療

猪飼伊和夫*¹・新田隆士*²・田浦康二郎*²・藤井英明*²
上杉毅彦*²・波多野悦朗*²・鳶原康行*³

abstract

肝癌に対する肝切除は腫瘍の局所制御能の観点からみると最も優れている。小肝癌で切除範囲にかかわらず治癒切除が可能な症例においては、術前肝機能評価に重点を置いて術式を決定する必要がある。進行肝癌では、術前の肝機能評価に加えて腫瘍による要因を考慮に入れて肝切除の適応および術式を決定する。第15回全国原発性肝癌追跡調査報告によると1998～1999年の手術施行率は29.2%、肝切除全例の5年生存率は52.3%、手術死亡は0.9%であり、肝切除は安全に行えるようになり治療成績も向上してきた。しかし、再発率はきわめて高く、術後の全身化学療法の有効性は低い。今後術後の多中心性再発予防に対するインターフェロン療法や肝内転移に対する局所化学療法などによる対策が重要な課題である。また、進行肝癌における肝切除を中心とした集学的治療法の確立が望まれる。

I はじめに

肝細胞癌（肝癌）に対する肝切除は腫瘍の局所制御能の観点からみると最も優れているが、経皮的局所療法や肝動脈塞栓療法（TAE）と比較し侵襲は大きく、肝機能障害の程度によっては手術適応とならないことも多い。手術適応は肝機能と腫瘍の進行度によって決定される。

II 肝機能評価

肝障害を伴う肝癌外科治療の適応決定において、術前肝機能評価がきわめて重要である。小肝癌で切除範囲にかかわらず治癒切除が可能な場合には術前肝機能評価に重点を置いて適応と術式を決定する必

要がある。本邦では肝機能評価法として原発性肝癌取扱い規約¹⁾の肝障害度分類を用いている場合が多い。一般的には肝障害度Cは緊急症例を除き外科治療の適応外であり、軽度または中等度までの肝障害である肝障害度A, Bが手術適応となる。Midorikawaら²⁾は肝障害度分類に用いられる因子のなかで腹水、血清ビリルビン値、ICG R₁₅の3項目に重点を置いた肝切除の術式選択を提唱している。この基準は腫瘍による残肝機能への影響が考慮されていないため小肝癌の場合には有用であるが、腫瘍径が大きい場合には必ずしもこの基準ののりする必要はない。

近年の画像診断の進歩によりCT画像から肝容積の計測が容易となり、腫瘍径が大きい場合には、術前の肝機能評価に加えて腫瘍容積を考慮に入れて肝切除の適応の拡大が図られている。図1に提示した症例は肝S8を主座とする径約10cmの肝癌症例で、全肝容積1,747cm³、肝外側区域容積282cm³であり、単純計算すると肝右三区域切除時の全肝容積に対す

*1 京都大学大学院医学研究科消化器外科 講師
*2 同
*3 同 助教授

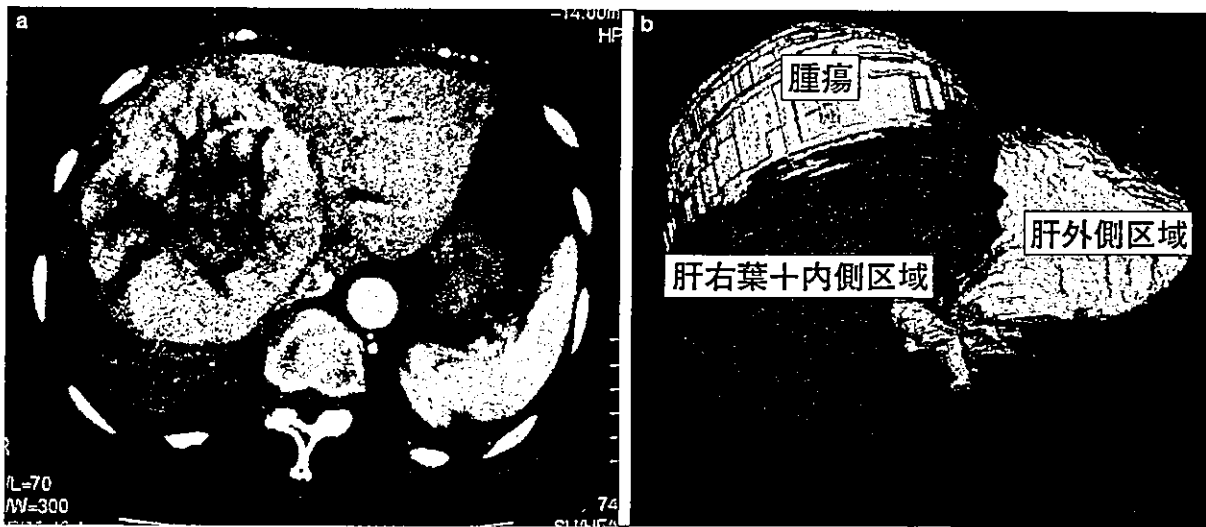


図1 肝細胞癌症例CT (a) およびCT3次元画像 (b)
 CT画像から全肝容積1,747cm³、肝外側区域容積282cm³、腫瘍容積927cm³と算出された。肝右三区域切除時の全肝容積に対する残肝容積の割合は16%となり、全肝容積から腫瘍容積を除いた機能的全肝容積に対する残肝容積の割合は34%であった。

る残肝容積の割合は16%であるが、全肝容積から腫瘍容積927cm³を除いた機能的全肝容積に対する残肝容積の割合は34%となり、肝右三区域切除術が安全に施行可能であった。また、Yamamotoら³⁾はKICGと、残肝容積と機能的全肝容積の比から術式を選択するのがよいとしている。

Ⅲ 肝癌に対する手術適応の拡大の工夫

肝切除の術式についてはすでに本邦から多くの報告がなされている。代表的な手術術式として、Makuuchiら⁴⁾による担癌門脈領域の切除を行う肝垂区域切除術、Takasakiら⁵⁾による担癌区域の肝流入血行遮断を行う肝門部グリソン一括処理による肝切除術、Yamaokaら⁶⁾による肝流入血行非遮断肝切除術などが挙げられる。その他にも間欠的全肝血行遮断 (Pringle氏法) の有用性や多くの手術術式に関する報告がなされており、肝切除の術式はほぼ確立されたと考えられる。

肝切除適応の拡大のために術前に切除側門脈を塞栓し、切除前に残存予定肝の再生を期待する術前門脈塞栓術を行っている施設もある。Imamuraら⁷⁾は門脈右枝の塞栓により肝左葉容積は137%に増大したと報告している。ただし、障害肝においては正常

肝と比較し非塞栓側肝臓の代償性肥大に時間を要することに注意が必要である。同様の考え方は門脈腫瘍栓を伴う症例について拡大できる。われわれは血管侵襲症例 (Vp3またはVv2以上) の90%以上に肝葉以上の切除を施行しており、ICG R₁₅別にみるとICG R₁₅が15%以上の症例は約40%、25%以上は約20%を占めている⁸⁾。これは腫瘍栓により血流の途絶した領域の肝機能が低下していることによる。このように進行肝癌では術前肝機能評価に加えて、術式の工夫や血行動態の変化を考慮して適応の拡大が諮られている。

第15回全国原発性肝癌追跡調査報告⁹⁾によると1998~1999年の手術施行率は29.2%であり、手術死亡は0.9%であった。

Ⅳ 手術成績

第15回全国原発性肝癌追跡調査報告⁹⁾では肝切除全例の5年生存率は52.3%であった。肉眼的進行度別5年生存率はStage I : 72.6%、Stage II : 59.9%、Stage III : 40.2%、Stage IV-A : 24.2%、Stage IV-B : 13.6%であり (図2)、また、肝障害度別の5年生存率は肝障害度A : 57.2%、肝障害度B : 45.5%、肝障害度C : 33.6%であった。肉眼的進行度、肝障害

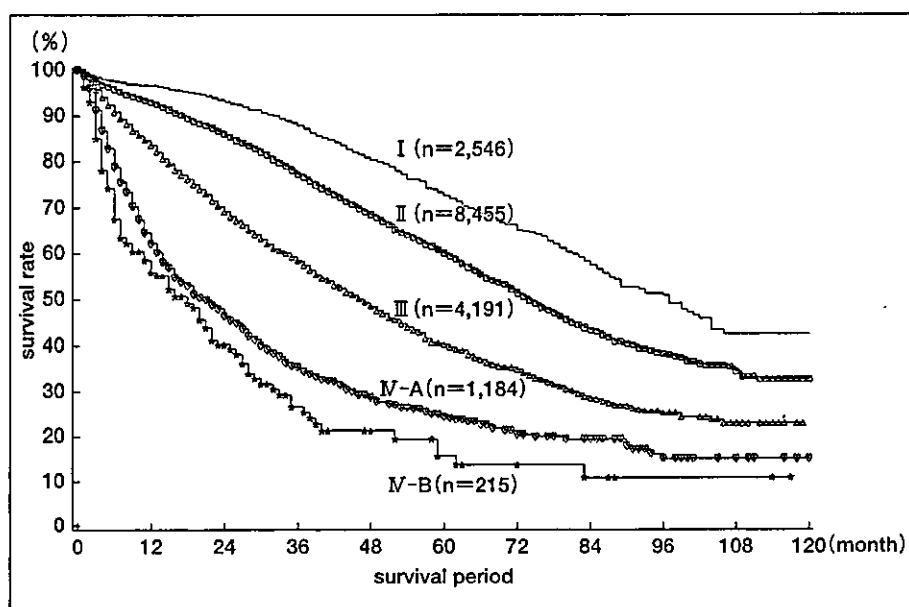


図2 第15回全国原発性肝臓追跡調査(1988-1999)による肝細胞癌肝切除症例Stage別累積生存曲線 [文献9]から引用)

