

を受け持つことのなかった部署が担当していることにもよるが、がん患者を担当する医師の多くもいまだ十分な認識をもっていないのが現状である。すでに問い合わせさえあれば、この領域を専門とする相当数の放射線科医が対応可能な状況にあり、このような患者がIVRの恩恵を被ることができるか否かは、まさに患者に接している医師あるいは看護師がIVRを思いつくか否かにかかっている。

どんなにIVRが優れているとしても、その応用が臨床現場で思いつかれなければ宝の持ち腐れである。看護師の方々には決してIVRに精通していただく必要はない。しかし、いつも頭の隅に置いておいていただき、目の前の患者が窮した状況になったとき、IVRで何かできないかを思い出し、また医師に相談していただきたいと思う。

本稿が、がん患者にIVRがより広く活用される契機となれば幸いである。

#### 文 献

1) Margulis AR: Interventional Diagnostic radiology—A subspe-

ciality. *Am J Roentgenol* 99: 761-762, 1967

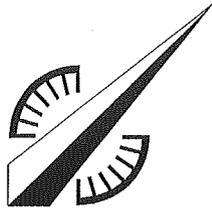
- 2) Wallace S: Interventional radiology. *Cancer* 37: 517-531, 1976
- 3) 荒井保明: 6-30 Interventional Radiology の手技を用いた治療法の有効性に関する研究. 厚生省がん研究助成金による研究報告集 平成6年度, 国立がんセンター, 東京, 459-463頁, 1994
- 4) 荒井保明: 6-30 Interventional Radiology の手技を用いた治療法の有効性に関する研究. 厚生省がん研究助成金による研究報告集 平成7年度, 国立がんセンター, 東京, 242-247頁, 1995
- 5) 荒井保明: 8-26 Interventional radiology の手技を用いた治療法の有効性についての研究. 厚生省がん研究助成金による研究報告書 平成8年度. 国立がんセンター, 東京, 422-426頁, 1996
- 6) 荒井保明: 8-26 Interventional radiology の手技を用いた治療法の有効性についての研究. 厚生省がん研究助成金による研究報告書 平成9年度. 国立がんセンター, 東京, 1996

綜合臨牀 第54卷第7号  
(平成17年7月1日発行 別刷)

## 大腸癌・肝動注化学療法

*Hepatic arterial infusion chemotherapy for liver metastases from colorectal cancer*

荒井 保明  
ARAI Yasuaki



診断の指針  
治療の指針

## 大腸癌・肝動注化学療法

*Hepatic arterial infusion chemotherapy for liver metastases from colorectal cancer*

荒井 保明

ARAI Yasuaki

はじめに

大腸癌の化学療法は、固形癌に対する薬物療法の中でも現在最もダイナミックに進歩している領域であり、すでに米国では分子標的治療薬も標準的治療に導入されている。本邦でも今春I-OHP(オキサリプラチン)が承認され、国際的標準治療に必要な5-FU, ロイコボリン, CPT-11, I-OHP のすべてが使用可能となり、これらの薬剤を用いたFOLFOX, FOLFIRIによる全身化学療法の治療成績は、概ね奏効率50%前後、生存期間中央値20ヵ月超である。一方、本稿で述べる肝動注化学療法は、本邦では Interventional radiology (IVR) が深く関与したため独自の進化を遂げたが、欧米における全身化学療法とのランダム化比較試験では、フッ化ピリミジン系薬剤のみによる全身化学療法との比較においてさえ生存期間延長への寄与は証明されなかった。よって、このような全身化学療法の劇的な進歩の中で、肝動注化学療法をどのように扱うかはきわめて慎重に判断される必要がある。本稿では、エビデンスに基づく肝動注化学療法の考え方、実臨床におけるこ

の治療法の扱いについて述べる。

### 1. エビデンスに基づく肝動注化学療法の考え方(表1)

#### 1) 欧米における臨床試験

1980年代から2003年に至るまで、実に10本の全身化学療法とのランダム化比較試験が報告されている。ここでの全身化学療法はフッ化ピリミジン系薬剤のみによるものであり、近年の進歩の大きな原動力となったCPT-11, I-OHP は用いられていない。これらの試験についてはメタアナリシスも行われたが、その結果は、奏効率は高いが、生存期間には明らかな差がないというものであった。ちなみに、これらの試験における奏効率、生存期間中央値は、全身化学療法10~49%, 11~17.6ヵ月、肝動注化学療法42~62%, 12.6~18.7ヵ月である。ただし、肝動注化学療法の技術については、カテーテルが開腹下に留置され、また薬剤分布も評価されておらず、後述する本邦の技術レベルから見ると質は悪い。2003年に報告された Kerr らの試験では、

表 1

海外における肝動注(ia)対全身化学療法(iv)の比較試験結果概要

	報告年	症例数(ia/iv)	薬剤(ia/iv)	奏効率(%) (ia/iv)	生存期間中央値(月) (ia/iv)
City of Hope	1990	9/6	FUDR/5-FU	55/20(0.2)	13.8/11.6(NS)
NCCTG	1990	39/35	FUDR/5-FU	48/21(0.02)	12.6/12.5(0.53)
MSKCC	1987	46/49	FUDR/FUDR	62/20(0.001)	17/12(0.4)
NCI	1987	32/32	FUDR/FUDR	62/17(<0.003)	17/12(0.27)
NCOG	1989	67/76	FUDR/FUDR	42/10(0.0001)	16.7/16.1(NS)
France	1992	81/82	FUDR/5-FU	49/49	15/11:2年生存率23/13%(<0.02)
UK-HAPT	1994	51/49	FUDR/-(control)		405日/226日(0.03)
Germany	2000	57/57	FU-LV/FU-LV		18.7/17.6(NS)
UK	2000	41/43	FUDR + FU-LV/FU-LV		390/340日(0.79)
UK	2003	145/145	deGramont		14.7/14.8(NS)

本邦における第II相試験概要

	報告年	症例数	薬剤(ia)	奏効率(%)	生存期間中央値(月)
JHAISG	1993	114(肝外病変あり症例を含む)	5-FU	52%	16.3
Arai	1997	32(肝外病変あり11例を含む)	5-FU	75%	22
Arai	1998	30(肝外病変なし)	5-FU	83%	26

国立がんセンター中央病院放射線診断部 部長  
Key words 大腸癌 肝転移 肝動注化学療法

肝動注化学療法群において治療が開始できなかった頻度37%, 予定された治療が完遂できなかった頻度29%であり, 本邦の技術レベルからは想像できない劣悪な技術で試験が行われたことが判る。しかし, 肝動注化学療法は全身化学療法に比べればカテーテル留置などの侵襲的処置を必要とする治療であり, これが正当化されるためには治療の true endpoint, すなわち生存期間で, 明らかな優位性が証明される必要がある。よって, フッ化ピリミジン系薬剤のみの当時に比べ明らかに全身化学療法がパワーを増した現在, 「欧米の技術で行われる限り, FOLFOX, FOLFIRI といった標準的全身化学療法に替わって使用される根拠はない」と言える。

## 2) 本邦の臨床試験

大量5-FU の5時間持続投与(毎週)については第I相試験, 第II相試験が報告されており, 奏効率, 生存期間中央値として52~83%, 16.3~26ヵ月が報告されている。この数値自体は前述の欧米における比較試験に比べ優れているが, 全身化学療法との比較試験はなく, よって欧米で示されたエビデンスを覆すことはできない。本邦の特色として, IVR 技術を用いたカテーテル留置やCTA(CT-angiography)による薬剤分布評価など, 高い技術を用いている点があげられる。これらの技術は特殊と言っても, その feasibility については複数の報告がなされており, 本邦では十分に可能な技術になっている。

## 3) エビデンスに基づく肝動注化学療法の考え方

①本邦で可能であるとはいえ, 全身化学療法に比べれば侵襲的な治療である, ②技術的に問題があるにせよ欧米の試験で全身化学療法に勝る結果が示されなかった, ③本邦での成績も現在の世界標準であるFOLFOX, FOLFIRI の治療成績とは大きな差がない, 以上の3点より「1st-line として肝動注化学療法を採用することは適切ではない」と言える。

## 2. 実臨床における取り扱い

肝動注化学療法の特徴は, ①適格な技術を要す, ②肝転移に対する腫瘍縮小効果は全身化学療法に比べ高い, ③肝外病変には効果がない, の3点につきる。すなわち, 肝動注化学療法が妥当とされるのは, これらの特徴を考慮しても, 当該症例に対して全身化学療法を行うよりも妥当性が高いと判断される場合に限られる。具体的には, 以下の状況があげられる。

### 1) 技術が可能であること

本邦では経皮的なカテーテル留置が標準的となっているが, 単にカテーテルの留置経路に限らず, 側孔型カテーテル先端固定留置法と呼ばれるカテーテル移動や血管閉塞を防止するための手技, 至適薬剤分布を得るための血行改変術までが必要な技術である。また, 留置システムからの造影CTによる定期的な薬剤分布のチェックも必須である。技術が不完全なままで肝動

注化学療法が施行された場合に重篤な合併症が発現することは周知であり, これらの手技を適切に行うことができない状況下では肝動注化学療法は絶対に施行するべきではない。

### 2) 肝外病変がない場合

上記②, ③の点からは肝動注化学療法の施行が許容される可能性がある。しかし, 全身化学療法でも50%前後の奏効率が期待できる点, 潜在的な肝外病変存在の可能性が常にある点を考慮すれば, 肝動注化学療法を行う条件として十分なものではない。異時性肝転移など, 肝外病変併存の可能性が低い場合で, かつ以下の3), 4)などの条件が満たされる場合には適応があると考えられる。

### 3) 肝転移が切迫した予後規定因子となっている場合

肝外病変の有無にかかわらず, 肝転移が切迫した予後規定因子となっている場合には上記②を根拠に肝動注化学療法を施行することが許容される。ただし, 「切迫した予後規定因子になっている」との判断には明確な基準がなく, 事実上臨床医の判断に頼らざるを得ない。

