

49)	永野浩昭, 他	肝細胞癌に対する新治療法の開発研究	日本臨牀	60(11)	2237-2244	2002
50)	Kurachi M, et al.	Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression.	Biochemical and Biophysical Research Communications	292(2)	368-377	2002
51)	Tsuchiyama T, et al.	Tiny staining spots liver cirrhosis associated with HCV infection observed by computed tomographic hepatic arteriography: follow-up study.	Journal of Gastroenterology	37(10)	807-814	2002
52)	Nakamoto Y, et al.	Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy.	Journal of Experimental Medicine	196(8)	1105-1111	2002
53)	Masutomi K, et al.	Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma.	Oncogene	21(38)	5946-5950	2002
54)	Minouchi K, et al.	Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver.	Journal of Hepatology	37(2)	231-239	2002
55)	Arai K, et al.	Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) are important for its oligomerization and telomerase activity.	The Journal of Biological Chemistry	277(10)	8538-8544	2002
56)	Yasuchika K, et al.	Establishment of a highly efficient gene transfer system for mouse fetal hepatic progenitor cells.	Hepatology	Dec; 36(6)	1488-97	2002
57)	Sugimoto S, et al.	Morphological changes induced by extracellular matrix are correlated with maturation of rat small hepatocytes.	J Cell Biochem.	87(1)	16-28	2002
58)	Katsura N, et al.	Long-term culture of primary human hepatocytes with preservation of proliferative capacity and differentiated functions.	J Surg Res.	Jul; 106(1)	115-23	2002
59)	Yoshida M, et al.	Kupffer cell targeting by intraportal injection of the HVJ cationic liposome.	Eur Surg Res.	Jun; 34(3)	251-9	2002
60)	Uchinami H, et al.	Effect of heat shock preconditioning on NF-kappaB/I-kappaB pathway during I/R injury of the rat liver.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	Jun; 282(6)	G962-71	2002
61)	Yamagami K, et al.	Heat shock preconditioning reduces the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins in ischemia-reperfused liver of rats.	Free Radic Res.	Feb; 36(2)	169-76	2002

62)	Fujii H, et al.	Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice.	J Hepatol.	May; 36(5)	653-9	2002
63)	Uyama N, et al.	Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells.	J Hepatol.	May; 36(5)	590-9	2002
64)	Tanaka A, et al.	Tumor thrombi in the portal vein system originating from gastrointestinal tract cancer.	J Gastroenterol.	37(3)	220-8	2002
65)	Nishida N, et al.	Prognostic impact of multiple allelic losses on metastatic recurrence in hepatocellular carcinoma after curative resection.	Oncology.;	62(2)	141-8	2002
66)	Terajima H, et al.	Endoscopic Nasobiliary drainage for postoperative bile leakage after hepatic resection.	World J Surg.	28	782-786	2004
67)	猪飼伊和夫, その他	肝細胞癌に対する外科切除.	臨床外科	59(3)	303-307	2004
68)	猪飼伊和夫, その他	肝癌—今、わかっていること、わかっていないこと、外科治療	カレントセラピー	22(5)	75-78	2004
69)	猪飼伊和夫, その他	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	外科	66(6)	671-674	2004
70)	玉置信行, その他	肝静脈下大静脈浸潤	肝・胆・膵	49(5)	761-763	2004
71)	波多野悦朗, 他	進行肝癌の外科的治療の進歩	日本消化器病学会雑誌	100(4)	414-420	2003
72)	波多野悦朗, 他	肝癌に対する肝動注などの化学療法レジメン	臨床外科	58(8)	1065-1069	2003
73)	波多野悦朗, 他	JIS Scoreと自験例の成績：切除	肝・胆・膵	48(1)	35-40	2003
74)	Kurachi M, et al.	Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin-responsive genes in mouse liver by serial analysis of gene expression.	Biochemical and Biophysical Research Communications	292(2)	368-377	2002

75)	Tsuchiyama T, et al.	Tiny staining spots liver cirrhosis associated with HCV infection observed by computed tomographic hepatic arteriography: follow-up study.	Journal of Gastroenterology	37(10)	807-814	2002
76)	Nakamoto Y, et al.	Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy.	Journal of Experimental Medicine	196(8)	1105-1111	2002
77)	Masutomi K, et al.	Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma.	Oncogene	21(38)	5946-5950	2002
78)	Minouchi K, et al.	Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver.	Journal of Hepatology	37(2)	231-239	2002
79)	Arai K, et al.	Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) are important for its oligomerization and telomerase activity.	The Journal of Biological Chemistry	277(10)	8538-8544	2002
80)	Yasuchika K, et al.	Establishment of a highly efficient gene transfer system for mouse fetal hepatic progenitor cells.	Hepatology	Dec; 36(6)	1488-97	2002
81)	Sugimoto S, et al.	Morphological changes induced by extracellular matrix are correlated with maturation of rat small hepatocytes.	J Cell Biochem.	87(1)	16-28	2002
82)	Katsura N, et al.	Long-term culture of primary human hepatocytes with preservation of proliferative capacity and differentiated functions.	J Surg Res.	Jul; 106(1)	115-23	2002
83)	Yoshida M, et al.	Kupffer cell targeting by intraportal injection of the HVJ cationic liposome.	Eur Surg Res.	Jun; 34(3)	251-9	2002
84)	Uchinami H, et al.	Effect of heat shock preconditioning on NF-kappaB/I-kappaB pathway during I/R injury of the rat liver.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	Jun; 282(6)	G962-71	2002
85)	Yamagami K, et al.	Heat shock preconditioning reduces the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins in ischemia-reperfused liver of rats.	Free Radic Res.	Feb; 36(2)	169-76	2002
86)	Fujii H, et al.	Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice.	J Hepatol.	May; 36(5)	653-9	2002
87)	Uyama N, et al.	Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells.	J Hepatol.	May; 36(5)	590-9	2002

88)	Tanaka A, et al.	Tumor thrombi in the portal vein system originating from gastrointestinal tract cancer.	J Gastroenterol.	37(3)	220-8	2002
89)	Nishida N, et al.	Prognostic impact of multiple allelic losses on metastatic recurrence in hepatocellular carcinoma after curative resection.	Oncology.;	62(2)	141-8	2002
90)	Shimahara Y, et al.	Significance of serum type IV collagen level of hepatectomized patients with chronic liver damage.	World J Surg.	Apr; 26(4)	451-6	2002
91)	宇山直樹, 他	星細胞による肝細胞増殖制御	炎症・再生	22(5)	481-487	2002
92)	藤井英明, 他	What's New in SURGERY FRONTIER 新しい薬剤耐性因子 HIF	Surgery Frontier	9(2)	147-149	2002.06
93)	山本雄造, 他	【肝離断法を考える】 各種器械による肝離断 CUSAと水流滴下式バイポーラによる肝離断	外科	64(5)	530-534	2002
94)	山本雄造, 他	【消化器外科専門医であるために必要な標準手術手技アトラス】 肝・胆・膵・脾の手術 肝右3区域切除術	消化器外科	25(7)	1101-1109	2002.06
95)	波多野悦朗, 他	肝臓外科におけるJNK活性化抑制の意義	肝臓	43巻 Suppl.1	PageA68(.05)	2002
96)	Hisaka, T et al.	Interferon- α Con1 suppresses proliferation of liver cancer cell lines <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	Journal of Hepatology	41	782-789	2004
97)	矢野博久	IFNの肝癌細胞に対する直接的な増殖抑制作用	Frontiers in Gastroenterology	9	87-89,	2004
98)	矢野博久, 他	IFNの代謝-抗腫瘍作用	肝胆膵	45	1001-1006	2002
99)	矢野博久, 他	インターフェロンは培養肝癌細胞増殖を抑制する	医学と薬学	47	69-74	2002
100)	小尾俊太郎, 他	進行肝癌に対するIFN併用5FU動注化学療法	消化器科	39(2)	217-223	2004

101) 小尾俊太郎, 他	門脈浸潤(VP3,4)を伴う進行肝細胞癌に対するIFN+5FU併用化学療法の有効性101例の経験.肝臓45巻Suppl.1 A61,2004	肝臓	45巻 Suppl.1	A61	2004
102) 小尾俊太郎, 他	進行肝細胞癌(VP3,4)に対するIFN+5FU併用化学療法の有効性.	肝臓	43巻 Suppl.1	253	2002
103) 小尾俊太郎, 他	進行肝細胞癌 (VP3,4) に対するIFN+5FU併用化学療法の有効性	第38回日本肝癌研究会抄録集		205	2002
104) 小尾俊太郎, 他	門脈浸潤 (VP3,4) を伴う進行肝細胞癌に対するIFN併用5FU動注化学療法の有効性.	肝臓	44巻 Suppl.1	A64	2003
105) 小尾俊太郎, 他	門脈浸潤 (VP3,4) を伴う進行肝細胞癌に対するIFN併用5FU動注化学療法の有効性	第39回日本肝癌研究会抄録集		115	2003
106) 小尾俊太郎, 他	症例26	第39回日本肝癌研究会抄録集		143	2003
107) 小尾俊太郎, 他	門脈浸潤 (VP3,4) を伴う進行肝細胞癌に対するIFN併用5FU動注化学療法の有効性51例の経験	肝臓	44巻 Suppl.2	PA335	2003
108) Obi S, et al.	Combination therapy with IFN-alpha and 5-FU result in complete response in 14 cases out of 64 with advanced hepatocellular carcinoma and portal vein invasion	Hepatology	vol.38, No.4,Su ppl.1	765A	2003
109) Moriyama M, et al.	Relevance network between chemosensitivity transcriptome in human hepatoma cells.	Molecular CancerTherapeu tics	2	199-205	2003
110) 森山優, 他	肝癌細胞における抗癌剤感受性に関連する遺伝子の解析	ゲノム医学	2	71-77	2002
111) 大須賀慶悟	阪大病院におけるTAEの現況	IVR会誌	20(10)	52-53	2005
112) 大須賀慶悟, 他	肝細胞癌の治療の進歩-動注	癌と化学療法	31(13)	2114-2117	2004
113) Osuga K, et al.	Micronester:A New Pushable Fibered Microcoil for Embolotherapy	CVIR	26	554-556	2003