度の進行に伴い生存率が低下している。

1) 小肝癌

Ariiら¹⁰⁾によるとStage I 肝癌では肝障害度Aで肝切除5年生存率：71.5%であり、これは経皮的エタノール注入療法(5年生存率：54.2%)、TAE(5年生存率：31.3%)に比較して良好である。最近では局所療法としてラジオ波焼灼療法(RFA)が積極的に行われているが、追跡期間が短いためまだ長期成績を肝切除と比較するまでには至っていない。今後は小肝癌に対する治療選択のために肝切除とRFAの治療成績の比較が課題である。

2) 進行肝癌

腫瘍径の大きい場合、肝癌は経皮的局所療法の適応ではない。関ら¹¹⁾は単発肝癌の多施設調査では、5cm以上の肝癌について58%に肝切除が施行されているが、局所療法はわずか2%の症例に施行されているにすぎないと報告している。第15回全国原発性肝臓追跡調査報告⁹⁾では最大腫瘍径5~10cm、10cm超の肝切除の5年生存率はおのおの40.7%、32.3%であった。

進行肝癌のもう一つの要素として脈管侵襲がある。門脈腫瘍栓合併肝癌はTAEや肝移植の適応外である。われわれは門脈・肝静脈腫瘍栓肝癌切除例で長期生存例を得ており(5年生存率：7.7%)⁸⁾、腫瘍栓の進展度については門脈一次分枝までであっても

本幹まで進展していても生存率に差を認めていない。

V 今後の課題

1) 小肝癌

肝癌の再発率はきわめて高く、5年で約80%である。前記のようにStage Iにおいても5年生存率は71.5%である。それ以後も生存率は低下し10年生存率は43.0%と報告されており、他の悪性疾患のStage Iに比較すると決して良好とはいえない。したがって予後改善のためには再発予防対策がきわめて重要な課題である。

術後早期再発は肝内転移と多中心性発生の混合であり、後期は多中心性発生が主となると考えられる。これまで再発予防として術後全身化学療法が試みられてきた。肝機能良好例では有用であったとの報告がみられるが、逆に肝機能を悪化させ予後が不良となったとの報告もあり、一定の見解を得るには至っていない。化学療法以外には術後の二次発癌予防として無作為比較試験でインターフェロン(IFN)- α ¹²⁾、免疫療法¹³⁾、非環式レチノイド¹⁴⁾などが有効と報告されている。IFN療法はC型肝炎からの発癌抑制効果が報告されており¹⁵⁾、再発予防にも効果が期待される。しかし、前記の無作為比較試験は少数例の

単報であり、標準治療とするためには今後これらの報告に基づいた大規模な比較試験による検討が必要であると考えられる。

2) 進行肝癌

進行肝癌の治療成績の改善を目指してこれまで術前TAEが試みられてきた。腫瘍壊死や縮小効果により進行肝癌で切除率を向上させる可能性はあるが、予後改善効果は少ないと報告されている。また、脈管侵襲を伴う肝癌は肝切除にて長期生存率は得られているものの決して良好な成績とはいえない。Minagawaら¹⁶⁾は術前TAEが有効であった二次分枝までの門脈腫瘍栓切除例の5年生存率は42%で、無効例の生存率はきわめて不良であり、外科治療の適応決定に有用であると報告している。

最近では、脈管侵襲進行肝癌に対する肝動脈注入化学療法が注目されており、Andoら¹⁷⁾は低用量シスプラチン+フルオロウラシル (5-FU) の有効性を、Sakonら¹⁸⁾はIFN併用5-FU持続動注により高い奏効率と少数例ながらも腫瘍の消失例を報告している。今後このような肝動脈注入化学療法プロトコルを用いた術後再発予防や、切除不能肝癌のdown stagingによる肝切除の適応拡大が期待される。今後、予後改善のためには肝切除を中心とした集学的治療法の確立が必要である。

VI おわりに

肝癌の外科的治療は比較的安全に行えるようになり、治療成績も向上してきた。今後は小肝癌、進行肝癌ともに再発予防対策が重要な課題である。

参考文献

- 1) 日本肝癌研究会：臨床・病理原発性肝癌取扱い規約，第4版，金原出版，東京，2000
- 2) Midorikawa Y, Kubota K, Takayama T, et al : A comparative study of postoperative complications after hepatectomy in patients with and without chronic liver disease. *Surgery* 126 : 484~491, 1999
- 3) Yamamoto Y, Ikai I, Kume M, et al : New simple technique for hepatic parenchymal resection using a Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator and bipolar cautery equipped with a channel for water dripping. *World J Surg* 23 : 1032~

- 1037, 1999
- 4) Makuuchi M, Hasegawa H, Yamazaki S : Ultrasonically guided subsegmentectomy. *Surg Gynecol Obstet* 161 : 346~350, 1985
- 5) Takasaki K, Kobayashi S, Tanaka S, et al : Highly anatomically systematized hepatic resection with Glissonian sheath code transection at the hepatic hilus. *Int Surg* 75 : 73~77, 1990
- 6) Yamaoka Y, Ozawa K, Tanaka A, et al : New devices for harvesting a hepatic graft from a living donor. *Transplantation* 52 : 157~160, 1991
- 7) Imamura H, Shimada R, Kubota M, et al : Preoperative portal vein embolization : an audit of 84 patients. *Hepatology* 29 : 1099~1105, 1999
- 8) Ikai I, Yamaoka Y, Yamamoto Y, et al : Surgical intervention for patients with stage IV-A hepatocellular carcinoma without lymph node metastasis : proposal as a standard therapy. *Ann Surg* 227 : 433~439, 1998
- 9) 日本肝癌研究会：第15回全国原発性肝癌追跡調査報告 (1998-1999), 日本肝癌研究会事務局, 京都, 2002
- 10) Arai S, Yamaoka Y, Futagawa S, et al : Results of surgical and nonsurgical treatment for small-sized hepatocellular carcinomas : a retrospective and nationwide survey in Japan. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Hepatology* 32 : 1224~1229, 2000
- 11) 関 寿人, 大崎往夫, 春日井博志・他 : 多施設 (18施設) 調査に基づく単発肝細胞癌の治療成績の現状. *肝臓* 41 : 169~182, 2000
- 12) Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, et al : Randomized clinical trial of long-term outcome after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma by postoperative interferon therapy. *Br J Surg* 89 (4) : 418~422, 2002
- 13) Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, et al : Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rates of hepatocellular carcinoma : a randomised trial. *Lancet* 356 : 802~807, 2000
- 14) Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, et al : Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyphenolic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* 334 : 1561~1567, 1996
- 15) Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, et al : Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma : national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy. *Ann Intern Med* 131 (3) : 174~181, 1999
- 16) Minagawa M, Makuuchi M, Takayama T, et al : Selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus. *Ann Surg* 233 : 379~384, 2001
- 17) Ando E, Tanaka M, Yamashita F, et al : Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis : analysis of 48 cases. *Cancer* 95 (3) : 588~595, 2002
- 18) Sakon M, Nagano H, Dono K, et al : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94 : 435~442, 2002

特集

肝切除における血管合併切除とその成績

Ⅲ. 血管合併切除の長期予後と予後からみた手術適応

2. 肝静脈・下大静脈腫瘍栓合併肝細胞癌*

猪飼伊和夫
上杉毅彦

田浦康二郎
波多野悦朗

藤井英明
鳶原康行**

【要旨】肝静脈腫瘍栓は門脈腫瘍栓より少なく、肝切除時に肝静脈腫瘍栓が認められた症例は5.5%、下大静脈まで腫瘍栓が進展した症例はわずかに0.5%である。また門脈腫瘍栓を合併することが多い。下大静脈腫瘍栓症例は腫瘍栓の存在部位により手術術式がかわるため、術前診断がきわめて重要である。再発は肝内転移がもっとも頻度が高いが、遠隔転移も少なくない。肝静脈腫瘍栓の予後は不良で、肝内転移および遠隔転移に対する治療法の確立が望まれる。

はじめに

肝細胞癌は進行すると門脈や肝静脈・下大静脈、胆管に腫瘍栓を伴うことが特徴である。肝静脈腫瘍栓の頻度は門脈腫瘍栓より少なく、第15回全国原発性肝癌追跡調査によると画像診断で肉眼的に肝静脈に腫瘍栓が認められた症例(V_{V1-3})は5.4%であった¹⁾。また、全肝切除例の中で肝静脈腫瘍栓陽性例は5.5%であり、肝静脈本幹に腫瘍栓を認めた症例(V_{V2})は1.9%、下大静脈まで腫瘍栓が進展した症例(V_{V3})はわずかに0.5%であったと報告されている。通常、下大静脈腫瘍栓症例は手術適応外とされることが多いが、非手術症例