### 4) 全身化学療法の適応がない場合, あるいは効果が得られない場合

肝動注化学療法による5-FU と全身化学療法におけるCPT-11, 1-OHP の毒性の profile は異なっており, かつ一般に肝動注化学療法による副作用は全身化学療法に比べ軽微である。よって, FOLFOX, FOLFIRI などの標準的全身化学療法が毒性の点で困難, かつ肝転移が問題となっている症例は肝動注化学療法の良い適応と考えられる。また, これらの標準的全身化学療法で効果が得られなかった場合には, 事実上他に治療法がなく, 肝動注化学療法の適応となる。

## 3. 肝動注化学療法の実際

数多くの論文, 成書があり, 詳細はこれらを参照して頂きたい。

### さいごに

肝動注化学療法発展における本邦の貢献は素晴らしいものであり, その治療効果も決して卑下する類のものではない。しかし, 近年の大腸癌薬物療法の劇的な進歩は事実であり, この古典的な治療法に固執すべきではない。全身化学療法が進歩したとはいえ, 所詮効果が得られるのは約半数であり, その効果も永続する訳ではなく, かつ毒性も軽い訳ではない。よって現時点では, 「一歩退いて」全身化学療法で対処困難な場面でのみ肝動注化学療法を活用する姿勢が重要である。いずれ, 全身化学療法の限界が明確になれば, この古く特殊な治療である肝動注化学療法に新たな役割が見出されるかもしれない。現在, 本邦の高い技術による肝動注化学療法を全身化学療法との併用する治療法について臨床試験(JCOG0208-D1)が行われている。

**JVR**  
Vol.20/No.4

OCT.2005

別刷

## ■ 1. 臨床研究に必要な統計「以前」の知識

国立がんセンター中央病院 放射線診断部, 同検診研究センター<sup>1)</sup>  
荒井保明, 山本精一郎<sup>1)</sup>

Department of Diagnostic Radiology, National Cancer Center  
Yasuaki Arai  
Statistics and Cancer Control Division, Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center  
Seiichiro Yamamoto

### Abstract

#### *Critical Knowledge before Needed Statistics to Conduct Clinical Research*

Statistics is one of the most important tools needed to solve out clinical questions and to evaluate the correlation of various clinical phenomena. However, statistics cannot answer clinically valuable questions by itself. Only when statistics is applied with the scientifically appropriate methods and procedures does, it help us to clarify new thoughts and knowledge. This is called clinical epidemiology or clinical research methodology. Therefore, clinical researchers are strongly advised to learn them in addition to statistics. Such knowledge also helps clinical researchers to collaborate with statisticians.

### はじめに

臨床で経験される種々の事象が他の事象とどのように関連しているかを知りたいというのは、自他を問わず、それまでの臨床経験を利用して少しでも無駄のない良い臨床を行おうとする上で、当然の要望である。言うまでもなく、統計はその関連性を科学的に評価するための手段であり、事象どうしの関連性を科学的に評価する上でなくてはならないツールと言える。ところが、われわれは案外数字に弱く、いくつかの統計用語と数字を羅列されてしまうと、その本質から目を奪われ結果だけを妄信してしまう傾向がある。自分のデータであっても、いくつかの処理をして数字にしてしまうと、妙に信頼性が高まったような気になってしまうのも事実である。そして悲しいことに、この傾向はわれわれの周囲に留まらず、IVR領域のメジャーな学術誌にもしばしば見られる。しかし、われわれが知りたいのは、ある事象に関して臨床的に本当に役立つ「本質」である。氾濫する多くの情報に翻弄されず「本質」を知るためには、少なくとも統計がツールとして用いられる以前の事象を処理する際の本物と偽物を区別する識別眼だけは養っておく必要がある。

本稿は、このような観点から、最近のIVRのメジャー

な英文誌の論文に見られた「とんでもない」非常識をヒントにして、これを若手Interventional radiologistの太郎君の質問にかえ、この領域の専門家である山本精一郎先生にコメントして頂くこととした。なお、本稿は山本先生との共著であるが対話的な内容であり、文中でも「山本先生」という表現を用いて荒井がまとめさせて頂いた。ご了承頂きたい。

### 太郎君の模索(その1)

地方会も迫り、過去1年間80例の肝細胞がんに対するRFAの治療成績をまとめている。太郎君の施設でRFAを行うのは放射線科部長でIVR指導医のA先生、太郎君の直接指導者でIVR指導医のB先生、消化器内科のC先生、そして太郎君の4名である。A先生は速いがちょっと乱暴、B先生は上手だし太郎君によく症例を回してくれるいい先生、C先生は時間がかかるし下手だと太郎君は思っている。太郎君自身もRFAは好きで、丁寧にやるので時間はかかるが、もう30例以上もやっていて結構自信もある。本当は、一番上手いのはB先生か自分だろうと内心思っている。

さて、上の4人がそれぞれ20例ずつやっているのだが、術後合併症頻度が80例中18例というところで妙なことに気がついた。A先生8例、B先生7例、C先生2例、太郎君1例なのである。これは、どう見ても特殊な傾向があるように見える。C先生と太郎君の共通点は所要時間かもしれないと思い、調べてみたらA先生は平均12分、B先生16分、C先生25分、太郎君25分だった。要するに、所要時間の20分あたりで線を引けば、「時間を

### Key words

- Statistics.
- Clinical epidemiology
- Clinical research methodology

かけて丁寧にやった方が合併症は少ない」と見えそうに見える。そこで、症例をA先生+B先生施行群とC先生+太郎君施行群に分けて有意差検定してみたら、所用時間も合併症発生頻度も明らかに差があることが判明した。あまりに思うツボなので、意気揚々と山本先生に報告に行った。

〔山本先生のコメント〕

太郎君の解析には二つの大きな問題があります。ひとつは、所要時間と合併症頻度を直接関連付けて見ないで、間に担当医を介在させたことです。A先生とB先生を合わせた成績と、C先生と太郎先生を合わせた成績を比較してそれぞれ所要時間と合併症頻度が違うと結論付けていますが、これではA先生とB先生の組とC先生と太郎君の組で所要時間と合併症頻度が違うことを言っているだけです。所要時間や合併症頻度が違う理由は指導医でないC先生と太郎君に易しい症例をまわしただけかもしれないし、逆に二人がA先生とB先生より本当にIVRが上手なために合併症が少なかったのかもしれない。いずれにしろ、所要時間が短いから合併症頻度が少ないという因果関係を直接見ていることになりません。

この場合、すべての先生のデータを合わせて所要時間と合併症発生との関係を見るべきです。物事の因果関係を調べたい場合には、可能な限り因果関係の起こる順（つまり原因から結果）にデータを取って解析することが大切です。この場合には、まず患者さんの要因や腫瘍のデータを取り、次に治療に関するデータ（誰がやったか、どんな治療をしようとしたか）、治療自体のデータ（実際どんな治療をやったか、何分かったか）、短期的な治療結果のデータ（合併症のデータ）、長期予後のデータ（死亡や再発までの期間など）を時間を追ってその時点でデータを取ることが重要です。あとから思い出したりカルテを起こしたりすると必要なデータがなかったり、自分の都合のよい症例だけを使ったりすることができるので、データがまったく信用できなくなります。

この方法に則ってデータが取られていたとすると、所要時間をいくつかのカテゴリに分けて、その中で合併症の頻度を比べるのがよいでしょう。カテゴリはデータで所要時間の分布を見て人数が同じになるように二つに分けること（＝中央値で二分割）をよくおこないますが、それよりもより臨床的に意味のあるカテゴリわけのほうが解釈に直結します。たとえば、太郎君のいう20分に何らかの意味があるならそこでわけるともひとつの方法です。所要時間の分布がふた山になっているのであればその間で分けるのもよいでしょう。ただ、通常は分布がひと山のことが多いので、その場合に真ん中で分けると一番人が多く分布しているところで無理やり分けてしまうことになるので、解釈しづらくなります。何も情報がないなら、分布から3つに分けると所要時間と合併症頻度の「用量反応関係」（所要時間が長いほど合併症が増えるという直線モデルか、所要時間がある程度以上なら合併症頻度が増えるという閾値モデル）

の検討もできるのでお勧めです。

しかし、これで所要時間が長いグループで合併症頻度が少なかったとしても、所要時間が長いことが合併症が少ない理由かどうかはわかりません。関連はあっても因果関係かどうかはわからないからです。本当は①IVRが易しい症例かどうかは合併症頻度に影響しているとしましょう。さらに、「②易しい症例が指導医でないC先生と太郎君にまわされ、彼らのIVR所要時間が総じて長い」のであれば、見かけ上、所要時間が長い方が合併症頻度が低いように見えるでしょう（図1参照）。この場合、易しい症例かどうかは①合併症の頻度と②所要時間の両方に関係しているため、真の関係が観察されるのをゆがめています。この現象を交絡（confounding）といい、ゆがめている因子を交絡因子（confounding factor）といいます。この場合の交絡因子は、易しい症例かどうか（＝担当医が誰であるか）です。交絡の影響を取り除くには、易しい症例と難しい症例で分けて（あるいは担当医ごとに分けて）所要時間と合併症頻度の関係を見ることです（サブグループ解析）。担当医ごとに見ると、所要時間が短いほうが合併症頻度が低いという逆の関連が見られるかもしれません。ただし、交絡因子が多い場合は分けて見るのに限界があるので、いわゆる回帰モデル（この場合はlogistic regression）などを用いて調整することがよく行われます。