局所療法—Radiological Intervention (肝動脈塞栓療法)

村上 卓道

大阪大学大学院医用制御工学

Introduction

近年、画像診断の進歩に伴い小さな肝細胞癌が発見される機会が多くなってきているが、多発病変や肝内転移、併存する肝硬変のために、肝切除の適応となるものはわずかに29%である¹⁾。しかも、術後の再発率は71.6%に及ぶ^{2,3)}。この20年、肝動脈塞栓療法 (transarterial embolization; TAE) は、このような切除不能肝癌や、術後再発のHCCの治療に用いられ、肝細胞癌患者の42%がTAEを受けている⁴⁾。

肝細胞癌に対するTAEは、1974年フランスのDoyonら⁴⁾によって初めて報告され、1978年には山田らが本格的な臨床報告を行った⁵⁾。その後、油性リンパ造影剤であるリピオドール (Andre-Gelbe Laboratory, Aulnay-sous-Bois; France) が、多くの施設でTAEに併用されるようになり、リピオドールは診断と治療の両方に役立っている⁶⁻¹¹⁾。さらに、最近では、癌の存在する領域の動脈に超選択的にマイクロカテーテルを挿入し、担癌領域だけの区域、亜区域TAEが行われ、治療成績はより一層向上し、小さな肝細胞癌の治療では、肝切除術に匹敵する成績 (5年

生存率) も報告されている¹²⁻¹⁴⁾。

I. 原理 Rationale

TAEの基本原理は、肝臓は動脈 (25%) と門脈 (75%) の二重支配のため¹⁵⁾、動脈を塞栓しても肝の壊死は生じないが、肝細胞癌は主に動脈支配であるため¹⁶⁾、動脈塞栓によって壊死に陥るといえるものである。つまり、TAEは動脈支配の肝細胞癌、言い換えれば多血性 (hypervascular) の肝細胞癌に効果がある治療法である^{17,18)}。

TAEでは、一般に肝細胞癌に集積するリピオドールと抗癌剤の安定な混合液 (water in oilのエマルジョン)¹⁹⁾ を注入後、ゼラチンスポンジ細片で塞栓する方法を用い、化学療法を併用するため transarterial chemoembolization (TACE) ともいわれる。主腫瘍を壊死に陥らせるためのゼラチンスポンジの役割は重要である。ゼラチンスポンジは再吸収されて2~4週間後に肝動脈の再開通が起こるため²⁰⁾、非癌部へのダメージは少なくすむ。抗癌剤の有効性が不明であり、永久塞栓剤のみで行っている報告もあるが²¹⁾、リピオドールだけでは効果がないとされている²²⁾。リピオドールを使わないで、抗癌剤

に浸したゼラチンスポンジ細片でのみ塞栓する方法もあるが、リピオドールを用いた方が有効とされている^{9,10,23,24}。これは、肝細胞癌の血流は、被膜を有するものでは100%動脈支配であるが²⁵、被膜外への浸潤部や周囲のサテライト病変は門脈からの血流も受けているため²⁶、ゼラチンスポンジ細片による塞栓では、被膜内は完全壊死になっても、被膜のない肝細胞癌や被膜外の腫瘍は壊死に陥りにくい²⁷⁻²⁹。リピオドールは、動脈血流の遮断という意味では効果は乏しいが、血流の多い肝細胞癌内に流入して停滞するため、抗癌剤の担体としての働きが期待できる。すなわち、抗癌剤とリピオドールのwater in oilのエマルジョンを作れば¹⁰、抗癌剤はリピオドールとともに腫瘍内に停滞し、ゆっくりと徐放され、局所に高濃度に作用する。エマルジョンからの抗ガン剤の流出は*in vitro*では数時間から数週続くとされている^{10,30}。この混合液は腫瘍周囲の類洞にも停滞し³¹、一部はperibiliary vascular plexusを介して門脈枝にも流入して被膜およびその周辺の門脈血流を低下させる^{32,33}。また一部は腫瘍の血洞から流出静脈系を介して腫瘍周辺の門脈や類洞には入り、それらを一過性に閉塞する³⁴。これらの作用は、ゼラチンスポンジ細片のみのTAEは有効でなかった被膜外病変にも効果が期待できる³⁵。TACE後の良好な腫瘍内および周辺のリピオドールの沈着は腫瘍の著明な壊死を示している^{10,36}。しかし、リピオドールは大量に注入すると前述のように門脈域にも流入するため^{32,33}、それだけ非常部への影響も強くなる³⁷。リピオドールの使用量を腫瘍の大きさや血行動態によって適度に増減することによって、非癌部へのリピオドールの流入はできるだけ避けるべきである³⁸。ただし、強い抗腫瘍効果を

期待して、ある限られた領域だけに注入する報告もある (Recommendation III-4)³⁹。

Recommendation III-4

●塞栓方法としてはLipiodolと抗癌剤の混合物を注入し、その後ゼラチンスポンジ細片で塞栓するのが抗腫瘍効果の点からは望ましい。

II. TACEの方法

腫瘍が広範囲にある場合は、固有肝動脈や左右肝動脈からの塞栓を行うことになるが、腫瘍が限局した範囲にある場合、区域あるいは亜区域動脈にカテーテルを進めて担癌領域だけの塞栓を行う。現在では、マイクロカテーテルを用いることによって、多発であっても極力、区域または亜区域動脈枝レベルから塞栓するようにする。挿入されたカテーテルからの塞栓が、腫瘍の全体をカバーしているかどうかの評価は一般的には血管造影上で行うが、カテーテルから造影剤を注入しながらCTを撮像するCT-arteriographyが、より正確に評価でき、治療効果も向上する^{12-14,40}。肝外性の側副動脈がある場合、その動脈にもカテーテルを挿入し、できるだけ腫瘍の近くから塞栓を行う⁴¹。

抗癌剤は前述のようにリピオドールと混合したwater in oilエマルジョンとして投与する。現在用いられている抗癌剤として、adriamycin (20~40 mg/m²)、epirubicin (30~60 mg/m²)、mitomycin C、cisplatin、SMANCS (4~6 mg) などがある。Lipiodolの量は、腫瘍のサイズ、血行動態、カテーテルの位置、肝障害の程度によって異なるが³⁸、多くは3~10 mlで5 ml前後が多い。

塞栓物質としては、主としてゼラチンスポンジ細片に造影剤と少量の抗癌剤を混ぜたものを用いる。他の物質としてIvalon粒子、エ

タノール、金属コイルなどがあるが、これらの永久塞栓物質は肝動脈の再開通が生じず、反復する治療ができなくなるため通常用いない。ゼラチンスポンジパウダーは、胆管の peribiliary vascular plexus の塞栓による胆管壊死を高頻度に起こすため用いない⁴²⁾。また、化学療法の有用性はまだ確定しておらず、永久塞栓剤のみで行っている報告もある²¹⁾。

TACE後の初期効果判定としてCTは約1週間後と約1カ月後に撮影する。腫瘍内のリビオドールの残存の程度と抗腫瘍効果は関連し、1カ月以上残存している部分は壊死に陥っている場合が多い^{10,36)}。TACEの間隔は、腫瘍の反応や患者の状態からタイミングを計る方が有効とされており^{43,44)}、治療後の腫瘍マーカーとCT、MRIによって経過を観察し、肝機能と総合してTACEの時期は決定されるべきである。一般には約6カ月であるが、初回の効果不十分例や進行の早い症例では2~3カ月間隔で繰り返すこともある。逆に効果良好な場合、1年以上の間隔をおく場合もある (Recommendation III-5)。