の予後はきわめて不良である。われわれはこのような肝静脈・下大静脈腫瘍栓症例に対して予後の改善を目指して外科的切除を含めた集学的治療を施行してきた^{2,3)}。

本稿では、肝静脈・下大静脈腫瘍栓合併肝細胞癌について述べる。

I. 肝静脈・下大静脈腫瘍栓と手術術式

肝静脈腫瘍栓はおもにCT・MRIなどから診断可能であるが、短肝静脈腫瘍栓は下大静脈にまで進展しない限り術前診断は困難である。腫瘍栓が肝静脈内にとどまるV_{V2}までの症例では、たとえ腫瘍栓が肝静脈根部まで達していても、肝右葉切除や肝拡大左葉切除などの術式で腫瘍ととも肝静脈を切除することにより腫瘍栓を合併切除することが可能である。しかし、腫瘍栓が肝静脈・短肝静脈から下大静脈や右心房に進展した症例においては定型的肝切除術で腫瘍栓を切除することはできない。また、腫瘍栓の先進部により術式が大きくかわるため、通常の画像診断に加えてCT・

キーワード：肝細胞癌，肝静脈，下大静脈，腫瘍栓

- * Results of hepatic resection for hepatocellular carcinoma with tumor thrombus in the hepatic vein and the inferior vena cava
- ** I. Ikai (講師), K. Taura, H. Fujii, T. Uesugi, E. Hatano, Y. Shimahara (助教授): 京都大学大学院医学研究科消化器外科.



図1. 症例1. 46歳, 男
肝後区域を主座とする混合型肝癌で, 切除標本において組織学的に下大静脈に直接浸潤を認める.

MRIの冠状断画像や心臓USなどを用いて腫瘍栓の存在部位を正確に診断する必要がある.

腫瘍栓が腹部下大静脈にとどまる場合には肝上・下部下大静脈および肝十二指腸靱帯を確保し, 全肝血行遮断することにより腫瘍栓を摘出できる. われわれは1980年代には静-静脈(V-V)バイパスを用い全肝血行遮断下に下大静脈を切開し腫瘍栓を摘出していた⁴⁾. しかし, 腫瘍栓は下大静脈の静脈壁と線維性に癒着することはあるが血管内膜に浸潤することはまれで, 血管合併切除の必要性は低く, 腫瘍栓のみを摘出可能であり全肝血行遮断の時間も短時間で終了することが明らかとなった. そこで1991年以降は, 下大静脈を一時的に遮断し血圧が80 mmHg以下に低下する場合には, 輸液により血圧が維持されるまで循環血液量を増加させた後にV-Vバイパスを用いず単純全肝血行遮断のみで腫瘍栓を摘出している. 腫瘍栓が胸部下大静脈・右心房に進展する場合には胸骨を縦切開し右心房下部にて血行遮断を行う必要がある. さらに三尖弁下端より頭側に腫瘍栓が進展する場合には血行遮断することは困難で, 人工心肺を用いた開心術下に腫瘍栓を摘出しなければならない. このような手術は侵襲度が飛躍的に大きくなり, さらに人工心肺を用いる場合には抗凝固薬の大量投与を必要とするため術後出血の危険性も高い. このように下大静脈腫瘍栓の存在部

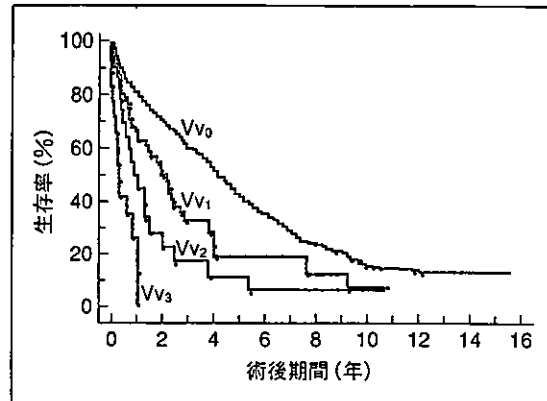


図2. 当科におけるStage IV-Bを除いた初回手術例の肝静脈腫瘍栓の治療成績(1985～2001年)【文献3より引用】
5年生存率: Vv₀: 43% (n=747), Vv₁: 19% (n=57), Vv₂: 11% (n=23), Vv₃: 0% (n=18).

位による手術選択がきわめて重要である.

通常, 肝細胞癌は膨張性発育をするため, 画像診断で下大静脈を圧排するような所見が認められても下大静脈に直接浸潤することはまれであり, 後腹膜より肝を脱転し尾側より順に短肝静脈を処理することにより肝実質と肝部下大静脈を剝離することが可能である. しかし, 低分化型肝細胞癌や混合型肝癌で腺癌の特質をもつ場合にはまれに下大静脈浸潤することがある. 症例1は肝後区域を主座とする混合型肝癌で肝右葉切除および下大静脈合併切除を施行し, 切除標本において組織学的に下大静脈に直接浸潤を認めた症例である(図1). このような場合には下大静脈合併切除および人工血管や自家静脈による再建が必要となることがある. また, 肝静脈流入部下大静脈に浸潤をきたすような症例ではante situm法による肝静脈下大静脈合併切除が必要になることもある⁵⁾.

II. 治療成績からみた手術適応

当科における1985～2001年のStage IV-Bを除いた初回手術例の肝静脈腫瘍栓の治療成績を図2に示す. 5年生存率はVv₀: 43%, Vv₁: 19%, Vv₂: 11%, Vv₃: 0%であった. Vv₂症例においては長期生存例が得られているものの, Vv₃症例



a. 肝S8を主座とする肝細胞癌で中肝静脈から右心房にいたる腫瘍栓および大量の腹水を認める。

b. 低用量CDDP+5-FUによる肝動脈注入化学療法後、下大静脈腫瘍栓は縮小し腹水は消失

図3. 症例2. 55歳, 男

では2002年までの症例を含めても最長生存例は2.2年であり、決して満足できる成績ではない。しかし下大静脈腫瘍栓を放置すると、下大静脈閉塞により肝機能障害や下肢の著明な浮腫・腹水のため予後はきわめて不良で、QOLも著しく損なわれる。

図3に示す症例は55歳、男性(症例2)で、肝S8を主座とする肝細胞癌で中肝静脈から右心房にいたる腫瘍栓および肝部下大静脈に2次血栓を認めた。初診時は肝機能良好であった。しかし、10日後の入院時には大量の腹水、下腿浮腫による体重増加と肝機能の急激な悪化を認め、低用量CDDP+5-FUによる肝動脈注入化学療法を施行した。腫瘍マーカーの低下とともに腫瘍栓の縮小により肝機能は改善し腹水浮腫も消失した(表1)。しかし、休薬期間中に腫瘍マーカーが再上昇し、血管造影にて右下横隔膜動脈から腫瘍栓への栄養血管を認めたため下横隔膜動脈から塞栓療法を施行した。肝動脈注入化学療法による治療は限界と考えられ、肝左3区域切除および人工心肺下に右房の腫瘍栓を摘出した。術後経過は良好で、低用量CDDP+5-FUを用いた肝動脈注入化学療法を再度施行し、術後38日目に軽快退院した。

表1. 症例2. 低用量CDDP+5-FU肝動脈注入化学療法前後の変化

	動注前		動注後
	初診時	入院時	
体重(kg)	67.0	72.3	65.0
腹水	なし	あり	なし
下腿浮腫	なし	著明	なし
T-Bil(mg/dl)	1.4	1.8*	0.9
Alb(g/dl)	3.8	3.1	4.0
ICG-R15(%)	—	46	16
PT(%)	66	48	74
PLT($\times 10^3/\mu\text{l}$)	132	85	128

*: T-Bilは入院後2.8mg/dlまで上昇した

現在、術後5ヵ月経過し肝内に再発はないものの肺転移を認め、低用量CDDP+5-FUの全身化学療法を施行している。

V_{v2}以上の肝静脈腫瘍栓症例を再発形式から検討すると、60%以上の症例では肝内再発をきたしている。これは45%の症例にV_{p3}以上の門脈腫瘍栓を合併していることが関連していると考えられる。したがって、まず肝内再発に対する対策が必要である。最近、高度脈管侵襲進行肝癌に対す

る肝動脈注入化学療法が注目されており、Fukudaらは低用量CDDP+5-FUの有効性を⁶⁾、SakonらはIFN併用5-FU持続動注により高い奏効率と少数例ながらも腫瘍の消失例を報告している⁷⁾。われわれも、これらの報告の中から低用量CDDP+5-FUを用いた肝動脈注入化学療法を施行しており、最近では予防的肝動脈注入化学療法により肝内再発に対してはある程度対応が可能になったとも考えられる。しかしながら、約28%の症例は肺転移をきたしており、さらに肺以外にも骨、副腎、脳、リンパ節への遠隔転移も少なくなく長期生存例はわずかである。遠隔転移に対する治療法として全身化学療法があげられる。これまで全身化学療法については肝機能良好例では有用であったとの報告がみられるが⁸⁾、逆に肝機能を悪化させ予後が不良となったとの報告もあり^{9,10)}、肝細胞癌において遠隔転移に対する治療はいまだ確立されたプロトコルはない。したがって、今後遠隔転移に対する全身化学療法の確立が必要である。