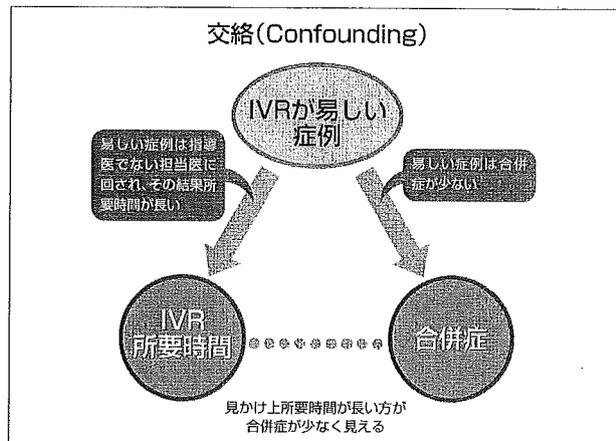


図1

太郎君の模索（その2）

「ランダム化比較試験なんてそんな簡単にできないよなあ」と同僚の次郎君と話しながらCVIRを読んでいた太郎君。米国からの3種類の透析カテーテルを比較している論文に目がとまった。ランダム化とは書いていないが明らかに比較していて、症例の背景に差がないことを示す表も載っている。やり方は症例の来た順番に1例目はAカテーテル、2例目はBカテーテル、3番目はCカテーテル、4番目は一周してまたAカテーテルとしている。「これならウチでもできる」と次郎君と意気投合。最近やたらと多い、下大静脈フィルターでやってみることにした。2種類のフィルターを交互に使って、留置の成功率、所要時間、合併症を比較することにした。臨床試験とかというややこしいので、一応部長のA先生に

確認したが、「どちらも保険適用となっている市販のステントだし、いずれにしてもどちらかを使う訳だから、別に倫理委員会とかにも出す必要はないでしょう」との返答だった。フィルターを入れるのは次郎君と太郎君の二人だから、一方の術者が偏らないよう、表を作って二人が入れるフィルターが均等になるように工夫した。一応、この研究専用の次郎君と共用のノートも準備した。2年間で50例くらいまとまれば、CIRSEにでも行って発表しようと思う。立派な prospective studyだし、順次データを入力しておこうと思うので、その辺のコツを山本先生に聞きに行った。

#### 〔山本先生のコメント〕

ランダム化するには二つの理由があります。もっとも大きな理由は、比べたいグループ間の比較可能性を高めることです。比較可能性を高めるとは、この場合でいうと、同じフィルターであれば同じ留置の成功率、平均所要時間、合併症頻度がグループ間で出ることが期待される、ということです。本来、比較可能性が最も高いのは、同じ個人に両方の治療をおこなうことです。しかし、同じ個人に両方のフィルターを使うわけにはいきません。次善の策として、その人にとっても似た人を探し出してその人にもうひとつの治療をして比較することが考えられますが、測定不可能なすべての要因が同じ人を探し出すのは不可能です。グループとして考えた場合、あるグループに対して背景因子が同じグループを作っても、個人個人の因子は異なるでしょうし、測定不可能な要因についても同じ分布を持たせることは不可能です。これを解決する唯一の方法がランダム化です。ランダム化する目的は、背景因子の分布を合わせることでなく、同じ治療をした場合に平均として同じ結果が出るグループを作ることです。ある程度の対象者数があれば、ある背景因子の分布が異なっている、別の因子で逆のことが起こって、トータルで見れば両グループで同じ結果が出ることを期待されます。太郎君の例のようにランダム化していない場合には、患者の順番を恣意的に変えたり、恣意的でなくても患者の来る順番にある傾向があれば（ある曜日にはある先生を訪ねて予後の悪い患者がくることが多い、など）、比較可能性が保たれる保障はありません。いくら研究者が恣意性がないと主張しても、それを証明することはできないのです。

もうひとつのランダム化の理由は、統計的推測の基礎を作ることです。ランダム化することによって、帰無仮説の下での統計量（＝見たいエンドポイント）の分布がどのようになるかを理論的に導き出すことができます。たとえば、二つのフィルターに差がない場合の留置の成功率は超幾何分布に従うことが証明でき、それに基づいて Fisher の正確な検定をおこなうことができます。しかし、この例のように順番に割り振った場合には、この検定を用いる直接的な根拠がなくなってしまい、何らかの数学的な仮定に基づいて別の検定をしなくてはならなくなってしまいます。このようにランダム化は統計的推測の基礎を作る大変強力な方法なのです。統計的

には、ランダム化するかしないかで証拠としての価値は天と地ほどの差が開いてしまいます。

しかし、最初の例に比べて、前向きにデータを取っていかうという太郎君の姿勢は評価できます。最初の例で述べたような、後で振り返って自分の都合のよい症例だけを使う、必要なデータが取られていない、定義が症例によって異なる、というようなことが防げるからです。ただし、これは、研究の計画と手順をしっかりと記載した研究計画書（プロトコル）が研究開始前に作成され、それに基づいてデータマネジメントを行い、解析され、さらにはその研究内容と方法が妥当で正しくおこなわれていることが第三者によって保障されて初めて実現されます。そうでないとちゃんと行われているか論文読者には判断できません。施設倫理委員会（Institutional Review Board, IRB）はこの第三者的判断のために設置されています。なぜ倫理委員会が、と思うかもしれませんが、科学的でない研究は正しい結果を出すことができず、倫理的とはいええないため、倫理性を保障するためには科学的であることが必須です。したがって施設倫理委員会は倫理性だけでなく、研究が科学的に計画され、実施されていることを調べ、監視する責任があります。市販のものしか使わないから倫理委員会に出さなくていい、というのは勘違いもはなはだしく、これでは前向き研究どころか、研究ともいえません。

#### 太郎君の模索（その3）

太郎君の直属の上司である B 先生は動注リザーバーをよくやっているし、結構上手い。消化器内科の D 先生と組んで、この10年間に200例の結腸・直腸がん肝転移に対する動注をやっているそうである。たまたま、CTにきた肝動注開始5年後という患者さんに遭遇して、「FOLFOX, FOLFIRIでMST 20ヵ月超とかいったって、やっぱり肝動注だよな」と思った太郎君。D先生から長期生存例を教えてもらって調べてみた。一応、肝動注開始から3年以上生存例を長期生存と定義して調べてみると、案外いるもので、3年が5例、4年が3例、5年が2例、最長の7年が1例と合計11例もいた。これは発表のネタになると考えて、その背景を調べてみると、「直腸癌でなく結腸癌」、「原発巣手術がD2」、「異時性肝転移」、「治療開始時肝外病変なし」、「5FUの総投与量が15g以上」が全部の症例に共通していた。同じような発表は前にも聞いた覚えがあるし、エビデンスといえる程のデータではないかもしれないが、患者さんの治療方針を決める上での参考には十分になるデータだと思ったので、急いでまとめてリザーバー研究会に出そうと思った。「参考になるデータ」というくらいの軽い発表なら山本先生もOKしてくれるだろうと思い、行ってみた。

#### 〔山本先生のコメント〕

まず第一に、長期生存例だけを集めて特徴を見ても、本当にそれが長期生存例に固有のものか、そうでないかがわかりません。これでは、「交通事故死の90%はシートベルトをしていない」といっているのと変わりま

せん。これは言外に「交通事故に遭ったのに死んでいない人は100%シートベルトをしていた」ことを周知の事実としているのですが、そんなこと調べて見ないとわかりません。因果関係を議論するには、常に比較対照するもの（コントロール）が必要です。

しかし、交通事故の例も、肝動注長期生存の例も推測の方向と因果の方向が逆（結果から原因）になっています。最初の例で述べたように、より正しく因果推論するには、シートベルトしている場合としていない場合でどちらが事故死が多いか調べるべきです。仮説を作る（hypothesis generating）のためには、長期生存例とそうでない対照を比べて、もともとどのような因子を持っている人が多かったかを探索的に（exploratory）比較することは重要ですが、いったん仮説ができあがると、前向きに検証することが必要です。肝動注の例では、肝動注をやる前、そしてやった後の因子を前向きに記録し、その後の予後を追跡して、どのような因子を持った集団の予後が長いかを調べる必要があります。「直腸癌か結腸癌か」、「肝転移が異時性が同時性か」、「治療開始時肝外病変の有無」でその後の予後を観察して比較すればいい、ということになります。「原発巣手術がD2かそうでないか」と「5FUの総投与量が15g以上」は別です。これは前述の因子と異なり、治療者がコントロールできることです。ランダム化比較試験をするべきです。あるいは、D2手術ができなかったとか、5FUを15g以上投与できなかったというのが、全身状態が悪いとか肝動脈閉塞や副作用などの患者側の理由である場合には、ほかの因子の場合と同じように予後との関係を前向きに観察して比較する必要があります。しかしこの場合、手術の隔清の程度は患者側の要因であり、また5FU総投与量は患者が生存して治療ができる期間にも影響されます。このため、このような因子は因果関係というよりも単に予後を反映、あるいは予後と相関しているだけである可能性もあります。このような因子を疫学では中間因子（intermediate factor）と呼んでいます。

## 太郎君の模索（その4）

オンボロの血管撮影装置の更新で、ついに太郎君の施設にもIVR-CTが入ることになった。これでいろいろ便利になるんだし、最近山本先生のお陰で臨床試験や統計の勉強も始めたから、是非この機会にIVR-CTの有用性を評価するprospective studyを組んでみようと思った太郎君。ところが、「何を指標にすれば有用性を言えるか」というこの試験の最も重要な評価項目（primary endpoint）でしょっぱなからひっかかってしまった。確かに、血管撮影装置とCTが合体した装置だから、患者さんを移動させずにあれこれできるので「楽」なのだが、この「利便性」というのをどうやって測ればいいのか判らない。所要時間とかは移動がない分だけ短くなるし、患者さんの移動に伴う危険性や事故も少ないかもしれないが、どうも本質とは違う気がする。CTも血管撮影も簡単にできると言っていたって、もともと患者さんさえ運べば、CT、血管撮影装置それぞれでやっていたこ

とだから、特別新しいことができる訳でもない。肺生検でも肝細胞がんのTACEでも治療成績はいろんな要因が絡むのでそう簡単には言えないし。それに、日本が開発したIVR-CTだけど、その有用性を述べた論文もない。これは相当に難問なのかもしれない、と今回ばかりはお手上げで、山本先生にアドバイスをもらいに訪問することにした。