Recommendation III-5

●単発、多発を問わず、マイクロカテーテルを用いて亜区域、区域動脈枝レベルからの塞栓を行うことが、抗腫瘍効果の向上と合併症の軽減の点から推奨される。

III. 適 応

肝細胞癌にはTACEやラジオ波焼灼術などでの局所制御が非常に有効な治療法であるが⁴⁵⁾、TACEの肝細胞癌治療への適応は、宿主と腫瘍側の因子によって評価される。

宿主の因子とは、TACE前の宿主の肝機能である。患者は、TACEによるダメージから立ち直れるだけの肝機能を持っている必要が

ある。特に腹水や黄疸が重要な予後因子である⁴⁶⁾。腹水のある症例は短期死亡例が多い⁴⁷⁾。黄疸のある症例も早期死亡例が多く、総ビリルビン値でみて2.0 mg/dl以上と悪化していれば、全肝の完全塞栓を行うのは危険である。総ビリルビン値が1.0 mg/dl以下の時はよいが、1.0~2.0 mg/dlの時は門脈血流の状態と合わせて判断すべきである。総ビリルビン値が3.0 mg/dl以上では基本的にTACEの適応はなく⁴⁸⁾、TACEは重点的な肝庇護を行って改善すれば行うべきである。静脈瘤も、TAE後に肝内の血行動態の変化から破裂しやすくなるため、重要な予後因子になる⁴⁹⁾。これらの要因を加味した肝機能の分類であるChild分類に沿って生存率が変化する⁵⁰⁾とされ、Child CではTACEは基本的には適応外であるが⁵¹⁾、最近よく行われるようになった亜区域だけの超選択的TACEであれば、高度肝障害例でも施行することができる場合がある。基本的にはperformance status 3以下、clinical stage 2以下が適応になる。心機能や腎機能低下 (クレアチニン2 mg/dl以上)、ヨードアレルギーなどのある症例は、慎重な術前後の管理のもとに行うかどうかを判断する。

腫瘍側の因子として血行動態、腫瘍型、腫瘍サイズ、腫瘍の存在範囲 (区域数)、腫瘍栓の程度、AFP値、遠隔転移の有無がTACEの予後に影響する^{36,47,49-55)}。原理で述べたごとく、TACEは多血性 (動脈支配) の腫瘍に有効である。結節型で被膜がある場合、被包発育型で動脈支配であるため²⁵⁾、TACEの良好な局所効果 (完全壊死) が期待できる^{29,53,56)}。塊状型や瀰漫型は腫瘍周辺癌部に門脈血が関与しているためTACEで完治の可能性は低い²⁹⁾、手術や局所ablation療法の適応とならない場合が多く、TACEは有効な

治療法である。

腫瘍のサイズや存在範囲では、5 cm以下もしくは3 cm以下で3個以内であれば移植での4年生存率が他の方法よりもよかったが、それ以外では他の治療法と差がなかったとされている⁵⁷⁾。特に3個を超える多発性病変では、TACE以外の局所療法は手技的に困難であり、TACEが第一選択となる。ただし原理で述べたごとく、正常肝細胞は門脈血流によってTACEのダメージを少なくできるため、門脈腫瘍栓による門脈本幹の完全閉塞例で側副血行路もない場合、TACEを行うことはできない。しかし、門脈本幹の不完全閉塞や、完全閉塞で側副血行路がある場合、あるいは、門脈右一次分枝の完全閉塞例では、肝機能によっては塞栓物質の量を少なくしたり、塞栓範囲を狭くするなどして治療を行い得る⁵⁸⁾。5 cm以上7 cm以下の大きな腫瘍の場合は移植前のTACEが再発率の低下に有効であり⁵⁹⁾、術前のdown stagingにも有効とされている⁶⁰⁾。また、UICC T1-2は肝切の方がTACEより5年生存率がよいが(56% vs 30%)、UICC T3では差はない(27% vs 23%)とされており⁶¹⁾、さらにUICC T1-2でもAFPが400 ng/ml以上では、腫瘍の再発率が上がるため⁶²⁻⁶⁴⁾、やはり生存率に差がなく、肝切可能な肝臓機能であってもTACEを選択するとの意見もある⁶¹⁾。また、腫瘍破裂は肝細胞癌の致死的要因の10%を占める¹⁾。肝細胞癌のrupture例に対しては、門脈内腫瘍塞栓の有無にかかわらず、緊急のarterial embolizationを行う。しかし総ビリルビン値が3.0 mg/dl以上の症例では予後は不良である⁶⁵⁾。

IV. 治療成績

1. 局所抗腫瘍効果

肝細胞癌に対するリピオドールを併用したTACEの直接的な効果は、塞栓後に肝切除された症例の病理組織学的検討によって証明されている⁶⁶⁻⁶⁸⁾。結節型で被膜がある場合、被包発育型で動脈支配であるため²⁵⁾、TACEの効果が望めるが、塊状型やびまん型は腫瘍周辺癌部に門脈血の関与しているため、TACEの効果があまり望めない²⁹⁾。つまり、結節型で被膜がある場合、TACE後の長期生存の可能性はある^{29,56)}。

われわれの施設で動脈塞栓後、肝切除が施行された100例の肝細胞癌症例では、29例に完全壊死が確認され、80%以上の壊死が72例にみられた。この効果は腫瘍の発育型と関連が深く、100例中、被膜をもった膨張性発育の腫瘍であった79例中66例(83.5%)が80%以上壊死であったのに対し、浸潤型の腫瘍であった21例では完全壊死はなく、80%以上壊死は21例中6例(28.5%)と明らかに少なかった⁶⁸⁾。また、主腫瘍以外のサテライトの病変や門脈腫瘍栓に関しても、塞栓の効果は不十分であった⁶⁸⁾。

TACEを区域性に選択的に行い得た症例でのみの検討では、被膜外の病変も含めて50%から80%に完全壊死がみられ^{12,13,22,69,70)}、daughterの50%、腫瘍栓の17%が壊死になるとされている²²⁾。TACEの抗腫瘍効果はリピオドールが腫瘍周囲の門脈枝に出現する程度が著明であるほど強いが、非癌部への影響もその出現の程度に応じ強くみられる³⁷⁾。松井らは4 cm以下の血管造影(DSA)で明瞭な濃染を示す腫瘍の亜区域からのTACE後の局所再発率は4年で33%報告しているが^{12,13)}、高安らは2.5 cm以下では40%以下

表1 TAEでの生存率 randomized controlled trials

	N (TACE/非治療)	survival % (TACE/非治療)			
		1	2	3	4 (y)
Pelletier, France, 1990 (Ref.72)			21/21	24/31	
Grouped' Etude Francophone, France, 1995 (Ref.73)	50/46	62/44	38/26	NA	NA
Bruix, Spain, 1998 (Ref.74)	40/40	NA	49/50	NA	13/27
Lo, Hong Kong, 2002 (Ref.35)	40/39	57/32	31/11	26/3	NA
Llovet, Spain, 2002 (Ref.75)	40/35	82/63	63/27	NA	NA

表2 TAEでの生存率 (本邦報告)

	N	対象	survival %		
			1Y-	3Y	5Y
Nishimura, Nara, 1991 (Ref.77)	863	1980～1989年 5 cm未満38 % 門脈浸潤32 %	61	22	7
Nakao, Hyogo, 1992 (Ref.76)	1,058 108	1977～1990年 3 cm以下の小肝癌	70 79	29 34	5 9
自験例, Osaka, 1994 (Ref.24)	443 215/228	1979～1986年 Lip (+) / (-)	56 13/3	18	8
Matsui, Kanazawa, 1994 (Ref.12,13)	82	4 cm以下, 2個以内 結節型	100	78	53
Nishimine, Nara, 1992 (Ref.78)	98	平均3.8 cm, 単発79 % 同一区域に存在	89	59	30
Takayasu, Tokyo, 2001 (Ref.14)	54	5 cm以下, 2個以内 angio-CT使用	93	77	NA
自験例, Osaka, 2003 (1994～2000年)	93	5 cm以下, 2個以内 Child A Child B	100 100 100	79 84 73	53 58 46
肝癌研究会, 2002 (1998～1999) (Ref.1)	17,821		73	38	21

であるが2.5～5.0 cmでは2年で61%と報告している¹⁴⁾。また、大きな腫瘍(5 cm以上)の完全壊死は17%しかない⁷¹⁾との報告もある。しかしこれらの腫瘍はTACEを繰り返す

ことで対応できる場合も多い¹²⁻¹⁴⁾。

また、血管造影で血流の乏しい早期の肝細胞癌は、リピオドールの停滞がみられず、塞栓の効果はほとんどないとされている⁷²⁾

(Recommendation III-6).