以上から、V_vまでの肝静脈腫瘍栓は外科的治療の適応と考えられる。しかし、下大静脈腫瘍栓症例の予後は不良で、現在のところ下大静脈・肝静脈還流障害の予防による予後の改善を目指した手術適応はあるが、肝細胞癌の根治的治療という点からは積極的な手術適応とはならないと考えられる。

おわりに

下大静脈腫瘍栓症例に対しては、正確な腫瘍先進部の診断に基づく術式の選択が必要である。しかし、早期再発により予後は不良で、今後遠隔転移に対する治療法の確立が急がれる。

◆ ◆ ◆ 文 献 ◆ ◆ ◆

- 1) 日本肝癌研究会：第15回全国原発性肝癌追跡調査報告(1998～1999)。肝臓44：157-175, 2003
- 2) Ikai I, Yamaoka Y, Yamamoto Y et al : Surgical intervention for patients with Stage IV-A hepatocellular carcinoma without lymph node metastasis. *Ann Surg* 227 : 433-439, 1998
- 3) Ikai I, Yamamoto Y, Yamamoto N et al : Results of hepatic resection for hepatocellular carcinoma invading major portal and/or hepatic veins. *Surg Oncol Clin N Am* 12 : 65-75, 2003
- 4) Kumada K, Shimahara Y, Fukui K et al : Extended right hepatic lobectomy ; combined resection of inferior vena cava and its reconstruction by EPTFE graft(Gore-Tex) ; case report. *Acta Chir Scand* 154 : 481-483, 1988
- 5) Yamamoto Y, Terajima H, Ishikawa Y et al : *In situ* pedicle resection in left trisegmentectomy on the liver combined with reconstruction of the right hepatic vein to an inferior vena caval segment transpositioned from infrahepatic portion. *J Am Coll Surg* 192 : 137-141, 2001
- 6) Fukuda S, Okuda K, Imamura M et al : Surgical resection combined with chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombus ; report of 19 cases. *Surgery* 131 : 300-310, 2002
- 7) Sakon M, Nagano H, Dono K et al : Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon- α therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* 94 : 435-442, 2002
- 8) Yamamoto M, Arai S, Sugahara K et al : Adjuvant oral chemotherapy to prevent recurrence after curative resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 83 : 336-340, 1996
- 9) Ono T, Yamanoi A, Nazmy El et al : Adjuvant chemotherapy after resection of hepatocellular carcinoma causes deterioration of long-term prognosis in cirrhotic patients ; metaanalysis of three randomized controlled trials. *Cancer* 91 : 2378-2385, 2001
- 10) Lai EC, Lo CM, Fan ST et al : Postoperative adjuvant chemotherapy after curative resection of hepatocellular carcinoma ; a randomized controlled trial. *Arch Surg* 133 : 183-188, 1998

肝静脈下大静脈浸潤

玉置 信行* 波多野 悦朗* 嵩原 康行*
前谷 洋爾** 中嶋 安彬*** 猪飼 伊和夫*

索引用語：肝細胞癌，下大静脈浸潤，画像診断

1 はじめに

肝細胞癌は胆管細胞癌や転移性肝癌と異なり下大静脈に直接浸潤する例は非常に稀であり¹⁾，肝腫瘍が下大静脈に接している場合，術前に浸潤の有無を正確に診断することは難しい。今回，下大静脈に浸潤を認め，下大静脈合併切除を要した肝細胞癌の1例を提示する。

2 症例

症例は56歳女性。術前検査ではHBs抗原(－)，HCV抗体(－)と感染症はなく，腫瘍マーカーはAFP 544 ng/ml，PIVKA II 42,176 mAU/mlといずれも高値を示していた。CT，MRIでは肝S1から左葉にかけて大きな不整形の腫瘍を認め，辺縁部優位に腫瘍濃染を認めるが，内部は造影されず壊死に陥っていることが示唆された。また，門脈腫瘍栓を認め，肝細胞癌と診断した。下大静脈を広範に圧排しているが，浸潤の有無につい

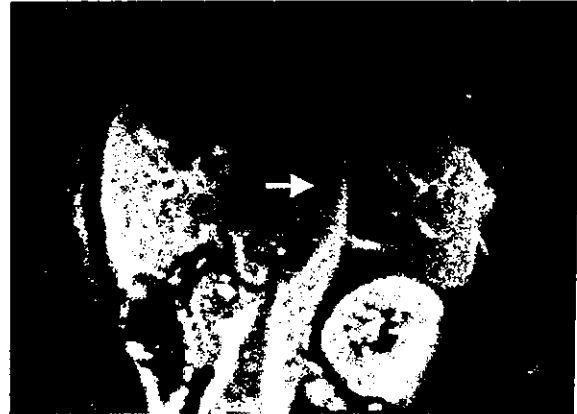
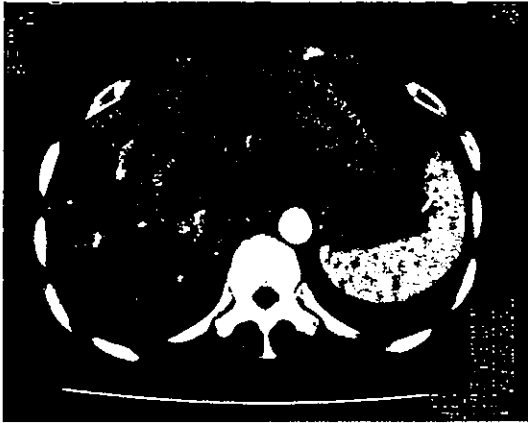
ては明らかではない(図1)。本症例に対し，肝左3区域切除術を施行した。下大静脈に長さ4 cm，幅1 cmの浸潤を認め，紡錘状に合併切除し(図2a)，欠損部は単純縫合閉鎖した。病理組織診断では中～低分化型肝細胞癌であり，被膜の形成はなく，合併切除した下大静脈壁内に浸潤が認められた。Elastica Van Gieson染色では，下大静脈外層から内膜直下まで広く腫瘍細胞に置き換わっている像が見られる(図2d，内膜は脱落している)。

肝細胞癌が肝静脈・下大静脈に腫瘍栓を形成することはしばしば見られるが，直接浸潤は非常に稀である。一般的に，肝細胞癌は被膜を有して膨張性発育を示すことが多く，下大静脈への浸潤が疑われても下大静脈圧排のみで剥離可能な例が多い。合併切除例の検討でも，組織診断で直接浸潤が証明されるものはさらに少ない。自験例では，1985年1月から2001年6月までの肝細胞癌切除例930例のうち下大静脈合併切除例は19例であったが，組織学的壁浸潤陽性例は6例のみで

Nobuyuki TAMAKI et al: Hepatocellular carcinoma invading to the inferior vena cava

*京都大学医学研究科消化器外科学教室 [〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54]

** 同 核医学科，***京都大学医学部附属病院病理部



a	c
b	

図 1

a : 腹部造影 CT 動脈相, b : 同 平衡相,
c : 腹部造影 MRI T1 強調. 矢状断像 (矢印: 下大静脈
圧排部)

あった。組織型は低ないし未分化型肝細胞癌が3例，腺癌成分が混在する肝細胞癌－胆管細胞癌混合型が2例であった¹⁾。

下大静脈は壁が薄く，弾性繊維が少ないため，わずかな外力でも変形する²⁾。CTや下大静脈造影で下大静脈の圧排が認められても，術前に浸潤の有無を正確に診断することは難しい。Maebaらは，CTにおいて下大静脈の半周が腫瘍により圧排されている場合や，静脈造影で下大静脈が50 mm以上にわたり圧排されている場合，collateral veinの発達が認められる場合などは下大静脈への浸潤が疑われるが，このcriteriaにあてはまった10症例のうち，4例には病理学的浸潤を認めなかったと報告している³⁾。また，ICEUS (intracaval endovascular ultrasonogra-

phy)を用いると，浸潤の有無を正確に予言できるとする報告もあるが⁴⁾，一般的に広行われる検査ではなく，評価は一定しない。

肝細胞癌が下大静脈壁に直接浸潤することは稀であり，術前に浸潤の有無について診することは難しい。本例のように術前画像断で腫瘍が大きく内部が壊死に陥っている場合は，低分化肝細胞癌など浸潤傾向の強いタイプである可能性を考慮し，下大静脈浸潤念頭において治療を行う必要がある。

文 献

- 1) 寺嶋宏明, 山岡義生: 肝癌における下大静脈除再建の適応と手技. 日本外科学会雑誌 1 (11) : 810-814, 2001
- 2) Okada Y, Nagino M, Kamiya J et al : Diagnosis : treatment of inferior vena caval invasion by hep