## 〔山本先生のコメント〕

これは難しい問題です。もちろん統計の問題ではありません。いい解答はありませんが、参考になるのは「リスク・ベネフィットバランス」という考え方です。新しいものを導入する際には、それが治療であれ、医療機器であれ、そのリスクとベネフィットを定量し、それを比較考量することによって導入を判断することが必要となります。リスクとベネフィットを「定量する」ことが大事ですが、リスクとベネフィットは同じ尺度ではないので、いくら定量してもリスクとベネフィットのどちらが大きいかを簡単に決めることはできません。この場合比較すべきはむしろ、これまでにおこなわれてきた「標準」治療であり、「標準」医療機器です。新治療がこれまでの治療に取って代わるためには、副作用や合併症が変わらなくて治療効果の上昇があるか、副作用や合併症が増えてもそれに見合う以上の治療効果の増加があるか、治療効果が等しくて副作用や合併症が減ることを（新治療と標準治療を比較して）証明すればよいのです。この場合大事なのは「治療効果」を軸に考え、新治療の治療効果が劣る場合には副作用が減っても新しい標準治療とはしないことです。医療機器の場合は、たとえば診断機器であれば感度や特異度などの診断能を治療効果と置き換えて考えてください。リスクやベネフィットには便利さやお金を考慮してもよいでしょう。しかし、治療や医療機器である以上、外してはいけない治療効果を軸にして、ランダム化比較試験によって標準のものと新しいものを比較し、リスクとベネフィットを定量し、リスク・ベネフィットバランスの高いほうを選ぶ、というのが基本的な考え方です。

## 太郎君の模索（その5）

消化器内科のE先生。太郎君は知らなかったけど、肝細胞がんに対するTACEについて生存期間をprimary endpointにしたランダム化比較試験をやっていた。症例毎に「この症例はリピオドールとファルモルピシン」とか「この症例はリピオドールとマイトマイシンC」とかうるさく注文してくると思っていたが、実はこのためだと判った。当初各群100例ずつ合計200例の予定で4年前から始めたそうで、この度めでたく予定症例が登録されたのだが、どうも「もう少し延長したい」と部長のA先生に相談があったらしい。理由は、これまでの結果を解析してみたら、ファルモルピシン群が少し勝っているのだけれど、このままでは有意差が出ず、130例ずつ合計260例まで頑張れば有意差が出るからという。結構メジャーな雑誌に載る論文だろうし、太郎君も当然

co-authorで名前を載せてもらえる筈なので、この際協力しようかと思う。という訳で、何も考えずに雑談のつもりで山本先生に話してみた。

#### 〔山本先生のコメント〕

この試験にはいくつか大きな問題があります。ひとつは必要対象者数(サンプルサイズ)の設計方法です。サンプルサイズは、有意差が出るようにではなく、臨床的に意味のある差があるかを証明するために設計すべきです。つまり、新たな標準的治療となる可能性のある治療があったとして、その新治療が既存の標準的治療に取って代わるのに必要な「臨床的に意味のある差」に基づいて、サンプルサイズを設計すべきです。例えば、MSTを3ヵ月延ばすことが臨床的にも大きな意味のある対象(例えば進行膵がん)に対する新治療なら、これを証明できるようなサンプルサイズを設定すれば良いわけです。逆に、臨床的に意味のないような差なら標準治療にはなり得なく、それを証明するために莫大な人数の試験をすることは倫理的ではありません。

また、この試験では結果を見てから、勝てそうだから、という理由でサンプルサイズの再設計をして試験を続けようとしています。試験の途中に検出力を増やすためにサンプルサイズを増やすことは別に構わないのですが、何度も結果を見ることには問題があります。何度も見れば見るほど本当は差がなくても偶然有意になる確率( $\alpha$ エラー)が増えます。これを多重性の問題と呼びます。一回あたりの $\alpha$ エラーを5%とすると2回見るとどちらかで偶然有意になる $\alpha$ エラーは $1 - (1 - 0.05)^2 = 0.0975$ 、つまり10%近くにまで増大してしまいます(簡便のために独立性を仮定)。これは何回も覗くとたまたま差が出たときに見つけやすいからです。真に勝っている時は検出力を上げるだけだから構わないような感じがしますが、真に勝っているかどうかはわからないので、結局 $\alpha$ エラーを増やしているだけかも知れず、統計的な妥当性が保てません。 $\alpha$ エラーを宣言した

水準通りに守ることはランダム化比較試験が検証的であるための最も重要な要素のひとつですから、せっかくしっかり実施しても $\alpha$ エラーが増えてしまうと試験の価値が大幅に減ってしまいます。試験の計画段階から、途中で何度か見ることを計画して、統計的な方法で $\alpha$ エラーを調整する方法は一般的によく用いられており、問題はありません。ただし、途中で結果を見るのは試験実施者とは独立なモニタリング委員会であり、差があることが証明されるまで研究者には結果はマスクされます。中身を見てからサンプルサイズを増やす方法も統計的には提案されていますが、まだ一般的に使われるにはいたっていません。いずれにしろランダム化比較試験をするには試験にあわせて統計的にしっかりデザインすることが必須です。

#### おわりに

いささか人を喰ったような例題で恐縮だが、この辺が統計以前のわれわれの知識の標準的なところと考え、自分自身の反省も込めて書かせて頂いた。これらは疫学、あるいは臨床研究方法論として整理されている分野である。批判を受けるための例題であるため、厳しい印象をもたれたかもしれないが、山本先生の「これはいけない」という言葉の行間から滲み出た「どうせやるなら、こうしなさい」という部分を素直に受け入れるべきであると思う。統計以前の正しい考え方を理解し、その上で統計というツールを活用し、臨床的に本当に役立つ「本質」を科学的に示すIVRの研究が行われることに、本稿が役立てば幸いである。

#### 【文献】

- 『米国SWOGに学ぶがん臨床試験の実践—臨床医と統計家の協調をめざして』訳：福田治彦／新美三由紀／石塚直樹 医学書院 2004年08月発行。  
原著：『Clinical trials in oncology』2nd edition. Green S, Benedetti J, Crowley J, editors.

## Percutaneous Transhepatic Portal Vein Embolization: Effectiveness of Absolute Ethanol Infusion with Balloon Catheter in a Pig Model

M. SATAKE, U. TATEISHI, T. KOBAYASHI, S. MURATA & T. KUMAZAKI

Division of Diagnostic Radiology, National Cancer Center Hospital and Department of Radiology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

Satake M, Tateishi U, Kobayashi T, Murata S, Kumazaki T. Percutaneous transhepatic portal vein embolization: effectiveness of absolute ethanol infusion with balloon catheter in a pig model. *Acta Radiol* 2005;46:000-000.

**Purpose:** To evaluate the effectiveness of portal vein embolization (PVE) with absolute ethanol using multidetector-row computed tomography (CT) angiography in a pig model.

**Material and Methods:** Percutaneous transhepatic PVE with 10 ml absolute ethanol was performed in liver segments ( $n=5$ ) or subsegments ( $n=5$ ) in 10 pigs. CT images and volumetric data were qualitatively and quantitatively assessed to determine future liver remnant (FLR) hypertrophy and to correlate with histopathologic changes 2-6 weeks after PVE. Effectiveness evaluation was based on changes in absolute FLR size and ratio of FLR to total estimated liver volume (TELV).

**Results:** Occlusion of the embolized vessel was achieved immediately after injecting absolute ethanol within a range of 0.25-0.33 ml/kg. The TELV prior to PVE was  $660.49 \pm 103.66 \text{ cm}^3$  (range 527.22 to  $833.70 \text{ cm}^3$ ) and after PVE  $769.51 \pm 29.36 \text{ cm}^3$  (range 685.95 to  $887.34 \text{ cm}^3$ ). The mean FLR/TELV ratio increase after PVE was 14.2%. No statistically significant difference was found in the increase of TELV between segmental or subsegmental PVE. On microscopic observation, atrophy of the embolized liver was noted in all animals and was seen distinctly at 3 weeks after PVE in 2 animals.

**Conclusion:** Both regenerative response and histopathologic changes of the liver were seen after PVE with absolute ethanol with a mean FLR/TELV ratio of 14.2%.

**Key words:** Absolute ethanol; balloon catheter; embolization; portal vein

*Ukihide Tateishi, M.D., Ph.D., Division of Diagnostic Radiology, National Cancer Center Hospital, Tsukiji, Chuo-Ku, 104-0045, Tokyo, Japan (fax. +81 3 3542 3815, e-mail. utateish@ncc.go.jp)*

*Accepted for publication February 2005*

Percutaneous transhepatic portal vein embolization (PVE) of the liver leads to atrophy of the embolized lobe and compensatory hypertrophy of the remnant liver, which may prevent liver failure after hepatic resection (17). The PVE procedure minimizes the risk of portal vein thrombosis and contralateral vascular injury to the future liver remnant (FLR). PVE is performed mainly in the preoperative treatment of selected patients who are potential candidates for major hepatic resections (2, 5, 11, 12, 14, 18). By inducing selective lobar hypertrophy of the normal liver, PVE may reduce complications after major resections (2, 5, 11, 12, 14, 18).

The substances used for embolization include coils (5), microspheres (5), cyanoacrylate and

ethiodized oil (6), gelatin (6, 19), polyvinyl alcohol (PVA) particles (7, 16), and absolute ethanol (4, 10, 15, 20-22). Absolute ethanol is one of the most reliable agents for achieving atrophy of the embolized lobes and induces histopathologic changes in the embolized liver that lead to periportal necrosis and fibrosis (4, 10, 15, 20-22). The hypertrophy of the remnant liver segments observed in previous studies almost certainly represents hepatic regeneration, but we know of no experimental studies in which hepatic regeneration after PVE with absolute ethanol has been evaluated by CT angiography (1, 5). The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of PVE with absolute ethanol in pigs by correlating the CT angiographic findings with the histopathologic observations.