Recommendation III-6

●動脈血流に乏しい肝細胞癌に対してはTACEを行うべきではない。

2. 生存率

TACE施行後、外科的切除を行わずTACEを繰り返した肝細胞癌症例の生存率の代表的な報告を表1, 2に示した^{1,12-14,24,36,73-79}。表1はRandomized control trials (RCT) のデータであり、表2は本邦の代表的なデータである。

1980年代にTACEを行った443例の自験例の治療成績を累積生存率で見ると、1年56.3%、2年33.3%、3年18.3%、4年11.8%、5年8.0%であった²⁴。リピオドール使用の有無で分けて累積生存率を検討すると、リピオドールを用いないTACEで治療した群(228症例)では、5生率3.4%、リピオドールを用いたTACEで治療した群(215症例)では、5生率12.9%と、リピオドールを使用した方が治療成績は向上していた²⁴。TACEにおけるリピオドールの有用性は他施設からも報告されている^{9,10,23,24,77,78}。

TACE後5年以上生存した自験例の29症例を調べたところ、肝細胞癌の肉眼分類で見ると、単結節型16例、多結節型10例、塊状型3例であった。Child分類で見ると、Child A: 23例、Child B: 2例、Child C: 3例であった。リピオドールは、23例(79%)に用いられ、平均5.5 mlであった。治療回数は1~6回で、平均3.3回であった。つまり、結節型で、肝機能が比較的良い症例、言い換えると、TACEによく反応して、もし再発してもTACEを繰り返せる症例で長期予後が期待できる。

区域性あるいは亜区域性のTACEを行えた

症例は、肝機能低下が抑えられ、生存率は通常のTACEよりも良好であるとされている(表2)^{12-14,43}。区域性のTACEの成績では、西峯らも98例で1年89%、2年69%、3年59%、5年30%と報告し、この中でも3 cm以下、結節型では1年100%、2年85%、3年および4年73%としている⁷⁹。松井らは4 cm以下Child Cを除いた82例に対して行った亜区域性のTACE後の生存率は、1年100%、2年93%、3年73%、5年53%と報告している^{12,13}。自件例では、3亜区域まで、腫瘍サイズ制限なし(最大8 cm) Child Cを含む57例の成績で、1年87%、2年66%、3年57%、5 cm以下2個以下Child Cを除いた93例で、1年100%、3年79%、5年53%であった。またChild分類、T分類で分けると、Child Aで1年100%、3年84%、5年58%、Child Bで1年100%、3年73%、5年46%、T1で1年100%、3年93%、5年66%、T2で1年100%、3年93%、5年61%、T3で1年100%、3年78%、5年21%であった。これらの成績は、肝切除に匹敵するものであり¹⁾、また、腫瘍内にリピオドールが良好に貯留した場合の生存率は肝切除術と有用性に差がないとの報告もあり³⁶⁾、多血性の肝細胞癌で担癌区域にカテーテルを挿入できる場合、TACEも考慮されるべき治療法ともいえるが、小肝癌のTACE後の局所再発率は手術や局所ablation療法に比べて高率なので、これらの治療法で全腫瘍が治療可能な場合は第一選択とはならない。

1990年代に行われたRCTでは、切除不能肝癌へのTACEは全身対症療法に比して生存率の延長に貢献しなかったという報告が多い^{33,73-76}。しかし、これらのRCTにはいくつかの問題がある。病変が進行して状態の悪い患者が多く含まれている。TACEを、再発

を確認した症例だけでなく、予定の回数が終わるか、死ぬまで、一定の期間ごとに繰り返している^{36,73-76)}、また、肝動脈起始部から10 ml以上のリピオドールを使って^{73,74)}、塞栓が行われている。多施設試験では症例の少ない施設が多数含まれており、技術的な問題も考えられる⁷⁴⁾などである。これらの方法は、肝臓の萎縮を引き起こし、肝機能に悪い影響を及ぼしうる⁸⁰⁾。腫瘍の反応や患者の状態から、TACEのタイミングを計る方が有効である^{43,44)}。日本では、現在TACEは多発例でもマイクロカテーテルを用いてできるだけ区域または亜区域性に行われ、局所や他部位再発が見つかったときにのみ、繰り返し行われる。また、リピオドールエマルジョンは腫瘍サイズや血流に合わせて調整される。前記の報告されているRCTは、われわれが行っているTACEとはかなり異なり、その成績は鵜呑みできるものではない。

さらに、2002,2003年には、過去のRCTのmeta-analysisで、TACEが2年生存率を延ばすとの報告も出てきている^{81,82)} (Recommendation III-7)。

Recommendation III-7

●小肝癌のTACE後の局所再発率は手術や局所ablation療法に比べて高率なので、これらの治療法で全腫瘍が治療可能な場合は第一選択とはならない。

V. 副作用

塞栓化学療法後には一般に、50%以上で一過性の嘔気、嘔吐、上腹部痛、熱発などを生じる。また、非癌部肝実質への影響により、多少の肝機能障害がみられる^{13,14)}。GOT、GPT、LDH活性、総ビリルビン値などが術直後に上昇するが、約10日で術前値に復す

ることが多い。コリンエステラーゼ、血清アルブミン値は、術後徐々に低下し、2週目前後に最低値となり、4週目前後に回復する傾向がみられる。これらの肝機能障害は、一過性であることが多いが、肝機能が悪いほど、また、門脈浸潤の程度が強いほど注意が必要であり、予想に反して肝不全まで進むこともある。胆嚢動脈の塞栓による胆嚢梗塞は、避けがたい場合があり、熱発、腹痛を生じるが、重篤になることは少ない⁸³⁾。しかし、胆嚢梗塞に細菌感染を伴えば、気腫性胆嚢炎を生じ得る⁸⁴⁾。胆管のperibiliary vascular plexusの塞栓による胆管壊死からbilomaが形成されるが^{85,86)}、この場合も感染を伴えばabscessとなる。脾、胆道系の外科手術などが原因でpneumobiliaがみられる場合も、塞栓後の非癌部壊死巣がabscessとなることがある⁸⁷⁾。区域・亜区域動脈塞栓化学療法では、一般に副作用は軽微となるが^{13,14)}、リピオドールが門脈に流入し、非癌部の肝組織の梗塞、壊死が生じる時には、塞栓範囲によっては、副作用は必ずしも軽微ではない。肝障害だけでなく、壊死物質の急激な放出による一過性の腎不全も起こり得る。

以上の他に、技術的に避けねばならない副作用として、脾梗塞⁸⁸⁾、脾壊死⁸⁹⁾、胃十二指腸潰瘍があげられる。自件例では重篤な副作用はbilomaとタコツボ心筋炎などが約0.1%の頻度でみられた。

おわりに

肝細胞癌に対するTACEは、適応や方法を誤らなければ安全で、効果的な治療法である。特に、大きな腫瘍の術前の減量や、門脈腫瘍栓を伴わない多発性の病変に積極的に用いられる。また、亜区域性のTACEが可能な多血性の小肝癌では肝切除にも劣らない生存率を

期待できる。

謝辞：この稿の執筆にあたり、貴重なご意見やデータをいただいた、福岡大学放射線科 岡崎正敏先生、金沢大学放射線科 松井 修先生、林 紀夫先生をはじめとする大阪大学医学部附属病院消化器内科の諸先生方、中村仁信先生および桑原雅知先生をはじめとする同病院放射線科の諸先生方に深く感謝いたします。

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)。2002
- 2) Ikeda K, Saitoh S, Koida I et al : A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 18 : 47-53, 1993
- 3) Nagasue N, Uchida M, Makino Y et al : Incidence and factors associated with intrahepatic recurrence following resection of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 105 : 488-494, 1993
- 4) Doyon D, Mouzon A, Jourde AN et al : L'embolisation artérielle hépatique dans les tumeurs malignes du foie. *Ann Radiol* 17 : 593-603, 1974
- 5) Yamada R, Sato M, Kawabata M et al : Hepatic artery embolization in 120 patients with unresectable hepatoma. *Radiology* 148 : 397-401, 1983
- 6) Nakamura K, Tashiro S, Hiraoka T et al : Hepatocellular carcinoma and metastatic cancer detected by iodized oil. *Radiology* 154 : 15-17, 1985
- 7) Ohishi H, Uchida H, Yoshimura H et al : Hepatocellular carcinoma detected by iodized oil: use of anticancer agents. *Radiology* 154 : 25-29, 1985
- 8) Yumoto Y, Jinno K, Tokuyama K et al : Hepatocellular carcinoma detected by iodized oil. *Radiology* 154 : 19-24, 1985
- 9) Kasugai H, Kojima J, Tatsuta M et al : Treatment of hepatocellular carcinoma by transcatheter arterial embolization combined with intraarterial infusion of a mixture of cisplatin and ethiodized oil. *Gastroenterology* 97 : 965-971, 1989
- 10) Nakamura H, Hashimoto T, Oi H et al : Transcatheter oily chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *Radiology* 170 : 783-786, 1989
- 11) Vetter D, Wenger JJ, Bergier JM et al : Transcatheter oily chemoembolization in the management of advanced hepatocellular carcinoma in cirrhosis: results of a western comparative study in 60 patients. *Hepatology* 13 : 42-433, 1991
- 12) Masui O, Kadoya M, Yoshikawa J et al : Subsegmental transcatheter arterial embolization for small hepatocellular carcinoma: local therapeutic effect and 5-year survival rate. *Cancer Chemother Pharmacol* 33 (Suppl) : S84-S88, 1994
- 13) Matsui O, Kadoya M, Yoshikawa J et al : Small hepatocellular carcinoma: Treatment with subsegmental transcatheter arterial embolization. *Radiology* 188 : 79-83, 1993 .
- 14) Takayasu K, Muramatsu Y, Maeda T et al : Targeted transarterial oily chemoembolization for small foci of hepatocellular carcinoma using a unified helical CT and angiography system: Analysis of factors affecting local recurrence and survival rates. *AJR* 176 : 681-688, 2001 .
- 15) Breedis C, Young G : The blood supply of neoplasms in the liver. *Am J Pathol* 30 : 969-977, 1954
- 16) Chuang VP, Wallace S : Hepatic artery embolization in the treatment of hepatic neoplasms. *Radiology* 140 : 51-58, 1981
- 17) Katyal S, Oliver JH, Peterson MS et al : Prognostic significance of arterial phase CT for prediction of response to transcatheter arterial chemoembolization in unresectable hepatocellular carcinoma: A retrospective analysis. *AJR* 175 : 1665-1672, 2001
- 18) Ebied OM, Federle MP, Carr BI et al : Evaluation of response to chemoembolization in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97 : 1042-1050, 2003
- 19) Konno T, Maeda H, Iwai K et al : Effect of arterial administration of high molecular weighted anticancer agent SMANCS with lipid lymphographic agent on hepatoma: A preliminary report. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19 : 1053, 1983
- 20) 佐藤守男, 山田龍作 : 肝細胞癌に対する肝動脈塞栓治療法の基礎的臨床的検討. *日本医放会誌* 43 : 977-1004, 1983
- 21) Brown KT, Nevins AB, Getrajdman GI et al : Particle embolization for hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 9 : 822-828, 1998
- 22) Takayasu K, Shima Y, Muramatsu Y et al : Hepatocellular carcinoma: treatment with intraarterial iodized oil with and without chemotherapeutic agents. *Radiology* 162 : 345-351, 1987