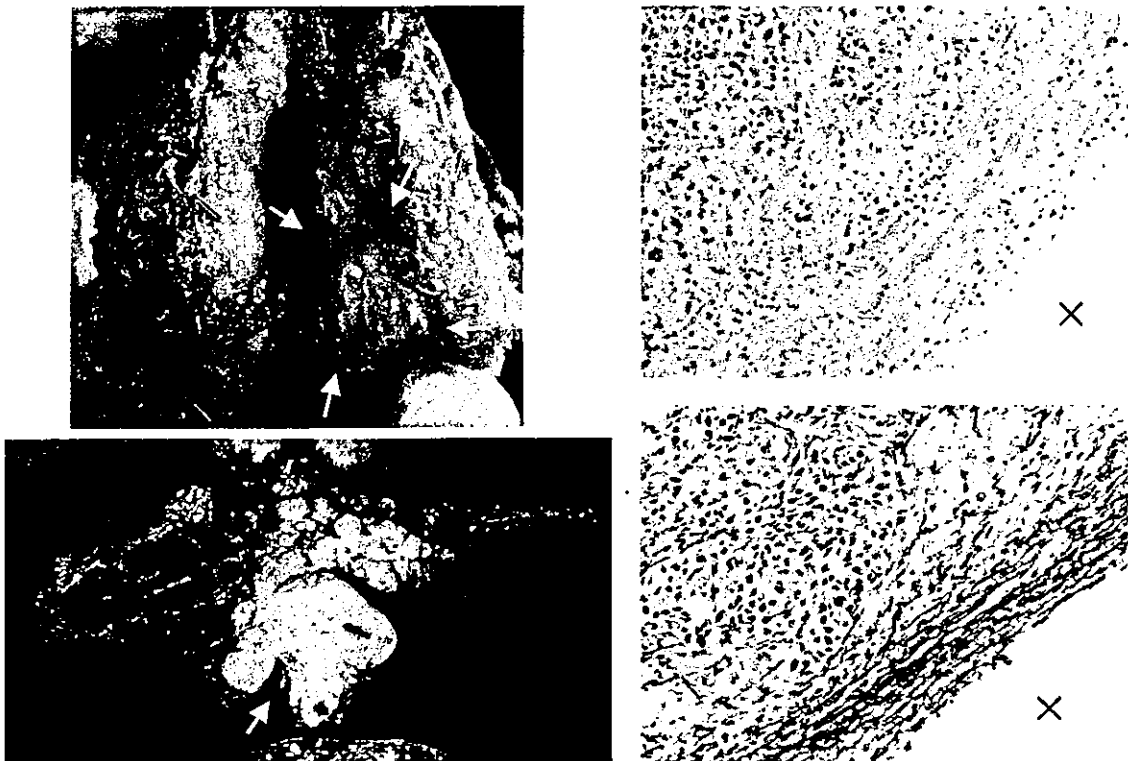


图 2

a	c
b	d

a : 标本背面 (矢印: 下大静脉合并切除部), b : 标本剖面,
c : HE 染色 (×印: 下大静脉内腔侧), d : Elastica Van Gieson 染色

- ic cancer. World J Surg 27 : 689-694, 2003
- 3) Maeba T, Okano K, Mori S et al : Extent of pathologic invasion of the inferior vena cava in resected liver cancer compared with possible caval invasion diagnosed by preoperative images. J Hepatobiliary Pancreat Surg 7 : 299-305, 2000

- 4) Kaneko T, Nakao A, Nomoto S et al : Intracaval endovascular ultrasonography for preoperative assessment of retrohepatic inferior vena cava infiltration by malignant hepatic tumors. Hepatology 24 : 1121-1127, 1996

* * *

Interferon- α Con1 suppresses proliferation of liver cancer cell lines in vitro and in vivo[☆]

Toru Hisaka, Hirohisa Yano*, Sachiko Ogasawara, Seiya Momosaki, Naoyo Nishida, Yumi Takemoto, Sakiko Kojiro, Yuno Katafuchi, Masamichi Kojiro

Department of Pathology, Kurume University School of Medicine, Research Center of Innovative Cancer Therapy of the 21 Century COE Program for Medical Science, Kurume University, 67 Asahi-machi, 830-0011 Kurume, Japan

Background/Aims: We investigated the effects of consensus interferon (IFN- α Con1), a nonnaturally occurring type I interferon with higher specific activity than other type I IFNs, on the growth of human liver cancer cells.

Methods: The effect of IFN- α Con1 on the proliferation of 13 liver cancer cell lines was investigated in vitro. Hepatocellular carcinoma (HCC) cells (KIM-1 and HAK-1B) were transplanted subcutaneously into the back of nude mice, then IFN- α Con1 was subcutaneously administered to the mice once a day for 2 weeks, and tumor volume and histology were examined.

Results: IFN- α Con1 expressed a dose-dependent growth inhibitory effect in all cell lines in vitro. KIM-1 tumor volume in mice that received 0.01 μ g (10^4 IU)/mouse/day of IFN- α Con1 (similar to the clinical dose for chronic hepatitis C) was 62% of the control, 0.1 μ g/mouse/day resulted in 26%, and 1 μ g/mouse/day resulted in 10%. HAK-1B tumor volume under the same treatment was 61, 24 and 0% of the control, respectively. The number of apoptotic cells significantly increased and the number of blood vessels significantly decreased with the increase in IFN- α Con1 dose.

Conclusions: IFN- α Con1 suppressed HCC growth in nude mice. These data indicate the potential clinical application of IFN- α Con1 in the prevention and treatment of HCC.

© 2004 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Angiogenesis; Apoptosis; Antiproliferation; Consensus interferon; Hepatocellular carcinoma; Nude mouse

1. Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most frequently found primary cancers in the world, in particular in Asia and Africa. Many HCC patients have chronic hepatitis or cirrhosis caused by chronic infection of hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) as their background disease [1–3]. Interferon (IFN)- α has been applied in treatment for HBV- and HCV-related

chronic hepatitis in several countries because of its suppressive effects on virus replication (reviewed in Ref. [4]). IFN- α possesses high suppressive effects on hepatocellular carcinogenesis [5–7]. Because it possesses not only antiviral effects but also various biological activities such as antiproliferative activity, immunoregulatory activity, anti-telomerase activity, and anti-angiogenesis activity [8,9], IFN- α has been applied in the treatment of malignant diseases including renal cancer and leukemia [4,10].

Antiproliferative effects and the mechanism of actions of IFN- α have been studied in vitro using various human organ-derived neoplastic cells including HCC [11–14], lymphoma, melanoma, and leukemia cells [4,15–26]. We previously reported the relationship between IFN- α receptor expression and antiproliferative effects on 13 liver cancer cell lines [13], i.e. (i) almost all cell lines

Received 10 December 2003; received in revised form 14 May 2004; accepted 2 July 2004; available online 26 July 2004

* The authors who have taken part in this study declare that they have no relationship with the manufacturers of the drugs involved either in the past or present and did not receive funding from the manufacturers.

* Corresponding author. Tel.: +81-942-31-7546; fax: +81-942-32-0905.

E-mail address: hirovano@med.kurume-u.ac.jp (H. Yano).

0168-8278/\$30.00 © 2004 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jhep.2004.07.012

express Type I IFN receptor, and (ii) natural human IFN- α arrests cell cycle with or without apoptosis and suppresses cell-proliferation at various degrees. These findings indicate that IFN- α may be an effective remedy with or without other medicines such as anticancer agents.

Consensus interferon, i.e. IFN- α Con1, is a wholly synthetic Type 1 interferon. The consensus sequence was synthesized through the scanning of several IFN- α non-allelic subtypes and assigning the most frequently observed amino acid in each position [27]. On the molar basis, IFN- α Con1 was more potent in antiviral effects, antiproliferative effects, NK cell activation activity, cytokine induction and IFN-stimulated gene-induction activity than recombinant IFN- α s (e.g. IFN- α 2a and IFN- α 2b). On the antiviral unit basis, however, those effects and activities were equal in IFN- α Con1 and recombinant IFN- α s [27,28]. These conditions are attributable to the higher affinity of IFN- α Con1 to the array of Type I interferon receptors. This high binding affinity may reflect increased binding capacity and/or signaling at lower protein concentrations [27–29]. With these characteristics, the antitumor effects of IFN- α Con1 to HCC are expected to be more potent than the other IFN- α s, but there have been no *in vitro* or *in vivo* studies on the effects.

In the current study, we examined the antitumor effects of IFN- α Con1 on 13 HCC cell lines both *in vitro* and *in vivo*, using several concentrations including a low dose that is similar to the level used in clinical application.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and cell culture

This study utilized 11 HCC cell lines (KIM-1, KYN-1, KYN-2, KYN-3, HAK-1A, HAK-1B, HAK-2, HAK-3, HAK-4, HAK-5, and HAK-6), and 2 human combined hepatocellular and cholangiocarcinoma (CHC) cell lines (KMCH-1 and KMCH-2). The cell lines were originally established in our laboratory, and each of the cell lines retains morphological and functional features of original tumor as previously described [13,30–37].