## Material and Methods

### Procedure

Ten female domestic pigs (Saitama Experimental Animal Supply, Saitama, Japan) weighing 30.0 to 35.0 kg were used in this study. The study protocol was approved by our institutional animal study committee. Animals were sedated and anesthetized by premedication with an intramuscular injection of 15 mg/kg ketamine-HCl (Sankyo, Tokyo, Japan), 2 mg/kg atropine sulfate (Yamanouchi, Tokyo, Japan), and 4 mg/kg 4'-fluoro-4-butyrophenone (Sankyo, Tokyo, Japan), and ventilated with administration of 50–100 mg thiamylal sodium (Yoshitomi, Tokyo, Japan). The anesthesia was maintained mainly by inhalation of sevoflurane (Maruishi, Tokyo, Japan). Intravenous ketamine-HCl and pancronium bromide (Sankyo, Tokyo, Japan) were also administered to maintain anesthesia when necessary. 0.5 g Cefazolin sodium (Fujisawa, Tokyo, Japan) was administered intravenously to prevent infection. A catheter was inserted into a femoral artery with a 5 Fr. super-sheath introducer set (Medikit, Tokyo, Japan). Under fluoroscopic guidance, a 6 Fr. super-sheath introducer (Medikit, Tokyo, Japan) was transhepatically introduced into a branch of the right portal venous system. A 0.035-inch guide-wire (Radifocus Guide Wire, Terumo, Tokyo, Japan) and a 0.035-inch Amplatz guide-wire (Cook Medical, Bloomington, Ill., USA) were used to secure access, and the 6 Fr. vascular sheath was placed with a 5 Fr. dilator.

Digital subtraction portography was performed with a 5 Fr. angiographic balloon catheter (Clinical Supply, Gifu, Japan) inserted into the main portal vein, which was identified by injecting 5–10 ml of contrast material (Iopamiron 370 mgI/ml; Nihon Schering, Osaka, Japan) during suspended respiration. Portal vein branches were embolized by injection with from 5 to 10 ml of absolute ethanol into a 5 Fr. balloon catheter within the portal vein branches supplying the segments targeted. The balloon catheter was used to block the embolized branches and prevent reflux. After embolization of the targeted segments, the catheter was positioned in the main portal vein, and a portogram was obtained. The portal vein catheter was thereafter left in place as an indwelling.

Selective embolization of segment IV was performed in three pigs, segment VI in two pigs, the anterior segment in two pigs, the posterior segment in two pigs, and the lateral segment in one pig. Blood samples were collected and serum creatinine, total serum bilirubin, serum alkaline phosphatase,

serum lactate dehydrogenase, serum aspartate aminotransferase, and serum alanine aminotransferase levels were measured before and after embolization. The blood ethanol concentration was also determined before and 3, 5, 10, 15, 20, 30, and 60 min after embolization.

### CT examinations

The animals were sedated with sevoflurane, ketamine-HCl, and pancronium bromide before receiving a propofol infusion. The animals were placed in the CT scanner in the supine position. All CT images were obtained with a multidetector-row CT system (Aquilion V-detector CT; Toshiba, Tokyo, Japan), and the following scan parameters were used: axial 4 slice mode, 2.0 mm collimation, 0.5 s/rotation, 120 kVp, 150 mA/rotation, 30–40 cm of field of view, and 512 × 512 matrix. Images were reconstructed using standard algorithms with 5 mm section thickness on a display window width of 300–350 Hounsfield Units (HU) and a window center of 120–180 HU. A 5 Fr. cobra-type femoral artery catheter (Clinical Supply, Gifu, Japan) was first placed in the superior mesenteric artery for CT arterial portography (CTAP) and then repositioned in the common hepatic artery for CT hepatic arteriography (CTHA). CTAP was performed with scan delays of 10 s (early-phase) and 35 s (delayed-phase) after injection of the 1:2 diluted contrast material (Iopamiron 370 mgI/ml; Nihon Schering, Osaka, Japan). CTHA was also performed with scan delays of 10 s (early-phase) and 35 s (delayed-phase). The contrast material was injected with a dedicated CT injector (Autoenhance A250; Nemoto Kyorindo, Tokyo, Japan) at a flow rate of 2.0 ml/s, and a total volume of 60 ml for each scan. Both CTAP and CTHA were performed before and 60 min after the embolization procedure in all animals. Follow-up CT (CTAP and CTHA) was performed after 2 ( $n=5$ ) and 3 ( $n=5$ ) weeks. The interval between PVE and scarification ranged from 2 to 6 weeks: 2 weeks ( $n=5$ ), 3 weeks ( $n=2$ ), 4 weeks ( $n=1$ ), and 6 weeks ( $n=2$ ).

### Image analysis

Two radiologists interpreted all of the CT images by consensus. All CTAP images were evaluated for the morphology of portal trunk and branches, the presence of portal occlusion and recanalization, perfusion defects, and periportal hyperattenuation. All CTHA images were also evaluated for the presence of normal or abnormal hepatic arterial perfusion. The extent of perfusion defects or periportal hyperattenuation on CTAP images and

hepatic arterial perfusion on CTHA patterns was recorded based on the following grading system: grade 0, normal; grade 1, no more than 25% of the embolized segment involved; grade 2, 26–50% of the embolized segment involved; grade 3, 51–75% of the embolized segment involved; grade 4, 76–100% of the embolized segment involved.

CTAP images were used to calculate liver volume before and after PVE. The 3-dimensional models of the whole liver were reconstructed on a workstation (Ziosoft M900, Quadra, v. 3.10f; Ziosoft Inc., Tokyo, Japan). Threshold limits were applied to exclude soft tissue surrounding the liver by using a standard algorithm mode that manipulates a voxel matrix of  $512 \times 512$  pixels. The portal vein, biliary tract, and gastrointestinal structures were selectively removed from the model. The embolized fraction of the liver was calculated by measuring the enhanced and non-enhanced areas and dividing the sum of volumes that were not enhanced by the volume of the entire liver. The percentage of voxels with attenuation values below a specified level was defined as the lower attenuation volume. The initial evaluation of the FLR was performed by consensus between two radiologists and was based on calculation of the total estimated liver volume (TELV) on cross-sectional images. TELV was estimated before PVE and follow-up. In addition, a second evaluation of the FLR and TELV was performed by another radiologist to assess reproducibility.

#### *Histopathologic examinations*

On the day of sacrifice, the animals were given an intravenous dose of ketamine-HCl, and portography was performed via the indwelling portal vein catheter. Tissue specimens were immediately collected from each lobe of the liver. Tissue wedges from each lobe of the liver were fixed in 10% neutral buffered formalin and were prepared for paraffin embedding and sectioning. A series of 4- $\mu$ m-thick sections was prepared, mounted on slides, and stained with either hematoxylin-eosin or Masson trichrome. All pathologic specimens were evaluated by one pathologist.

#### *Statistical analysis*

Paired *t* tests were used to determine whether any of the changes in TELV, FLR/TELV ratio, or serum concentrations were statistically significant. Correlation between the serum concentrations of the substances analyzed and the areas of PVE or the duration after PVE and the correlation between the weight of the liver and TELV were assessed by Pearson's correlation coefficients. The agreement

between the CT findings was assessed by using weighted kappa statistics. The kappa statistics and 95% confidence intervals (CIs) were calculated as a measure of agreement. The kappa statistic was interpreted thus: 0.00 to 0.20, slight agreement; 0.21 to 0.40, fair agreement; 0.41 to 0.60, moderate agreement; 0.61 to 0.80, substantial agreement; and 0.80 to 1.00, almost perfect agreement. The significance criterion for all tests was set at the  $P < 0.05$  level.

## Results

### *Imaging findings*

PVE was technically successful in all pigs. Occlusion of the embolized vessel was achieved immediately after the injection of absolute ethanol, and the doses ranged from 0.25 to 0.33 ml/kg. No inflow of portal blood into the embolized portal branches was detected by portography after PVE (Fig. 1). No constriction or obstruction of unembolized vessels was observed.

Early-phase CTAP revealed that the embolized portal branches were dilated by wedge infusion during balloon occlusion (Fig. 2). Late-phase CTAP showed slight obliteration of the embolized branches in all animals (Fig. 2). There was no CT evidence of portal vein recanalization in any of the animals. Perfusion defects in the embolized liver (mean grade 3.0) were identified on CTAP in all animals (Fig. 3). Late-phase CTAP showed periportal hyperattenuation of the embolized portal branches (mean grade 0.7) in 70.0% of the animals (Fig. 4). Both early- and late-phase CTHA were performed after PVE, and parenchymal enhancement in the embolized liver was observed in all animals (Fig. 3).

Findings at follow-up CTAP and CTHA after 2 or 3 weeks demonstrated severe atrophy of the embolized parts of the liver (Fig. 5). Complete occlusion of portal branches without recanalization was found in all animals. The areas of the embolized liver with periportal hyperattenuation on CTAP became completely atrophic, which showed almost perfect agreement (weighted Kappa 0.87; 95% CI: 0.73–1.00). Perfusion defects in the embolized liver were identified on CTAP, and the mean grade was 3.4. CTHA also showed parenchymal enhancement of the embolized liver in all animals. The agreement between the perfusion defects on CTAP and the hepatic arterial hyperperfusion on CTHA was almost perfect (weighted kappa 0.84; 95% CI: 0.67–0.94).