- 23) 大石 元, 打田日出男, 大上庄一, 他: 肝細胞癌に対する抗癌剤混入Lipiodol併用TAEによる診断と塞栓効果—肝切除例からみた検討—. 肝臓 27: 28-35, 1986
- 24) Nakamura H, Mitani T, Murakami T et al: Five year survival after trans catheter chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 33: 89-92, 1994
- 25) Choi BI, Kim HC, Han JK et al: Therapeutic effect of transcatheter oily chemoembolization therapy for encapsulated nodular hepatocellular carcinoma: CT and pathologic findings. *Radiology* 182: 709-713, 1992
- 26) Sugihara S, Kojiro M, Nakashima T: Ultrastructural study of hepatocellular carcinoma with replacing growth pattern. *Acta Pathol Jpn* 35: 549-559, 1985
- 27) Nakamura H, Tanaka T, Hori S et al: Transcatheter embolization of hepatocellular carcinoma: assessment of efficacy in case of resection following embolization. *Radiology* 147: 401-405, 1983
- 28) Kuroda C, Sakurai M, Monnden M et al: Limitation of transcatheter arterial chemoembolization using iodized oil for small hepatocellular carcinoma: a study in resected cases. *Cancer* 67: 81-86, 1991
- 29) Lee HS, Kim JS, Choi IJ et al: The safety and efficacy of transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of patients with hepatocellular carcinoma and main portal vein obstruction. *Cancer* 79: 2087-2094, 1997
- 30) Higashi S, Shimizu M, Nakashima T et al: Arterial-injection chemotherapy for hepatocellular carcinoma using monodispersed poppy-seed oil microdroplets containing fine aqueous vesicles of epirubicin. *Cancer* 75: 1245-1254, 1995
- 31) Miller DL, O'Leary TJ, Girton M: Distribution of iodized oil within the liver after hepatic arterial injection. *Radiology* 162: 849-852, 1987
- 32) Kan Z, Ivancev K, Hagerstrand I et al: In vivo microscopy of the liver after injection of Lipiodol into the hepatic artery and portal vein in the rat. *Acta Radiologica* 30: 419-425, 1989
- 33) Nakamura H, Hashimoto T, Oi H et al: Iodized oil in the portal vein after arterial embolization. *Radiology* 167: 415-417, 1988
- 34) Terayama N, Matsui O, Gabata T et al: Accumulation of iodized oil within the non-neoplastic liver adjacent to hepatocellular carcinoma via the drainage routes of the tumor after transcatheter arterial embolization. *Cardiovasc Intervent Radiol* 24: 383-387, 2001
- 35) Nakamura H, Hashimoto T, Oi H et al: Treatment of hepatocellular carcinoma by segmental hepatic artery injection of adriamycin-in-oil emulsion with overflow to segmental portal veins. *Acta Radiol* 31: 347-349, 1990
- 36) Lo CM, Ngan H, Tso WK et al: Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35: 1164-1171, 2002
- 37) 長谷川正和, 佐古正雄, 広田省三, 他: 肝細胞癌に対する動脈塞栓療法の臨床的研究—各種塞栓剤による治療効果並びに肝予備能に及ぼす影響—. 日本医放会誌 48: 328-341, 1988
- 38) Matsuo N, Uchida H, Sakaguchi H et al: Optimal lipiodol volume in transcatheter arterial chemoembolotherapy for hepatocellular carcinoma: study based on lipiodol accumulation patterns and histopathologic findings. *Semin Oncol* 24 (suppl 6): 61-70, 1997
- 39) Oi H, Kim T, Kishimoto H et al: Effective cases of transcatheter arterioportal chemoembolization with high-dose iodized oil for hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 33 (Suppl): 69-73, 1994
- 40) Murakami T, Oi H, Hori M et al: Helical CT during arterial portography and hepatic arteriography for detecting hypervascular hepatocellular carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 169: 131-135, 1997
- 41) Okazaki M, Higashihara H, Ono H et al: Chemoembolization for hepatocellular carcinoma via the inferior pancreaticoduodenal artery in patients with celiac artery stenosis. *Acta Radiol* 34: 20-25, 1993
- 42) Makuuchi M, Sukigara M, Mori et al: Bile duct necrosis: complication of transcatheter hepatic arterial embolization. *Radiology* 156: 331-334, 1985
- 43) Ernst O, Sergent G, Mizrahi D et al: Treatment of hepatocellular carcinoma by transcatheter arterial chemoembolization: comparison of planned periodic chemoembolization and chemoembolization based on tumor response. *AJR Am J Roentgenol* 172: 59-64, 1999
- 44) Ikeda K et al: Effect of repeated transcatheter arterial embolization on the survival time in patients with hepatocellular carcinoma: an analysis by the

- Cox proportional hazards model. *Cancer* 68 : 2150-2154, 1991
- 45) Trevisani F, D'Intino PE, Caraceni P et al : Etiologic factors and clinical presentation of hepatocellular carcinoma. Differences between cirrhotic and noncirrhotic Italian patients. *Cancer* 75 : 2220-2232, 1995
 - 46) 畑中義美, 山下康行, 荒川昭彦, 他 : 進行肝細胞癌に対するIVR: 切除不能肝細胞癌の肝動脈塞栓療法による予後因子. *IVR* 10 : 253-256, 1995
 - 47) 山田昌信 : 肝細胞癌患者における肝動脈塞栓術の予後に関する研究—ロジスチック・モデルとCoxの比例ハザードモデルによる解析—. *肝臓* 28 : 898-910, 1987
 - 48) 岡崎正敏, 東原秀行, 小金丸史隆, 他 : 肝細胞癌に対する肝動脈塞栓術-切除不能例を中心に. *臨放* 36 : 529-534, 1991
 - 49) 貫野 徹, 金 稿俊, 栗岡成人, 他 : 数量化II類による肝動脈塞栓術施行肝癌の予後因子の解析. *日消誌* 83 : 1483-1488, 1986
 - 50) Yang CF, Ho YJ : Transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 31 (Suppl): 86-88, 1992
 - 51) 吉川正治, 磯村伸治, 江原正明, 他 : 肝細胞癌に対する肝動脈塞栓法の治療効果. *外科診療* 30 : 1062-1068, 1988
 - 52) 高田恵二 : 原発性肝細胞癌に対する経カテーテル治療の適応と選択に関する研究. *肝臓* 35 : 496-508, 1994
 - 53) 磯村伸治, 江原正明, 大藤正雄, 他 : 肝細胞癌に対する肝動脈塞栓療法の有用性—背景因子にみた長期予後の検討—. *肝臓* 32 : 604-612, 1991
 - 54) Cholebowski RT, Tong M, Weissman J et al : Hepatocellular carcinoma: diagnostic and prognostic features in north American patients. *Cancer* 53 : 2701-2706, 1984
 - 55) Calvet X, Bruix J, Gines P et al : Prognostic factors of hepatocellular carcinoma in the West amultivariate analysis in 206 patients. *Hepatology* : 753-760, 1990
 - 56) Imaeda T, Yamawaki Y, Seki M et al : Lipiodol retention and massive necrosis after lipiodol-chemoembolization of hepatocellular carcinoma: Correlation between computed tomography and histopathology. *Cardiovasc Intervent Radiol* 16 : 209-213, 1993
 - 57) Mazzaferro V, Regalia E, Doci R et al : Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334 : 693-699, 1996
 - 58) Okazaki M et al : Chemoembolization. In: Livraghi T et al, ed. *Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma*. Greenwich Medical Media, London, pp307-326, 1997
 - 59) Roayaie S, Frischer J, Emre S et al : Long-term results with multimodal adjuvant therapy and liver transplantation for the treatment of hepatocellular carcinomas larger than 5 centimeter. *Ann Surg* 235 : 533-539, 2002
 - 60) Harada T, Matsuo K, Inoue T et al : Is preoperative hepatic arterial chemoembolization safe and effective for hepatocellular carcinoma? *Ann Surg* 224 : 4-9, 1996
 - 61) Lee HS, Kim KM, Yoon JH et al : Therapeutic efficacy of transcatheter arterial chemoembolization as compared with hepatic resection in hepatocellular carcinoma patients with compensated liver function in a hepatitis B virus-endemic area: A prospective cohort study. *J Clin Oncol* 20 : 4459-4465, 2002
 - 62) Chen MF, Hwang TL, Jeng LB et al : Postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma: Two hundred five consecutive patients who underwent hepatic resection in 15 years. *Arch Surg* 129 : 738-742, 1994
 - 63) Ikeda Y, Kajiyama K, Adachi E et al : Early recurrence after surgery of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 42 : 469-472, 1995
 - 64) Kumada T, Nakano S, Takeda I et al : Patterns of recurrence after initial treatment in patients with small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25 : 87-92, 1997
 - 65) Okazaki M, Higashihara H, Koganemaru F et al : Intraperitoneal hemorrhage from hepatocellular carcinoma. Emergency chemoembolization or embolization. *Radiology* 180 : 647-651, 1991
 - 66) Sasaki Y, Imaoka S, Kasugai H et al : A new approach to chemoembolization therapy for hepatoma, using ethiodized oil, cisplatin and gelatin sponge. *Cancer* 60 : 1194-1203, 1987
 - 67) Takayasu K, Shima Y, Muramatsu Y et al : Hepatocellular carcinoma: treatment with intraarterial iodized oil with and without chemotherapeutic agents. *Radiology* 163 : 345-351, 1987
 - 68) Hashimoto T, Nakamura H, Hori S et al : Hepatocellular carcinoma: Efficacy of Transcatheter oily chemoembolization in relation to macroscopic and microscopic patterns of tumor