Each cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle medium (Nissui Seiyaku, Co., Japan) supplemented with 2.5% heat-inactivated (56 °C, 30 min) fetal bovine serum (Bioserum, Victoria, Australia), 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (α -SMA, GIBCO BRL/Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) and 12 mmol/l sodium bicarbonate, in humidified atmosphere in 5% CO₂ in air at 37 °C.

2.2. IFN and reagents

IFN- α Con1 (Advaferon[®]) was kindly provided by Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd (Tokyo, Japan). Specific activity of the IFN- α Con1 was 1×10^9 IU/mg protein.

A rat antibody against mouse endothelial cells (anti-CD34, clone MEC14.7, Serotec Co., UK), a mouse monoclonal antibody against human alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (clone 1A4, Immunon, Pittsburgh, PA) that cross-reacts with mouse α -SMA, Histofine simple stain mouse MAX-PO (Rat) kits (Nichirei, Tokyo, Japan), and HistoMouse[™]-plus kits (Zymed Laboratories, Inc., CA) were used for immunohistochemical staining.

2.3. Morphological observation

For morphologic observation under a light microscope, cultured cells were seeded on Lab-Tek tissue culture chamber slides (Nunc, Inc., Roskilde, Denmark), cultured with IFN- α Con1 (0.256, 1.024 or 4.096 ng/ml) or without IFN- α Con1 for 72 h, fixed for 10 min in Carnoy's solution, and stained with hematoxylin-eosine (HE).

2.4. Effects of IFN- α Con1 on the proliferation of hepatocellular carcinoma and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma cell lines *in vitro*

The effects of IFN- α Con1 to the growth of cultured cells were examined with colorimetry using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay kits (Chemicon, Temecula, CA) as previously described [13]. Briefly, cells ($1.5\text{--}8 \times 10^3$ cells per well) were seeded on 96-well plates (Falcon, Becton Dickinson Labware, Tokyo, Japan), cultured for 24 h, and the culture medium was changed to a new one with or without IFN- α Con1 (0.004, 0.016, 0.064, 0.256 or 1.024 ng/ml). After the culture for 24, 48, 72 or 96 h, the number of viable cells was examined.

2.5. Quantitative analysis of apoptotic induced by IFN- α Con1 *in vitro*

Cells cultured with or without 1 ng/ml IFN- α Con1 for 72 h were stained with Annexin V-EGFP (enhanced green fluorescent protein) Apoptosis Detection Kits (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd) according to the manufacturer's protocol. After staining, the cells were analyzed using a FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems USA), and annexin V-EGFP-positive apoptotic cell rate was determined.

2.6. Effects of IFN- α Con1 on HCC cell proliferation *in nude mice*

Cultured KIM-1 or HAK-1B (10^7 cells/mouse) was subcutaneously (s.c.) injected to the back of 5-week old female BALB/c athymic nude mice (Clea Japan, Inc., Osaka, Japan). Five to seven days later when the largest diameter of the tumor reached approximately 5–10 mm, the mice were divided into four groups ($n=10$ each) in a manner to equalize the mean tumor diameter of every group. Each mouse received a subcutaneous injection of 0.1 ml of phosphate buffered saline (PBS) containing either 0, 0.01, 0.1 or 1 μ g of IFN- α Con1 once a day for 2 weeks. The site of injection was at least 2 cm away from the tumor. During this 2-week period, tumor size was measured in two directions using calipers once in every 2 days and tumor volume (mm³) was estimated using the equation length \times (width)² \times 0.5. Tumor volume was estimated on the first day of s.c. injection (Day 0), and then once in every 2 days until Day 14 and the group mean was obtained. On Day 15, the mice were sacrificed and the tumors were resected and fixed in formalin. Tumor sections having the largest diameter were prepared into paraffin sections for HE staining and immunohistochemistry. Every mouse received intraperitoneal injection of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) 1 mg (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 1 h before sacrifice.

The number of cells showing characteristics of apoptosis (e.g. cytoplasmic shrinkage, chromatin condensation, and nuclear fragmentation), was counted in ten 0.25 mm²-areas within an HE-stained specimen where apoptotic cells were present at a relatively uniform density, and the average number per area was obtained. The TUNEL technique (ApopTag[®] Peroxidase In Situ apoptosis Detection Kits, CHEMICON International, Inc, CA) was used to detect apoptotic cells. Average number of TUNEL-positive cells per area was obtained, as described above.

KIM-1 tumor sections obtained from every dosage-group were immunostained for incorporated BrdU using BrdU Staining Kits (Oncogene Research Products, Boston, MA), and the average number of positive cells per area was obtained, as described above.

Animals received humane care according to the criteria outlined in the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication 86-23 revised 1985).

2.7. Immunohistochemistry

For double-immunostaining, tumor sections were reacted with anti-mouse endothelial cell antibody using HistoFine simple stain mouse MAX-PO (Rat) kits at first. Peroxidase reaction was developed using the mixture of 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). The second staining with anti-human α -SMA antibody was conducted by making the section react to the primary antibody, α -SMA, at 4 °C overnight, and using HistoMouse™-plus kits. The sections were developed using the mixture of a commercial chromogen (VIP) and hydrogen peroxide (Vector VIP Substrate Kit, Vector Laboratories, CA), and counterstaining was performed using hematoxylin.

The number of blood vessels in the tumor and in the borderline area between the tumor nodule and surrounding tissues was counted on each specimen. The size of the counted area was measured by tracing the outline displayed on a computer-monitor using Cosmozone-1S computer imaging-analysis system (Nikon Co., Tokyo, Japan). From the obtained number of the vessels per unit area (mm²), the group mean was obtained for group comparison.

2.8. Statistics

Comparison of estimated tumor volume was performed using two-factor factorial ANOVA and Student's *t*-test. The other data-comparisons were performed using Student's *t*-test.

3. Results

3.1. Effects of IFN- α Con1 on liver cancer cell proliferation in vitro

Ten percent or more decrease in the relative viable cell number (Fig. 1A) occurred in all 13 cell lines after 72 h or later after the addition of 1.024 ng/ml (1024 IU/ml) of IFN- α Con1. In KMCH-2, proliferation was suppressed 24 h after the IFN- α Con1 contact, and the cell number reached

a plateau afterwards. In KIM-1, HAK-2 and HAK-6, proliferation was suppressed up to 72 h and the cell number reached a plateau afterwards. In the other 9 cell lines, proliferation was suppressed in a varying degree of up to 96 h.

Ninety-six hours after the addition of IFN- α Con1, the relative viable cell number was suppressed in every cell line in a dose-dependent manner (Fig. 1B). The relative cell number of all 13 cell lines when they were cultured for 96 h with 1.024 ng/ml of IFN- α Con1 ranged between 29 and 74%, and their mean was $53 \pm 16\%$ (SD). In the 7 cell lines (HAK-6, KYN-1, KMCH-1, KYN-2, KIM-1, HAK-1B, and KYN-3), the number was suppressed to 50% or lower with 1.024 ng/ml of IFN- α Con1, and 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was 0.128, 0.204, 0.214, 0.352, 0.612, 0.666, and 0.804 ng/ml, respectively. No relationship was detected between the histologic differentiation level of original tumor and sensitivity to the antiproliferative effect of IFN- α Con1.

Seventy-two hours after adding IFN- α Con1, every cell line showed characteristics of apoptosis, e.g. cytoplasmic shrinkage, chromatin condensation, and nuclear fragmentation, in various degrees and in a dose-dependent manner (Fig. 2).

Quantitative analysis of annexin V-EGFP-positive apoptotic cells revealed that the appearance of apoptosis was significantly higher in the cultures with IFN- α Con1 than those without IFN- α Con1 in all cell lines (Table 1).

3.2. Effects of IFN- α Con1 on HCC cell proliferation in nude mice

Chronological changes of estimated tumor volume after subcutaneous injection of cultured KIM-1 or HAK-1B cells

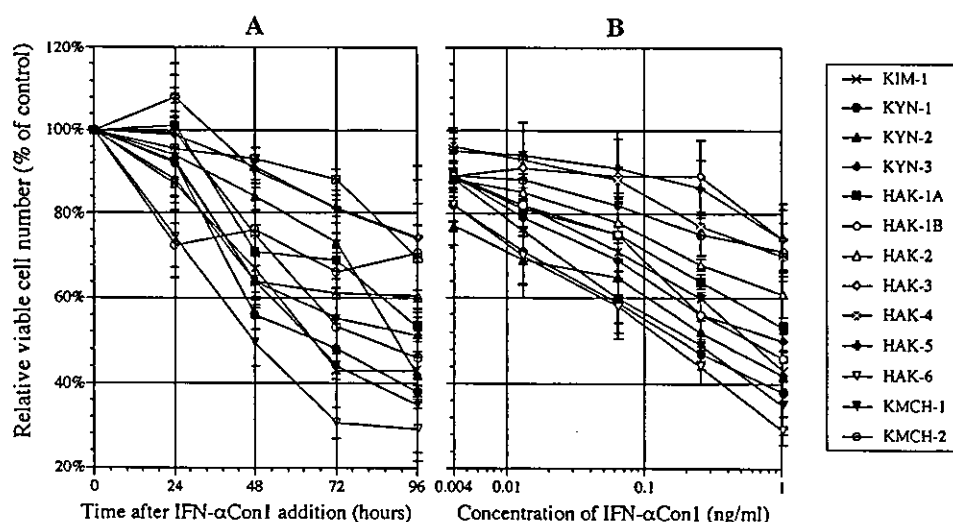


Fig. 1. Antiproliferative effect of IFN- α Con1. (A) Chronological changes in relative viable cell number (% of the control) after adding 1.024 ng/ml (1024 IU/ml) of IFN- α Con1. Growth was suppressed with time. (B) 96 h after adding 0.004, 0.016, 0.064, 0.256 or 1.024 ng/ml of IFN- α Con1. Cell proliferation was suppressed in a dose-dependent manner but in varying degrees. The suppression was statistically significant ($P < 0.01$ – 0.0001) in the range of 4–1.024 ng/ml of IFN- α Con1 in all cell lines. Specific activity of the IFN- α Con1 was 1×10^9 IU/mg protein. Eight samples were used in each experiment ($n = 8$). The experiment was repeated at least three times for each cell line to confirm reproducibility of the data, and almost identical results were obtained. Error bar represents SE. Mean absorbance in the control (cells cultured in the medium without IFN- α Con1) was determined as 100%, and the mean of the other groups was expressed as a ratio.