### *Blood samples and CT volumetry*

Complications were not recorded in any animal, and the course after PVE was uneventful. All laboratory

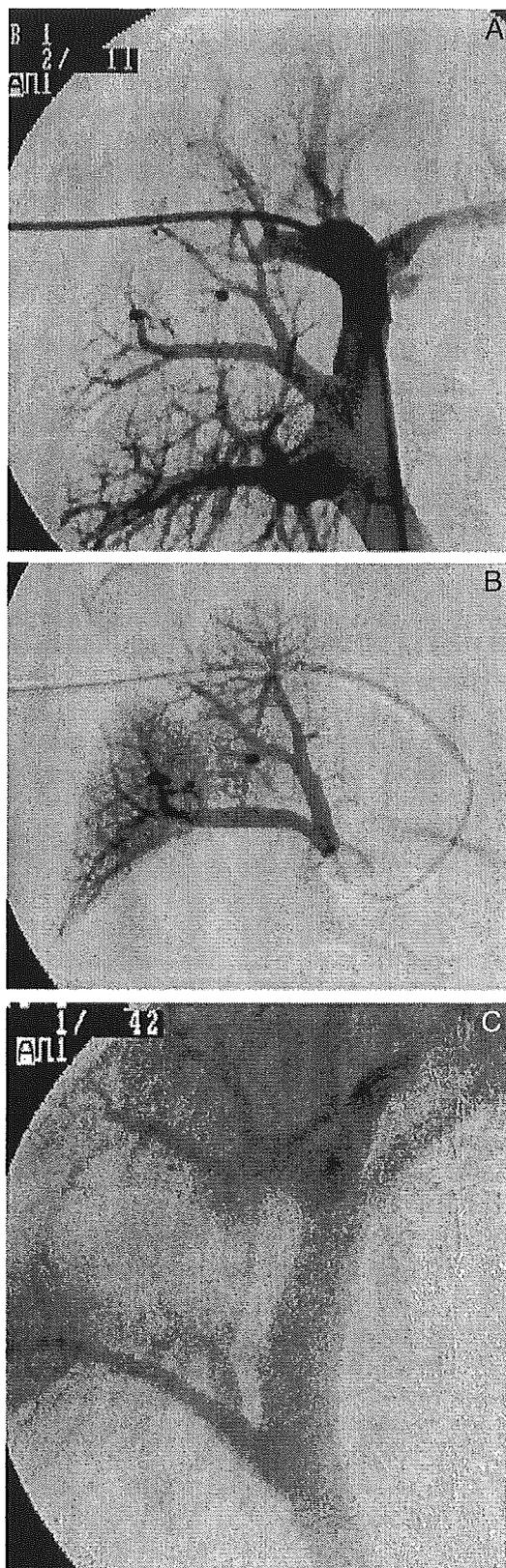


Fig. 1. Percutaneous transhepatic portal vein embolization (PVE) of the posterior portal branches of the right lobe. A. Digital subtraction portography before PVE. B. Digital subtraction portography of the posterior portal branches during balloon occlusion. C. Portography after PVE shows total occlusion of the posterior branches of the right lobe.

values determined to detect hepatic or renal damage were in the normal range before PVE. Statistically significant increases were observed in the serum concentrations of the liver transaminases, alanine aminotransferase, and lactic acid dehydrogenase (Table 1). The serum concentration of alanine aminotransferase depended not only on the interval after PVE ( $P < 0.0001$ ), but also on the size of the PVE areas ( $P < 0.05$ ). The serum lactic acid dehydrogenase concentration was also dependent on the interval after PVE ( $P < 0.05$ ), but not on the size of the PVE areas. No statistically significant correlation were found between PVE areas and serum concentrations of the substances measured including aspartate aminotransferase, the bile canalicule marker alkaline phosphatase, total bilirubin, or creatinine. The average serum ethanol concentration decreased after PVE (range 0.51 mg/dl [3 min] – 0.25 mg/dl [60 min]).

The TELV prior to PVE was  $660.49 \pm 103.66 \text{ cm}^3$  (range 527.22 to 833.70  $\text{cm}^3$ ) and the TELV after PVE was  $769.51 \pm 29.36 \text{ cm}^3$  (range 685.95 to 887.34  $\text{cm}^3$ ). The increase in TELV after PVE was  $109.01 \pm 44.94 \text{ cm}^3$ . The mean increase in FLR/TELV ratio after PVE was 14.2%. There was a statistically significant correlation between liver weight and TELV after PVE ( $r = 0.964$ ,  $P < 0.0001$ ). No statistically significant difference was found between the results of initial and second calculation of TELV.

#### Histopathologic findings

Grossly, the embolized liver appeared yellowish, and contained mass-like (Fig. 6) or amorphous (Fig. 7) areas, predominantly in the parenchyma surrounding Glisson's capsule. Atrophy of the embolized liver was noted in all animals and was seen distinctly at 3 weeks after PVE in 2 animals. Hypertrophy of the unembolized liver was evident at least 2 weeks after PVE. Microscopic examination revealed degenerated hepatocytes with intact lobular architecture in the mass-like areas of the embolized liver (Fig. 8). No hepatic blood perfusion was observed in the sinusoids in tissue fixed with absolute ethanol. Inflammatory infiltration accompanied by giant cells and parenchymal necrosis was seen mainly in the sinusoids at 3–6 weeks after PVE. The portal veins were dilated and occluded with fresh emboli in the amorphous areas in the embolized lobes. Mononuclear cell infiltration was observed in Glisson's capsule without destruction of the hepatic lobule at least 2 weeks after PVE. Degenerated hepatocytes in the embolized lobes were much more likely to be eosinophilic and to

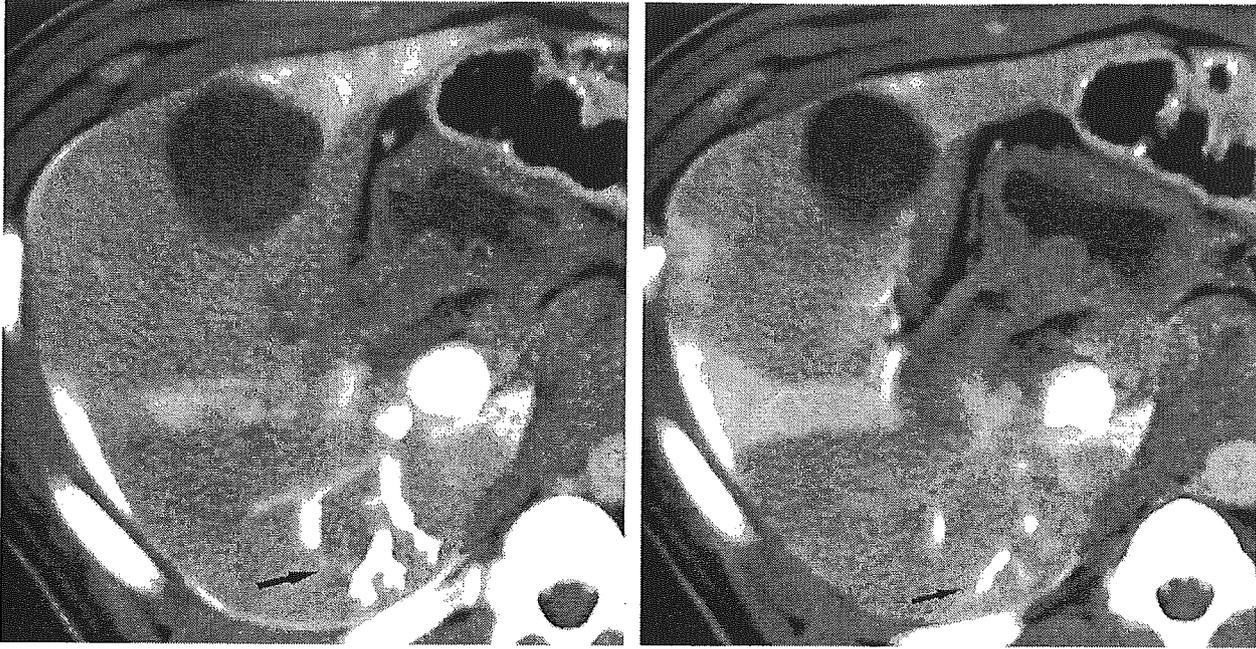


Fig. 2. PVE of the anterior portal branches of the right lobe. A. Early-phase CTAP with wedge infusion during balloon occlusion demonstrates the dilated embolized portal branches (*arrow*). B. Late-phase CTAP shows slight obliteration of the embolized branches (*arrow*).

have a high nuclear-to-cytoplasm (N/C) ratio. Microscopic examination also revealed parenchymal damage and fibrosis 3–6 weeks after PVE. However, no significant changes were observed in either hepatic arteries or bile ducts at any time after PVE.

**Discussion**

The results of this study provide experimental evidence that a regenerative response and histopathologic changes in the liver with an increase of mean FLR/TELV follow PVE in pigs. The results also showed that the serum ethanol concentration after instillation was less than 0.51 mg/dl. These results

suggest that this procedure is safe and followed by only a transient, low serum ethanol level.

PVE leads to atrophy of the lobe embolized and secondary hypertrophy of the unembolized lobes (3, 9, 13). The results of this study confirm the delay and extent of hypertrophy induced in the unembolized lobe and the feasibility of PVE. The results are consistent with the findings in previous studies of PVE effects in pigs (7). The lack of complications after PVE with absolute ethanol in this study may be explained by the fact that the balloon catheter prevented reflux of absolute ethanol.

In our study, no blood perfusion was observed in sinusoids of the embolized liver when the tissue was

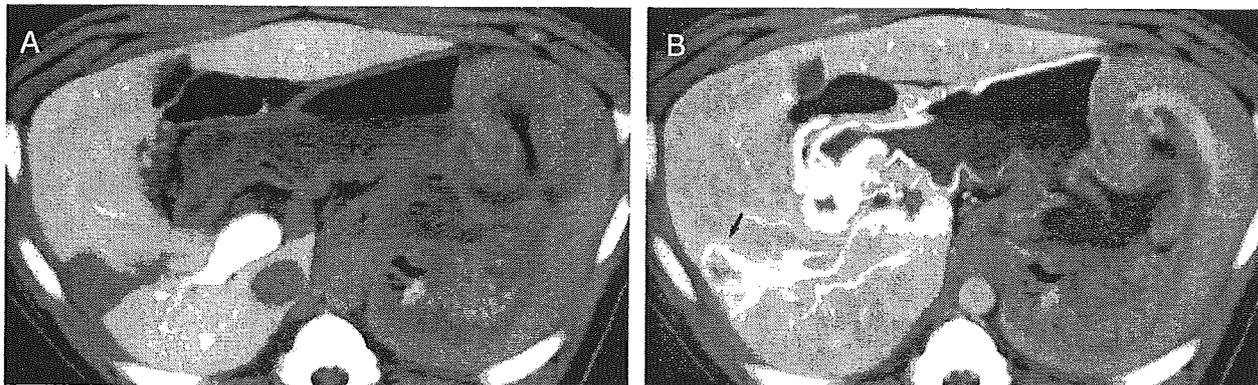


Fig. 3. PVE of the anterior portal branches of the right lobe. A. A perfusion defect was seen in the embolized liver on CTAP. The extent of the perfusion defects ranged from 76% to 100% of the embolized segment involved (grade 4). B. Parenchymal enhancement was observed in the embolized liver. Heterogeneous enhancement with central low attenuation was seen (*arrow*).