- growth among 100 patient with partial hepatectomy. *Cardiovasc Intervent Radiol* 18 : 82-86, 1995
- 69) Nakamura H, Hori S, Kozuka T et al : Transcatheter treatment of localized hepatocellular carcinoma: segmental arterioportal chemoembolization. *Reg Cancer Treat* 5 : 102-105, 1992
- 70) Matsuo N, Uchida H, Nishimine K et al : Segmental transcatheter hepatic artery chemoembolization with iodized oil for hepatocellular carcinoma: Antitumor effect and influence on normal tissue. *JVIR* 4 : 543-549, 1993
- 71) Fan J, Tang ZY, Y Yu et al : Improved survival with resection after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) for unresectable hepatocellular carcinoma. *Dig Surg* 15 : 674-678, 1998
- 72) Takayasu K, Wakao F, Moriyama N et al : Response of early-stage hepatocellular carcinoma and borderline lesions to therapeutic arterial embolization. *AJR* 160 : 301-306, 1993
- 73) Pelletier G, Ducreux M, Gay F et al : Treatment of unresectable hepatocellular carcinoma with lipiodol chemoembolization: a multicenter randomized trial. *Groupe CHC. J Hepatol* 29 : 129-134, 1998
- 74) Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire. A comparison of lipiodol chemoembolization and conservative treatment for unresectable hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 332 : 1256-1261, 1995
- 75) Bruix J, Llovet JM, Castells A et al : Transarterial embolization versus symptomatic treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized, controlled trial in a single institution. *Hepatology* 27 : 1578-1583, 1998
- 76) Llovet JM, Real MI, Montana X et al : Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet* 359 : 1734-1739, 2002
- 77) Nakao N, Uchida H, Kamino K et al : Effectiveness of lipiodol in transcatheter arterial embolization of hepatocellular carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 31 (Suppl) : 72-76, 1992
- 78) 西村幸洋, 打田日出男, 郭啓勇, 他 : 肝細胞癌1075例に対する肝動脈塞栓術—特に累積生存率と3年以上生存69例からみた抗癌剤混入リビ
オドール併用の評価—。 *日癌治* 26 : 2279-2280, 1991
- 79) Nishimine K, Uchida H, Matsuo N et al : Segmental transarterial chemoembolization with Lipiodol mixed with anticancer drugs for nonresectable hepatocellular carcinoma: follow-up (CT) and therapeutic results. *Cancer Chemother Pharmacol* 33 (Suppl) : 60-68, 1994
- 80) Yamashita Y, Torashima M, Oguni T et al : Liver parenchyma changes after transcatheter arterial embolization therapy for hepatoma: CT evaluation. *Abdom Imaging* 18 : 352-356, 1993
- 81) Llovet MJ, Bruix J : Systemic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 37 : 429-442, 2003
- 82) Camma C, Schepis F, Orlando A et al : Transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Radiology* 224 : 47-54, 2002
- 83) Kuroda C, Iwasaki M, Tanaka T et al : Gallbladder infarction following hepatic transcatheter arterial embolization: angiographic study. *Radiology* 149 : 85-89, 1983
- 84) Nakamura H, Kondoh H : Emphysematous cholecystitis: Complication of hepatic artery embolization. *Cardiovasc Intervent Radiol* 9 : 152-153, 1986
- 85) Doppman JL, Dunnick NR, Girton M et al : Bile duct cysts secondary to liver infarcts: report of a case and experimental production by small vessel hepatic artery occlusion. *Radiology* 130 : 1-5, 1979
- 86) Inoue Y, Nakamura H, Takashima S et al : Bileoma following transcatheter oily chemoembolization. *Radiation Medicine* 9 : 57-60, 1991
- 87) Hashimoto T, Mitani T, Nakamura H et al : Fetal septic complication of transcatheter chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 16 : 325-327, 1993
- 88) Takayasu K, Moriyama N, Muramatsu Y et al : Splenic infarction a complication of transcatheter hepatic arterial embolization for liver malignancies. *Radiology* 151 : 371-375, 1984
- 89) Furui S, Otomo K, Itai Y et al : Hepatocellular carcinoma treated by transcatheter arterial embolization: progress evaluated by computed tomography. *Radiology* 150 : 773-778, 1984

Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma: Relevance to tumor dedifferentiation

BAZARRAGCHAA DAMDINSUREN¹, HIROAKI NAGANO¹, MOTOI KONDO¹, HIROFUMI YAMAMOTO¹, NOBUAKI HIRAOKA¹, TAMEYOSHI YAMAMOTO¹, SHIGERU MARUBASHI¹, ATSUSHI MIYAMOTO¹, KOJI UMESHITA¹, KEIZO DONO¹, SHOJI NAKAMORI¹, KEN-ICHI WAKASA², MASATO SAKON¹ and MORITO MONDEN¹

¹Department of Surgery and Clinical Oncology, Graduate School of Medicine, Osaka University;

²Department of Clinical Pathology, Osaka City University Medical School, Osaka, Japan

Received May 18, 2004; Accepted August 9, 2004

Abstract. Several studies reported that Id (Inhibitor of DNA binding or Differentiation) proteins, helix-loop-helix transcription factors, have important roles in differentiation, cell cycle and angiogenesis in various cells. However, the role of Id proteins in hepatocellular carcinoma (HCC) remains unclear. We examined the immunohistochemical expression of Id1, Id2 and Id3 proteins in 54 surgically resected HCCs with surrounding HCV or HBV-related chronic hepatitis (n=30) and liver cirrhosis (n=24). All non-cancerous livers exhibited immunoreactivity for Id proteins and the expression increased from chronic hepatitis to cirrhosis. In HCCs (n=45), well-differentiated tumors mostly exhibited strong or moderate immunostaining for all Id proteins, while proportion of the samples with weak or no expression increased with tumor dedifferentiation and frequently observed in poorly (66.7, 93.3 and 93.3% respectively for Id1, 2, 3) or undifferentiated (100% for all Ids) HCCs. Clinicopathological survey demonstrated a significant correlation between Id1, 2 and 3 expression and differentiation of carcinoma (p=0.0044, 0.0014 and 0.0014, respectively) although univariate analysis indicated that high expression of Id1 was significant predictive factor for longer disease-free survival of the patients (p=0.047). A similar tendency was also observed with Id2 and Id3. The present study demonstrate high expression of Id1, 2 and 3 in well-differentiated HCC and low expression in advanced dedifferentiated HCC, in contrast to its continuous expression during breast, prostate and colon carcinogenesis. These findings suggested that Id1, 2 and 3 might play a role in the early stages of hepatocarcinogenesis, but not in the

development of advanced carcinoma, and might consequently be related to HCC dedifferentiation.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies worldwide, with an estimated more than half a million new cases per year, most of which occur in Asia and Africa (1). The incidence of HCC is increasing worldwide, and especially in the USA and Europe, during the past decade. The prognosis of HCC is generally poor and the 5-year survival rate is limited to 33-44% after surgery (2). Many investigators have reported a putative link between development of HCC and chronic viral infection and/or liver cirrhosis. Hepatic cirrhosis is observed in 80% of patients with HCC, and the major risk factor for HCC is infection with hepatitis B virus (HBV) or C virus (HCV), respectively 20-70% or 10-70% depending on geographic location (1). These findings strongly indicate the existence of a link between cancer formation via HCV and/or HBV infection and persistent liver inflammation and fibrosis. Therefore, the investigation of the molecular and cellular processes which might be involved in hepatocarcinogenesis and tumor progression may offer both a better understanding of the biology of this disease and provide new possibilities for its treatment.