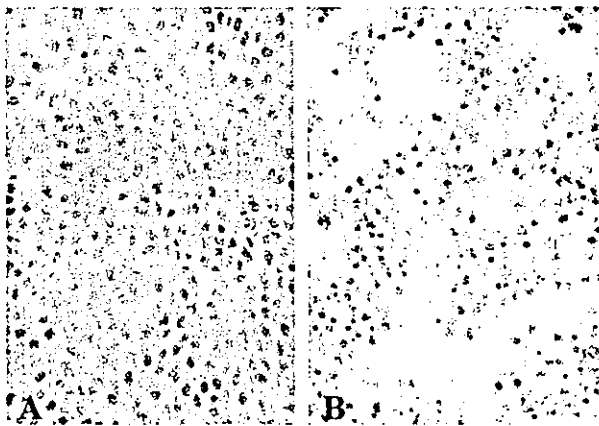


Fig. 2. Photomicrographs of HAK-6 cells cultured for 72 h on a Lab-Tek Chamber slide. (A) No IFN-αCon1 in culture medium. (B) With 1.024 ng/ml (1024 IU/ml) of IFN-αCon1 in culture medium. IFN-αCon1-induced apoptosis was characterized by cytoplasmic shrinkage, chromatin condensation and nuclear fragmentation (HE staining, ×100).

to nude mice are summarized in Fig. 3. Significant difference on the volume changes was obtained between the control and each KIM-1 and HAK-1B tumor group with IFN-αCon1 ($P < 0.0001$ by two-factor factorial ANOVA). In KIM-1, tumor volume became significantly smaller than the controls after the 4th day of culture ($P < 0.05$ – 0.0001 by Student *t*-test) except the 6th day of 0.1 μg (10^5 IU) IFN-αCon1. In HAK-1B, significant difference to the controls was obtained after the 2nd day of 1 μg (10^6 IU), the 6th day of 0.1 μg and the 10th day of 0.01 μg (10^4 IU) ($P < 0.05$ – 0.0001 by Student *t*-test). Except for the initial 8 days of the KIM-1 group, tumor volumes of both KIM-1

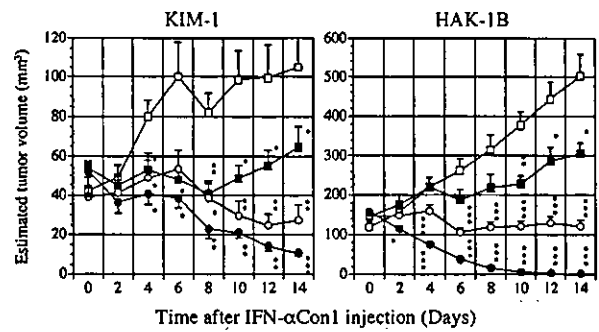


Fig. 3. Time-course change of estimated tumor volumes of subcutaneous human HCC tumors (KIM-1 and HAK-1B cells) in nude mice. Mice received subcutaneous injection of 0.01 μg (10^4 IU) IFN-αCon1 (■), 0.1 μg (10^5 IU) IFN-αCon1 (○), or 1 μg (10^6 IU) IFN-αCon1 (●), or PBS alone (control) (□). In mice with HAK-1B, tumor became almost unrecognizable on Day10. * $P < 0.05$, vs. control. ** $P < 0.005$, vs. control. *** $P < 0.0001$, vs. control (by Student *t*-test).

and HAK-1B were suppressed dose-dependently. At the end of this experiment, estimated volumes in the KIM-1 and HAK-1B groups that received 0.01 μg (10^4 IU) of IFN-αCon1 (4×10^5 IU/kg, the closest to the clinical dosage 3×10^5 IU/kg) became 62 and 61%, respectively, of the control. In the mice that received 0.1 μg, the volumes became 26 and 24%, respectively, of the control. In the mice that received 1 μg, the volume shrank to 10% of the control in the KIM-1 group and almost disappeared on the 10th day in the HAK-1B group (Fig. 4). IFN-αCon1 administration did not affect mouse body weight (data not shown).

Table 1
Quantitative analysis of apoptosis induced by IFN-αCon1 in 13 liver cancer cell lines

Cell line	Annexin V-EGFP-positive apoptotic cell rates (%)	
	Control	IFN-αCon1
KIM-1	6.0 ± 0.8	22.1 ± 1.3 ^a
KYN-1	10.6 ± 1.0	16.9 ± 2.6 ^b
KYN-2	11.7 ± 3.2	34.9 ± 4.3 ^a
KYN-3	6.0 ± 0.7	15.2 ± 0.9 ^a
HAK-1A	10.7 ± 1.7	20.3 ± 1.2 ^a
HAK-1B	8.0 ± 1.4	28.7 ± 0.8 ^a
HAK-2	6.1 ± 2.0	15.7 ± 0.9 ^a
HAK-3	6.4 ± 0.7	9.1 ± 0.8 ^b
HAK-4	3.3 ± 0.4	5.0 ± 0.5 ^b
HAK-5	7.3 ± 1.2	10.8 ± 1.3 ^c
HAK-6	9.1 ± 1.5	20.1 ± 0.9 ^a
KMCH-1	5.2 ± 0.4	27.1 ± 1.3 ^a
KMCH-2	4.0 ± 0.5	5.1 ± 0.8 ^a

Cells were cultured with medium alone (control) or medium with 1 ng/ml (1000 IU/ml) IFN-αCon1. Apoptosis was measured by Annexin V-EGFP staining. Annexin V-EGFP-positive apoptotic cell rates are given as average ± SD. Five samples were used in each experiment. * $P < 0.05$ vs. corresponding control value.

^a $P \leq 0.0001$ vs. corresponding control value.

^b $P \leq 0.001$ vs. corresponding control value.

^c $P < 0.01$ vs. corresponding control value.



Fig. 4. A photograph of a control group nude mouse (right side) and a 1 μg IFN-αCon1 group nude mouse (left side) on day 15. The control group mouse has a distinct large subcutaneous tumor (right side), while the 1 μg IFN-αCon1 group mouse has no visible subcutaneous tumor (left side).

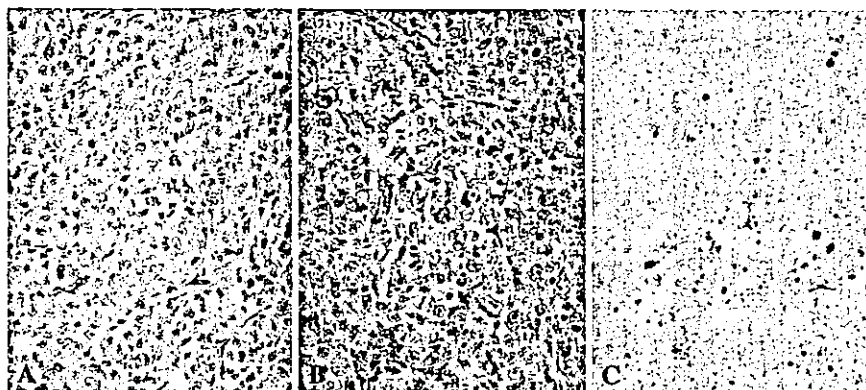


Fig. 5. Photomicrograph of subcutaneous human HCC tumors developed after injection of HAK-1B cells in nude mice. (A) A control mouse that received PBS alone. Thick trabecular or compact arrangement of tumor cells is noted. (B) A mouse that received s.c. injection of 0.1 µg (10^5 IU) IFN- α Con1. There are many apoptotic tumor-cells characterized by shrinkage and/or eosinophilic change in cytoplasm, and by chromatin condensation and/or fragmentation of nuclei (HE staining, $\times 200$). (C) The same tumor as shown in (B). There are many TUNEL-positive cells showing brown nuclei (stained by the TUNEL technique).