Fig. 4. PVE of the portal branches supplying segment IV. Periportal hyperattenuation of the embolized portal branches was observed on CTAP (arrows). The extent of periportal hyperattenuation was less than or equal to 25% of the embolized segment involved (grade 1).

fixated with absolute ethanol. Nevertheless, our observations conflict with the findings of previous studies suggesting that absolute ethanol is advantageous as a destructive embolizing agent for liver

tissue in rats (7, 8). The investigators reported that the thrombi allowed incomplete obstruction or recanalization of vessels in the short term after PVE. This apparent discrepancy must be attributable to the procedure used to infuse absolute ethanol during balloon occlusion. Our results seem to suggest that dilution occurs more readily and the affected tissue is more likely to be fixated by absolute ethanol.

Significant increases in the serum concentrations of alanine aminotransferase and lactic acid dehydrogenase were observed in our study. The relationship between the concentrations of substances measured in the serum samples and areas of PVE showed that the serum concentration of alanine aminotransferase depended on the interval after PVE. The serum lactic acid dehydrogenase concentration was also dependent on the interval after PVE. Both values peaked at a level less than three times the baseline value 1–3 days after PVE and returned to the baseline value at 7–10 days (16). The serum transaminase concentrations rose in proportion to the dose of absolute ethanol injected in dogs

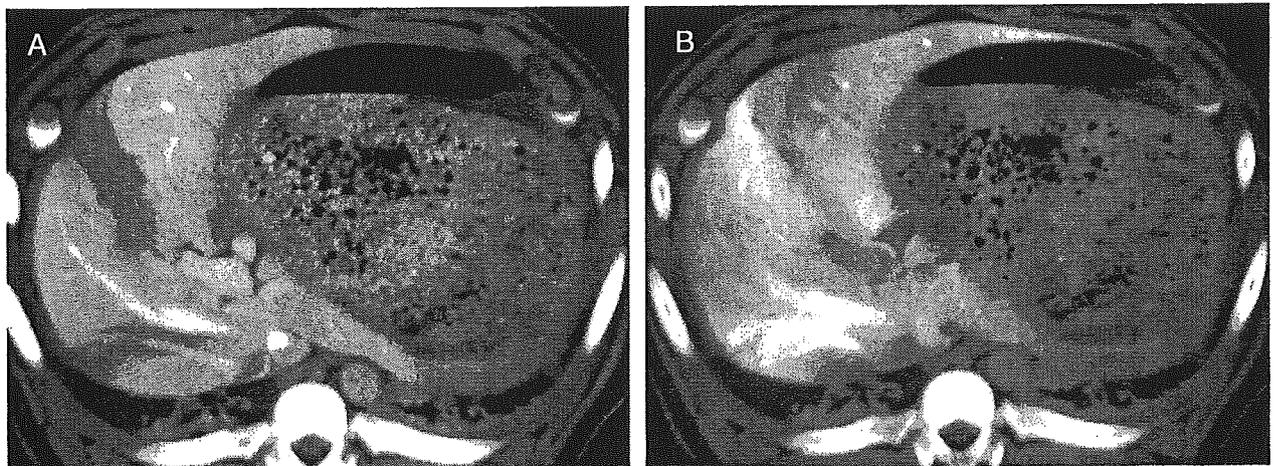


Fig. 5. Six weeks after PVE of the anterior portal branches. A. Perfusion defects with severe atrophy of the embolized liver were identified on CTAP, and the grade was 4. B. CTHA showed parenchymal enhancement corresponding to the perfusion defects on CTAP.

Table 1. Changes of serum concentration of blood samples after PVE

	Pre-PVE	Post-PVE	P value
ALT (U/L)	33.1 ± 7.2 (25–48)	400.7 ± 185.4 (70–691)	<0.05
AST (U/L)	56.7 ± 26.2 (34–121)	66.8 ± 25.8 (44–112)	ns
Total bilirubin (mg/dl)	0.01 ± 0.03 (0.00–0.10)	0.02 ± 0.04 (0.00–0.10)	ns
LDH (U/L)	808.5 ± 276.1 (447–1461)	1279.7 ± 717.4 (582–2945)	<0.05
ALP (U/l)	237.0 ± 45.3 (173–325)	249.0 ± 51.1 (170–325)	ns
Creatinin (mg/dl)	0.91 ± 0.10 (0.76–1.02)	0.93 ± 0.20 (0.79–1.12)	ns

ALT=Alanine aminotransferase, AST=asparate aminotransferase, LDH=lactic acid dehydrogenase, ALP=alkaline phosphatase.

All values after PVE were measured on the day of sacrifice.

ns=not significant.

Changes in serum concentration of blood samples were assessed using the Friedman test.

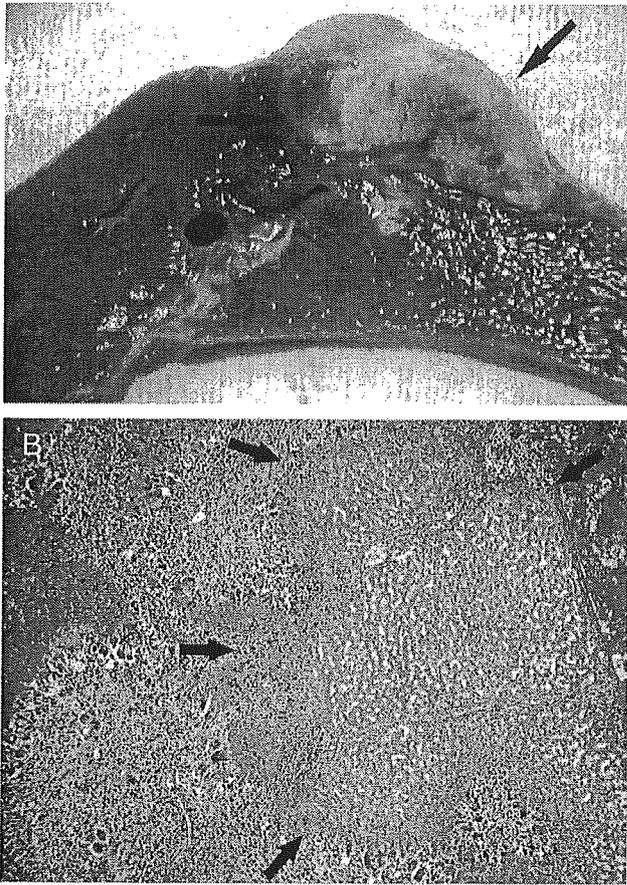


Fig. 6. A. Cut surface of a specimen of the embolized liver 3 weeks after PVE shows yellowish mass-like areas adjacent to Glisson's capsule (arrows). B. Numerous degenerated hepatocytes are identified but the lobular architecture of the liver is preserved (arrows).

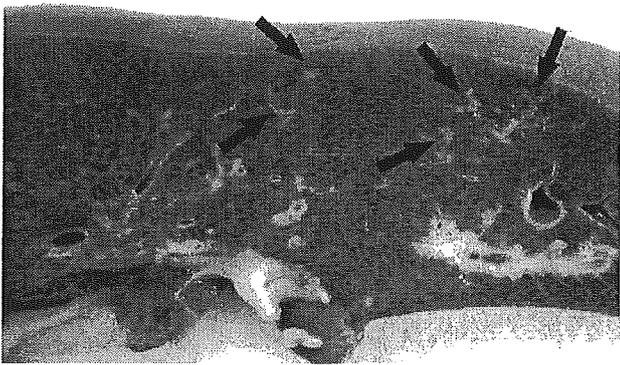


Fig. 7. Cut surface of a specimen of the embolized liver 3 weeks after PVE demonstrates yellowish amorphous areas in Glisson's capsule (arrows).

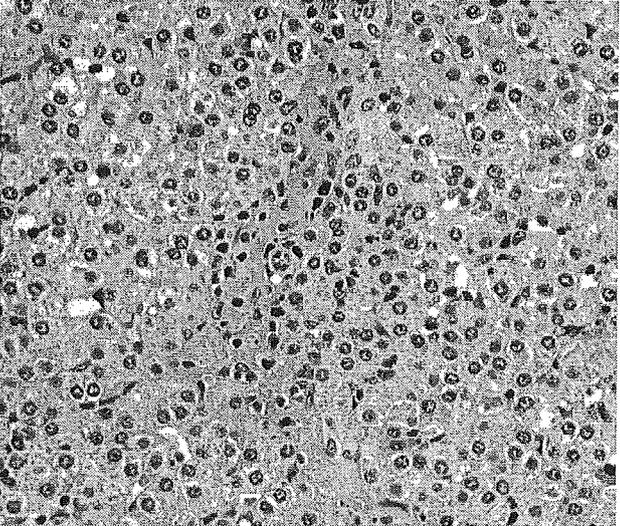


Fig. 8. Degenerated hepatocytes in the embolized lobes are more likely to be eosinophilic and to have a high nucleus-to-cytoplasm (N/C) ratio.

(22). The significant and transient increases in transaminases after PVE may be explained by extensive peribiliary inflammation and hepatic necrosis observed histopathologically. The increases were caused by massive cell destruction by ethanol, and the clearance of the enzymes was rapid and correlated with the fast reabsorption of the necrotic tissue observed pathologically. The serum ethanol

concentration increased within the first 3 min after injection in every animal. PVE with absolute ethanol is associated with minimal side effects and is considerably less toxic.

Table 2. The difference of serum concentration of blood samples between segmental and subsegmental PVE

	Segmental PVE	Subsegmental PVE	P value
ALT post-pre (U/L)	352.5 ± 83.7	390.3 ± 91.1	ns
AST post-pre (U/L)	10.2 ± 6.9	10.0 ± 2.6	ns
Total bilirubin post-pre (mg/dl)	0.02 ± 0.02	0	ns
LDH post-pre (U/L)	592.7 ± 245.7	289.0 ± 109.1	<0.05
ALP post-pre (U/l)	9.3 ± 20.9	16.0 ± 7.3	ns
Creatinin post-pre (mg/dl)	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.03	ns

Data are presented as post-PVE minus pre-PVE. ALT=Alanine aminotransferase, AST=asparate aminotransferase, LDH=lactic acid dehydrogenase, ALP=alkaline phosphatase.

ns=not significant. The diffence of serum concentration of blood samples between segmental or subsegmental PVE was assessed by two-way analysis of variance (ANOVA).