Inhibitors of DNA binding or differentiation (Id) proteins belong to a helix-loop-helix family of transcription factors, which play fundamental roles in the control of developmental processes (3). Four Id proteins, originally designated Id1 through Id4, have been identified in humans (4-8). Recent studies have revealed much wider biological roles for the Id family of regulatory proteins, that impinge on the fields of developmental biology, cell cycle research, and tumor biology, including important roles in oncogenesis (reviewed in refs. 9-11). Indeed, deregulated expression of Ids has been reported in several primary human tumors such as pancreatic, breast cancers, colorectal adenocarcinoma, ovarian, prostate, neuronal tumors and squamous cell carcinomas (12-18).

However, the role of Id proteins in HCC remains unclear. During the preparation of the manuscript, other investigator showed that Id1 expression was increased in 87.1% surgically

Correspondence to: Dr Hiroaki Nagano, Department of Surgery and Clinical Oncology (E2), Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
E-mail: hnagano@surg2.med.osaka-u.ac.jp

Key words: Id protein; HCC, non-tumor liver, immunohistochemistry

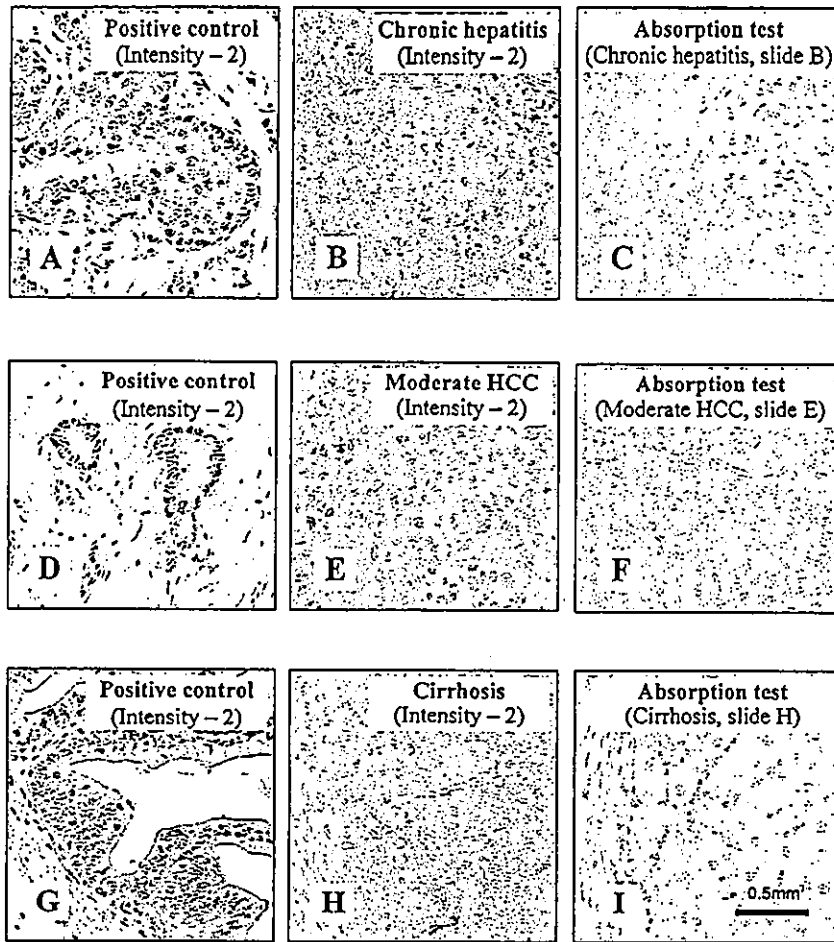


Figure 1. Positive control and antibody specificity test for Id1 (A-C), Id2 (D-F) and Id3 (G-I) proteins. Tissue processing, immunostaining and intensity evaluation were performed as described in Materials and methods. For positive controls, sections of breast cancer expressing Id1 protein (A) (14), and sections of pancreatic cancer expressing Id2 (D) or Id3 protein (G) (12) were included in the respective staining procedures. The positive controls displayed moderate (intensity-2) cytoplasmic staining. Pre-absorbed antibodies with an excess amount of Id1-, Id2- or Id3-specific blocking peptides, completely abolished immunostaining on the sections of the respective primary antibody (C is the absorption test of B for Id1 antibody; F, the absorption test of E for Id2 antibody; and I, the absorption test of H for Id3 antibody). In the negative controls, when the primary antibodies were substituted by TBS, no staining was observed (data not shown). (Original magnification x400).

resected specimens of HCC (19). The present study extends their findings. We examined Id1, Id2 and Id3 expression and those correlations with clinicopathological factors in HCCs with surrounding HCV or HBV-related chronic hepatitis and liver cirrhosis.

Materials and methods

Patients and tissue samples. Formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissue specimens were prepared from 54 patients with HCC (44 males and 10 females; ranging in age from 36 to 76 years; mean, 61.0 years), who underwent hepatectomy at the Department of Surgery and Clinical Oncology, Osaka University between 1994 and 2000. Most of the patients (87%) had either HCV infection (29 patients) or HBV infection (16 patients) and 2 patients had concomitant infection with HCV and HBV. Adjacent non-tumor liver tissues were either chronic hepatitis (n=30) or liver cirrhosis (n=24). Of the carcinoma tissues, 45 of 54 HCCs were evaluated, because 9 samples of HCC were found to be completely necrotic, due to preoperative transarterial embolization therapy. Based on histopathological examination 8 cases were diagnosed as

well-differentiated, 18 as moderately-differentiated, 15 cases as poorly-differentiated and 4 cases as undifferentiated HCC. The study protocol was approved by the Human Ethics Review Committee of Osaka University, Graduate School of Medicine and a signed consent form was obtained from each subject.

Antibodies. Specific rabbit anti-human Id1 (sc-488), Id2 (sc-489) and Id3 (sc-490) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) polyclonal antibodies were used for immunohistochemistry and Western blotting. These affinity-purified rabbit polyclonal antibodies specifically react with the carboxy terminus of the respective Id1, Id2 and Id3 protein. Blocking peptides for Id1 (sc-488P), Id2 (sc-489P) and Id3 (sc-490P) (Santa Cruz Biotechnology) were used for absorption tests.

Western blot analysis. Approximately 50 mg of liver tissue was homogenized in 0.5 ml ice-cold RIPA buffer [25 mM Tris (pH 7.5), 50 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 2% Nonidet P-40, 0.2% sodium dodecyl sulfate, 1 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride and 500 KIE/ml 'Trasyolol'® proteinase-inhibitor (Bayer Leverkusen, Germany)] and centrifuged at 14000 rpm at 4°C for 15 min. Supernatant

protein was collected, and total protein concentration was determined using Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Western blot analysis was performed as described in our previous study (20). Briefly, 50 µg of total protein was mixed with loading buffer, boiled for 5 min and separated by 15% polyacrylamide gel electrophoresis. Then protein was transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane using a transblot apparatus. After blocking in 10% skim milk in 0.1% Tween-20 - Tris-Buffered Saline (TBS) with 0.1% Tween-20, the membrane filter was incubated overnight with the 1:100 diluted anti-Id1, -Id2 or -Id3 antibodies at 4°C. The membranes were probed with 1:2000 diluted goat anti-rabbit coupled to horseradish peroxidase antibody (HRP; Dako, Denmark) for 1 h. The protein bands were visualized using an enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham, Buckinghamshire, UK), according to the instructions provided by the manufacturer. As a reference protein, actin was immunoblotted in the same protein extracts using rabbit anti-human actin polyclonal antibody (A-2066; Sigma, St. Louis, MO). The amount of actin in the protein extracts did not change (data not shown). The expressions of the proteins were evaluated by measuring optical densities of the protein bands, using NIH Image 1.61 software (National Institutes of Health; Bethesda, MD) and the expression value was calculated as compared to the actin band.

Immunohistochemistry. Formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissues were sliced (4-µm thick), placed on microscope glass slides and subjected to immunostaining using an Avidin Biotin Complex (ABC) technique, as described previously (21). Where indicated, immunostaining for all three Id proteins was performed on serial sections. In brief, the sections were deparaffinized in xylene, rehydrated, boiled in antigen retrieval buffer (21) and washed with water. They were then treated with 1% hydrogen peroxide in methanol for 20 min to inhibit endogenous peroxidase. After incubation with 10% normal goat serum for 20 min to block non-specific binding, the sections were incubated for 16 h at 4°C with one of the indicated primary antibodies. The antibodies to Id1 and Id3 were used at a concentration of 4 µg/ml, and the antibody to Id2 was used at 2 µg/ml. Detection of bound antibodies was performed using the peroxidase from the Dako EnVision+™ Systems kit (Dako, Carpinteria, CA) according to the instructions supplied by the manufacturer. Between incubations, sections were washed several times with phosphate-buffered saline. The peroxidase reaction was visualized by applying 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride in 0.05 M Tris-buffer (pH 7.6) with 0.005% hydrogen peroxide for 2 min. The sections were then counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, cleared and mounted.