Histological examination on KIM-1 and HAK-1B tumor specimens stained with HE revealed that the numbers of apoptotic cells in the groups treated with IFN- α Con1 were significantly higher than that of the control and increased dose-dependently. The incidence of apoptosis in TUNEL-stained sections showed the same tendencies as those obtained in HE-stained sections (Fig. 5 and Table 2). Tissues on the site of tumor that disappeared in the 1 µg group presented only mild increase in fibroblasts.

The number of blood vessels per unit area in the nude mice that received injection of either KIM-1 or HAK-1B was different in every group, and the number tended to decrease dose-dependently. Significant difference was obtained between the control and 1 µg in the KIM-1 group, and between the control and 0.1 µg or 0.01 µg in the HAK-1B group (Figs. 6 and 7).

Table 2
Comparison of apoptotic cell number in the subcutaneous tumors in nude mice

Group	Apoptotic cell number	
	HE stain	TUNEL method
KIM-1 tumor		
Control	8.4 ± 0.8	4.1 ± 1.3
0.01 µg (10^4 IU) IFN- α Con1	13.2 ± 1.4 ^a	6.0 ± 0.8
0.1 µg (10^5 IU) IFN- α Con1	17.6 ± 0.9 ^b	16.5 ± 3.7 ^a
1 µg (10^6 IU) IFN- α Con1	28.2 ± 1.2 ^b	20.5 ± 5.1 [*]
HAK-1B tumor		
Control	12.0 ± 0.9	5.3 ± 1.2
0.01 µg (10^4 IU) IFN- α Con1	15.9 ± 1.0 ^a	9.8 ± 1.8
0.1 µg (10^5 IU) IFN- α Con1	19.2 ± 0.6 ^b	13.5 ± 2.2 [*]

Results are given as average \pm SE. The number of cells showing morphological characteristics of apoptosis (e.g. cytoplasmic shrinkage, chromatin condensation, and nuclear fragmentation), was counted in ten 0.25 mm²-areas within a HE-stained specimen. The number of TUNEL-positive cells was also counted in the same manner. All subcutaneous tumors disappeared in the nude mice that received s.c. injection of 1 µg IFN- α Con1. ^{*} $P < 0.05$ vs. corresponding control value.

^a $P < 0.01$ vs. corresponding control value.

^b $P \leq 0.0001$ vs. corresponding control value.

Immunohistochemical examination of BrdU uptake of KIM-1 tumors revealed that BrdU-positive cells were present mainly on the edge of the tumor nodules in every dosage-group, but there was no group difference in the positive rate.

4. Discussion

The addition of IFN- α Con1 to culture medium induced dose-dependent and time-dependent antiproliferative effects in most of the 13 cell lines, and a certain degree of apoptosis in all 13 cell lines. There was no relationship between the histological level and the sensitivity to IFN- α Con1. Although in vitro antiproliferative findings may not be exactly the same in clinical applications, these findings indicate that IFN- α Con1 may be efficacious in treatments of HCC at various histological levels and types.

In our animal experiment, estimated tumor volume decreased dose-dependently with the subcutaneous



Fig. 6. Photomicrograph showing double immunostained artery-like blood vessels in a subcutaneous human HCC tumor developed after the injection of HAK-1B cells in nude mice.

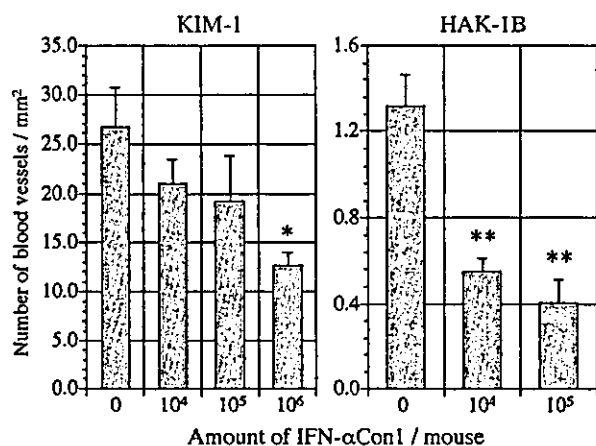


Fig. 7. Comparison of blood vessel number of the subcutaneous tumors in nude mice that received s.c. injection of 0.01 μg (10^4 IU), 0.1 μg (10^5 IU) or 1 μg (10^6 IU) IFN- α Con1 or PBS alone every day for consecutive 14 days. Number of artery-like blood vessel in and around tumor decreased in a dose-dependent manner. Subcutaneous HAK-1B tumors disappeared in all nude mice that received s.c. injection of 1 μg (10^6 IU) IFN- α Con1. The error bar represents SE. * $P < 0.05$ vs. control. ** $P < 0.003$ vs. control.

injection of 0.01–1 μg (10^4 – 10^6 IU) of IFN- α Con1 per mouse. In mice that received any of the doses apart from the 0.01 μg dose, tumor volume decreased over time, and the tumor completely disappeared in the HAK-1B group with 1 μg . In the histological examination of the tumor in mice with IFN- α Con1 treatment, apoptotic cells appeared more frequently in a dose-dependent manner. Another well-known growth inhibitory mechanism induced by IFN- α is the induction of blockage of cell-cycle progression at G1, S, or G₂/M [21–26]. BrdU uptake of KIM-1 tumors was examined in every dosage-group, but there was no significant group difference in the positive rate. This finding however does not agree with our previous conclusion, i.e. natural human IFN- α arrests cell growth at the S phase and this increases BrdU-positive cells in the 2 cell lines [13]. This difference is probably attributable to the difference of in vitro and in vivo experiments. Our previous conclusion was derived from an in vitro experiment over a short culture period (96 h), while the current study examined tumor cells in vivo after a 2-week administration period. In this in vivo experiment, apoptosis holds the dominant position over the arrest of the cell cycle and this results in growth suppression. Further studies, including measurement of the cell-cycle-related protein (e.g. cyclins and cyclin-dependent kinases) levels in nude mouse tumors are planned.

The number of blood vessels per unit area decreased dose-dependently in KIM-1 and HAK-1B nodules. IFN suppresses angiogenesis within the nodules of human bladder carcinoma and human malignant glioma [38,39], and the current study demonstrates that IFN- α Con1 suppresses angiogenesis in HCC nodules. Dinney et al. [38] reported the possible involvement of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the suppressive effect of IFN for angiogenesis. On the other hand, Hong et al. [39] found no

relationship between the suppression of angiogenesis due to IFN and the expression of bFGF or vascular endothelial growth factor (VEGF). Investigations on the expression of angiogenesis factors (e.g. bFGF, VEGF, and IL-8) in HCC tumors in nude mice treated or untreated with IFN- α Con1 provide useful information and are now underway.

Clinical trials of IFN- α in treatment for HCC did not achieve consistent results. One study using very high doses of IFN (from 25 to 50×10^6 IU of recombinant IFN- α 2a) showed beneficial effects [40], whereas other studies using low doses (less than 15×10^6 IU) did not show significant antitumor effects [41–43]. Although these findings suggest the efficacy of high-dose IFN- α treatment on progressed HCC, high-dose administration of conventional IFN- α often causes side effects and patients may develop intolerable conditions and withdraw from the treatment. In regards to side effects, IFN- α Con1 at the same mass concentration of conventional IFN- α is expected to have higher antiviral and antitumor activities because of its higher specific activity, and IFN- α Con1 at a usual clinical dose possibly suppresses the growth of HCC. In chronic hepatitis C patients who received subcutaneous injection of IFN- α Con1 at a clinical dose (18×10^6 IU) for 14 consecutive days, the maximum serum level of IFN- α Con1 reached 372 IU/ml (unpublished data). This level was higher than the IC₅₀ in the four cell lines (0.128–0.352 ng/ml (128–352 IU/ml)[KYN-1, KYN-2, HAK-6 and KMCH-1]) 96 h after the addition of IFN- α Con1 to culture medium. In the current animal experiment, a dose similar to the clinical dose used in treatment for HCV-related chronic hepatitis suppressed HCC growth in nude mice. These data indicate the potential clinical application of IFN- α Con1 in the prevention and treatment of HCC.

Anti-oncogenic properties of IFN- α during the preneoplastic steps have been studied in animal models. In a 2-phase model of rat hepatocarcinogenesis, preneoplastic hepatocytes in rats that received IFN- α 2b during the initiation stage were shown to undergo programmed cell death [46]. However, the study in *X/myc* transgenic mouse showed that IFN- α did not affect hepatocyte apoptosis or telomerase activity at early premalignant stages, but did downregulate hepatocyte proliferation and *c-myc* overexpression at these steps, leading to a delay of HCC onset and increase of overall survival [44,45]. This result at least suggests that the antioncogenic effect of IFN- α is probably diverse. We speculate that IFN- α Con1 administered to chronic viral hepatitis patients would inhibit the growth of clinically undetectable HCC by directly inducing apoptosis of HCC cells and by indirectly suppressing tumor angiogenesis and prevent or delay the development of HCC in these patients.

Acknowledgements

We thank Ms Akemi Yamashita and Ms Kayoko Najima for their assistance in our experiments, and Dr Hiroki