Since ethanol only causes tissue necrosis above a certain concentration, it must be delivered to the target segment of the liver without systemic dilution. To achieve this, we rapidly and forcibly injected ethanol via a catheter wedged into the portal vein, thereby obstructing portal blood flow to the target segment. There is a paucity of information on the systemic effects of absolute ethanol after PVE (1). The results of the present study are consistent with previous results and revealed that this procedure is safe and associated with only a transient appearance of low ethanol levels in serum.

Ethanol causes tissue fixation, sludging of blood cells, and protein denaturation and coagulation. In our study, the portal veins dilated and thrombosed when they came into contact with ethanol. Animal studies (10, 20, 22) of portal vein occlusion have shown that the hepatocytes in the embolized lobes undergo apoptosis. Hepatocyte apoptosis is likely to explain the minimal alterations in liver function tests observed in human studies (7, 8). However, no hepatocyte apoptosis was observed in the embolized lobes in our study. Our findings were attributable to tissue fixation by absolute ethanol that induced hepatocytes degeneration without destruction of the lobular architecture of the embolized lobe. Therefore, damage to hepatocytes by tissue fixation may result in parenchymal necrosis.

The safety of the PVE procedure may allow expansion of its indications to patients with insufficient remnant liver volume. It has been hypothesized that liver regeneration is attributable to the ability of hepatocytes to dedifferentiate and expand clonally (1). Intrahepatic and extrahepatic factors may also contribute to the induction and control of hepatocyte growth (13). Additional randomized study of the PVE procedure will improve our understanding of the mechanisms in liver regeneration.

In conclusion, a regenerative response and histopathologic changes in the liver follow PVE in pigs. The induction of liver necrosis can be well controlled and these changes are followed by a regenerative response in the remnant liver.

## References

1. Abdalla EK, Hicks ME, Vauthey JN. Portal vein embolization: rationale, technique, and future prospects. *Br J Surg* 2001;88:165-75.
2. Azoulay D, Raccuia JS, Castaing D, Bismuth H. Right portal vein embolization in preparation for major hepatic resection. *J Am Coll Surg* 1995;181:267-9.
3. Azoulay D, Castaing D, Smail A, Adams R, Cailliez V, Laurent A, et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg* 2000;231:480-6.
4. Cheng Y, Kan Z, Chen C, Huang T, Chen T, Tang B, et al. Efficacy and safety of preoperative lobar or segmental ablation via transarterial administration of ethiodol and ethanol mixture for treatment of hepatocellular carcinoma: clinical study. *World J Surg* 2000;24:844-50.
5. de Baere T, Roche A, Elias D, Lasser P, Lagrange C, Bousson V. Preoperative portal vein embolization for extension of hepatectomy indications. *Hepatology* 1996;24:1386-91.
6. de Baere T, Roche A, Vavasseur D, Therasse E, Indushekar S, Elias D, et al. Portal vein embolization: utility for inducing left hepatic lobe hypertrophy before surgery. *Radiology* 1993;188:73-7.
7. Duncan JR, Hick ME, Cai SR, Brunt EM, Ponder KP. Embolization of portal vein branches induces hepatocyte replication in swine: a potential step in hepatic gene therapy. *Radiology* 1999;210:467-77.
8. Ikeda K, Kinoshita H, Hirohashi K, Kubo S, Kaneda K. The ultrastructure, kinetics and intralobular distribution of apoptotic hepatocytes after portal branch ligation with special reference to their relationship to necrotic hepatocytes. *Arch Histol Cytol* 1995;58:171-84.
9. Imamura H, Shimada R, Kubota M, Matsuyama Y, Nakayama A, Miyagawa S, et al. Preoperative portal vein embolization: an audit of 84 patients. *Hepatology* 1999;29:1099-105.
10. Kaminou T, Nakamura K, Onoyama Y, Fujimoto T. Experimental selective segmental ablation of rat liver by transportal ethanol injection. *Eur Radiol* 6, 502-9.
11. Kawasaki S, Makuuchi M, Miyagawa S, Kakazu T. Radical operation after portal embolization for tumor of hilar bile duct. *J Am Coll Surg* 1994;178:480-6.
12. Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K, Igawa S, Yamasaki O, Kubo S. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg* 1986;10:803-8.
13. Kubota K, Makuuchi M, Kusaka K, Kobayashi T, Miki K, Hasegawa K, et al. Measurement of liver volume and hepatic functional reserve as a guide to detection-making in resectional surgery for hepatic tumors. *Hepatology* 1997;26:1176-81.
14. Lee KC, Kinoshita H, Hirohashi K, Kubo S, Isawa R. Extension of surgical indications for hepatocellular carcinoma by portal vein embolization. *World J Surg* 1993;17:109-15.
15. Lu MD, Liang LJ, Huang JF, Ye WJ, Yang QS, Peng BG, et al. Portal vein embolization with ethanol injection via a fine needle in dogs. *Surg Today* 1995;25:416-20.
16. Madoff DC, Hick ME, Abdalla EK, Morris JS, Vauthey JN. Portal vein embolization with polyvinyl alcohol particles and coils in preparation for major liver resection for hepatobiliary malignancy: safety and effectiveness study in 26 patients. *Radiology* 2003;227:251-60.
17. Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunyen P, et al. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. *Surgery* 1990;107:521-7.
18. Nagino M, Kamiya J, Kanai M, Uesaka K, Sano T, Yamamoto H, et al. Right trisegment portal vein

- embolization for biliary tract carcinoma: technique and clinical utility. *Surgery* 2000;127:155-60.
19. Nagino M, Nimura Y, Kamiya J, Kondo S, Uesaka K, Kin Y, et al. Right or left trisegment portal vein embolization before hepatic trisegmentectomy for hilar bile duct carcinoma. *Surgery* 1995;117:677-81.
  20. Ogasawara K, Uchino J, Une Y, Fujioka Y. Selective portal vein embolization with absolute ethanol induces hepatic hypertrophy and makes more extensive hepatectomy possible. *Hepatology* 1996;23:338-45.
  21. Shimamura T, Nakajima Y, Une Y, Namieno T, Ogasawara K, Yamashita K, et al. Efficacy and safety of preoperative percutaneous transhepatic portal embolization with absolute ethanol: a clinical study. *Surgery* 1997;121:135-41.
  22. Yamakado K, Takeda K, Nishide Y, Jin J, Matsumura A, Hirano T, et al. Portal vein embolization with steel coils and absolute ethanol: a comparative experimental study with canine liver. *Hepatology* 1995;22:1812-8.



## Technical note

## Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array

Shinji Sugiura<sup>a,b,c</sup>, Tatsuya Oda<sup>d,e</sup>, Yasuhiko Izumida<sup>a</sup>, Yasuyuki Aoyagi<sup>d</sup>, Mitsuo Satake<sup>f</sup>, Atsushi Ochiai<sup>e</sup>, Nobuhiro Ohkohchi<sup>d</sup>, Mitsutoshi Nakajima<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Food Engineering Division, National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan<sup>b</sup>The Organization for Pharmaceutical Safety and Research, 3-3-2 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan<sup>c</sup>Radiology Division, National Cancer Center Hospital East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8577, Japan<sup>d</sup>Department of Surgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan<sup>e</sup>Pathology Division, National Cancer Center Research Institute East, 6-5-1 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8577, Japan<sup>f</sup>Diagnostics Radiology Division, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo Ku, Tokyo 104-0045, Japan

Received 9 April 2004; accepted 26 August 2004

Available online 30 September 2004

## Abstract

Size-controlled small (i.e. less than 300  $\mu\text{m}$ ) polyelectrolyte complex gel beads are urgently desired for wide-spread application, including use in medical, pharmaceutical, and bioengineering fields. However, it was impossible to obtain smaller beads less than 300  $\mu\text{m}$  with conventional apparatuses. We developed a novel microfluidics device that utilizes silicon micro-nozzle (MN) array, enabling to produce 50–200  $\mu\text{m}$  calcium alginate beads with a narrow size distribution. Alginate aqueous solution was extruded through a precisely fabricated thin (30  $\mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$ ) and short (500  $\mu\text{m}$ ) MN and was sheared by the viscous drag force of oil flow to form alginate droplets. Alginate droplets were immediately reacted with  $\text{CaCl}_2$  droplets at the downstream of oil flow to form calcium alginate gel beads. This device enabled us to successfully encapsulate living cells into 162  $\mu\text{m}$  calcium alginate beads with maintaining viability, which was confirmed by the expression of marker protein.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Alginate; Cell encapsulation; Microcapsule; Micromachining; Microstructure; Size control

## 1. Introduction

Spherical gel beads containing living cells have been applied in the transplantation of pancreatic islet into diabetic animals [1,2], treatment of hormone or protein deficient diseases [3], and cancer therapy [4–6]. Another utilization includes microcarriers [7], scaffold [8] for cell cultures and tissue engineering [9]. As gel materials, polyelectrolyte complex systems have often been used. Among them, calcium alginate is the most commonly employed system for its easiness in gel formation. Once

liquid alginate solutions are contacted with polycation ( $\text{Ca}^{2+}$ ), they immediately transformed into gel by binding between guluronic acid blocks in alginate and  $\text{Ca}^{2+}$ .

Smaller beads offer many advantages, such as better transportation of nutrients and oxygen [10], better dispersion, better mechanical strength, easier implantation, and potential access to new implantation sites [11]. Widely used production techniques for preparing polyelectrolyte complex gel beads include the vibrating nozzle method and coaxial air-flow method [12]. Calcium alginate beads with 300–800  $\mu\text{m}$  diameters have been successfully prepared using these methods. Though preparation of smaller beads with 170  $\mu\text{m}$  diameter was reported through the electrostatic droplet generation

\*Corresponding author. Tel.: +81-298-38-7997; fax: +81-298-38-8122.

E-mail address: [mnaka@affrc.go.jp](mailto:mnaka@affrc.go.jp) (M. Nakajima).