For negative controls, TBS was used as a substitute for the primary antibody to verify the possibility of false positive responses from the secondary antibody, and no staining was observed. For positive controls, sections of breast cancer expressing Id1 protein (14), and sections of pancreatic cancer expressing Id2 or Id3 protein (12) were included in the respective staining procedures (respectively shown on Fig. 1A, D and G). The positive controls displayed moderate cytoplasmic staining in each respective Id immunohisto-

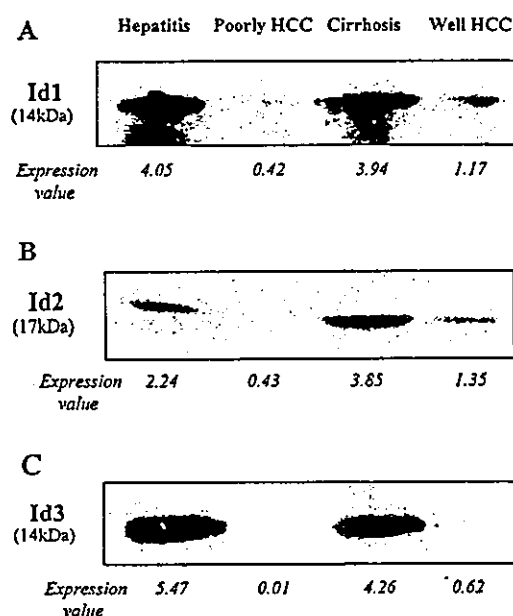


Figure 2. Western blot analysis for Id proteins. Two paired non-tumor liver and HCC tissues were examined for Id1 (A), Id2 (B) and Id3 (C) protein expression. The non-tumor tissues with cirrhosis and chronic hepatitis expressed clear bands for all Id proteins. The well-differentiated HCC expressed Id1 and Id2 at a modest level (A and B) and a faint signal was detected for Id3 (C), but the poorly-differentiated HCC did not express Id3 (C) or a slight band appeared for Id1 and Id2 (A and B). The expression value of Id protein band to actin band was analyzed densitometrically (lower panel). When pre-absorbed antibodies (by respective blocking peptides) were applied to the transferred membrane, no bands appeared on the blots (data not shown).

chemical staining. In addition, pre-absorbed antibodies with an excess amount of Id1-, Id2- or Id3-specific blocking peptides, completely abolished immunostaining on the sections of the respective primary antibody (Fig. 1C, F and I).

Evaluation of Id immunostaining. The intensity of the immunohistochemical signal was scored using a four-scale system: where 0 represented no immunoreactivity; 1, weak immunoreactivity; 2, moderate immunoreactivity and 3, strong immunoreactivity. The immunoreactivities in the positive controls were used as intensity score 2 (Fig. 1A, D and G). In correlation of Id protein immunoreactivity with clinicopathological characteristics and survival, the staining intensities were summarized, with intensity 0 and 1 labeled as 'low expression', the intensity 2 and 3 as 'high expression'.

All slides were interpreted in a blinded manner without knowledge of the clinical and pathological parameters by one of the investigators (B. Damdinsuren) and the final evaluation was cooperatively determined using a multi-head microscope by two investigators (B. Damdinsuren and M. Kondo).

Correlation of Id protein immunoreactivity with clinicopathological characteristics and survival. The clinicopathological features of 45 HCC patients with a histopathological diagnosis were examined. The parameters included age, gender, serum α -fetoprotein (AFP) level, tumor size, staging by the Japanese classification (22), histopathological grade of

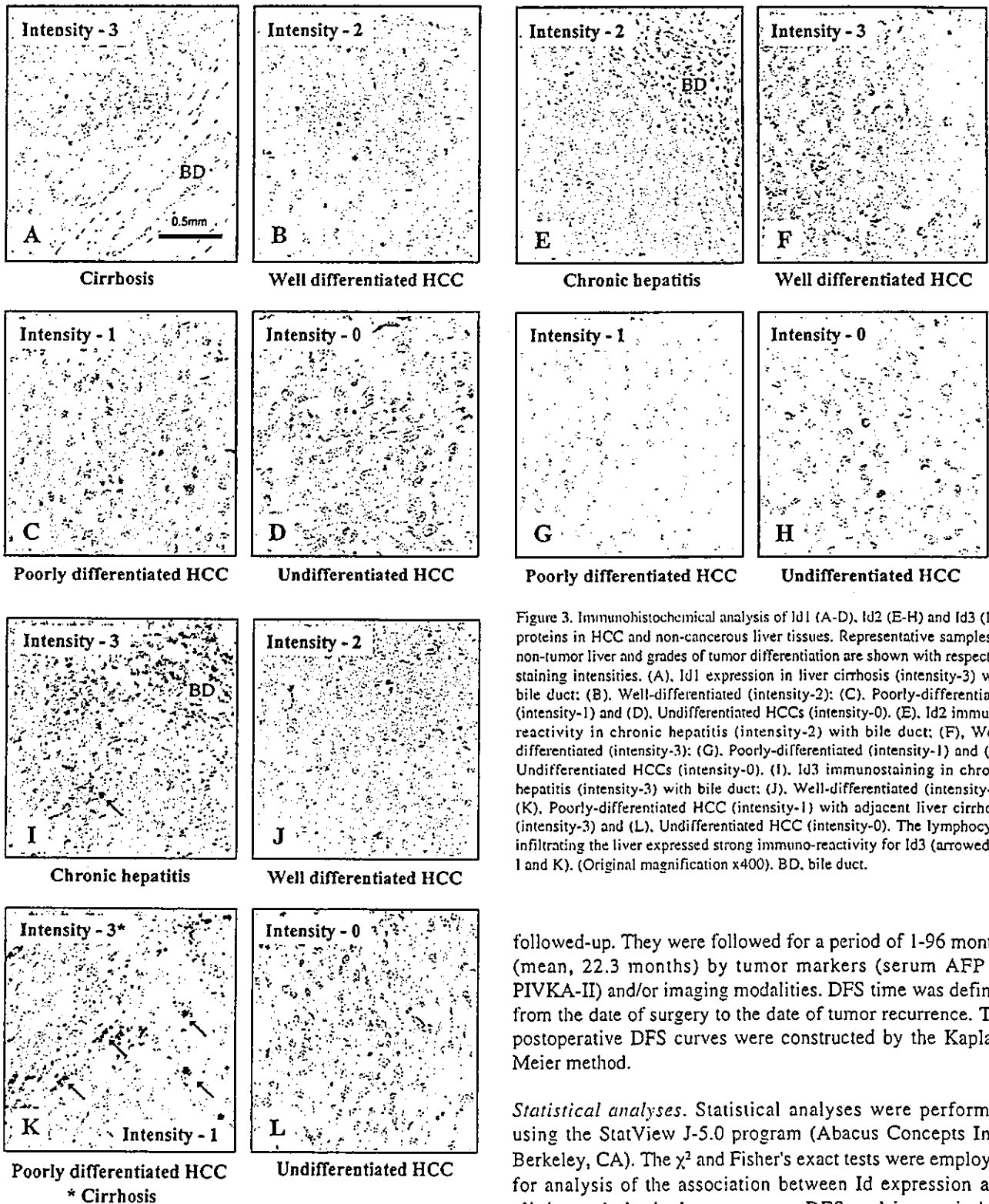


Figure 3. Immunohistochemical analysis of Id1 (A-D), Id2 (E-H) and Id3 (I-L) proteins in HCC and non-cancerous liver tissues. Representative samples of non-tumor liver and grades of tumor differentiation are shown with respective staining intensities. (A). Id1 expression in liver cirrhosis (intensity-3) with bile duct; (B). Well-differentiated (intensity-2); (C). Poorly-differentiated (intensity-1) and (D). Undifferentiated HCCs (intensity-0). (E). Id2 immunoreactivity in chronic hepatitis (intensity-2) with bile duct; (F). Well-differentiated (intensity-3); (G). Poorly-differentiated (intensity-1) and (H). Undifferentiated HCCs (intensity-0). (I). Id3 immunostaining in chronic hepatitis (intensity-3) with bile duct; (J). Well-differentiated (intensity-2); (K). Poorly-differentiated HCC (intensity-1) with adjacent liver cirrhosis (intensity-3) and (L). Undifferentiated HCC (intensity-0). The lymphocytes infiltrating the liver expressed strong immuno-reactivity for Id3 (arrowed on I and K). (Original magnification x400). BD, bile duct.

followed-up. They were followed for a period of 1-96 months (mean, 22.3 months) by tumor markers (serum AFP or PIVKA-II) and/or imaging modalities. DFS time was defined from the date of surgery to the date of tumor recurrence. The postoperative DFS curves were constructed by the Kaplan-Meier method.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using the StatView J-5.0 program (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA). The χ^2 and Fisher's exact tests were employed for analysis of the association between Id expression and clinicopathological parameters. DFS and its statistical significance were analyzed by the log-rank test. In all analyses, $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Western blot analysis for Id proteins. To confirm the specificity of Id1, Id2 and Id3 antibodies and check the expression level of Id proteins, a small set of tissue samples (two paired tumor and non-tumor liver tissues) was subjected to Western blot analysis (Fig. 2). The non-tumor tissues of chronic hepatitis

differentiation, presence of portal vein tumor thrombus, intra-hepatic metastasis, septal formation, capsular formation and invasion. The histopathological diagnosis of tumor and non-tumor tissues was made by a histopathologist (K. Wakasa), who was blinded to the clinical background.

Disease-free survival (DFS) data were analyzed for 44 patients, who had undergone curative surgery and could be