

TVE Facilitates the *In Vivo* Gene Transfer of lacZ Gene Into Rat Liver

The transduction efficiencies of HVJ-liposome mediated gene transfer into the rat liver *in vivo* was assessed by β -galactosidase (lacZ) staining. As shown in Fig. 3B, β -gal positive cells were observed in the periportal area in the PVI group, and approximately 5% of all parenchymal cells were positively stained. These effects were dramatically enhanced by PVI + TVE, thus showing that more than 50% of all hepatocytes became β -gal positive (Fig. 3C, $n = 7$). The difference between the PVI and PVI + TVE group was statistically different (Fig. 3D). Gene transfer was dispersed throughout each of the liver lobes. No blue color staining was seen in the control (saline) group (Fig. 3A, $n = 6$). No extrahepatic transgene expression could be detected in any other organs such as the lung, spleen, kidney, heart, and testis in all groups (data not shown). These data demonstrated that the exogenous gene could thus be efficiently and selectively delivered to the liver *in vivo* using HVJ-liposome by the PVI + TVE method.

TVE Reduces the Extrahepatic Transgene Expression

To quantitatively estimate the transfection efficiency, luciferase gene loaded-HVJ-liposome was injected to the animals. Based on the results of the previous study [12], at 3 days after transfection, these animals were sacrificed, from which various organs were removed to measure the luciferase activities. Figure 4 shows that TVE dramatically enhanced the gene transfer efficiency in the liver, whereas negligible luciferase activities were found in the other extrahepatic organs such as lung, heart, and kidney. In addition, repeated (double) PVI did not significantly increase the level of transgene expression in the liver

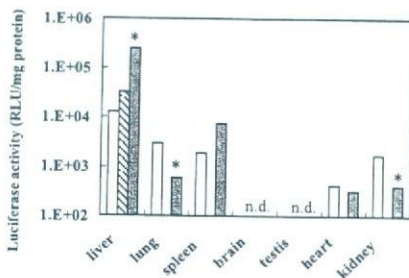


FIG. 4. Organ distribution of transgene expression after gene transfer. Luciferase gene was introduced into the liver through portal vein (PVI group) or PVI under TVE. TVE was found to greatly enhance the luciferase gene expression level in the liver, whereas the levels of lung and kidney significantly decreased (white rectangle; PVI, black rectangle; PVI + TVE). Slight increase of transgene expression was found in the spleen. As for the liver, a double PVI group was also investigated to determine the effect of repeated PVI (hatched rectangle). * $P < 0.05$ versus the other group. (n.d., not detected.)

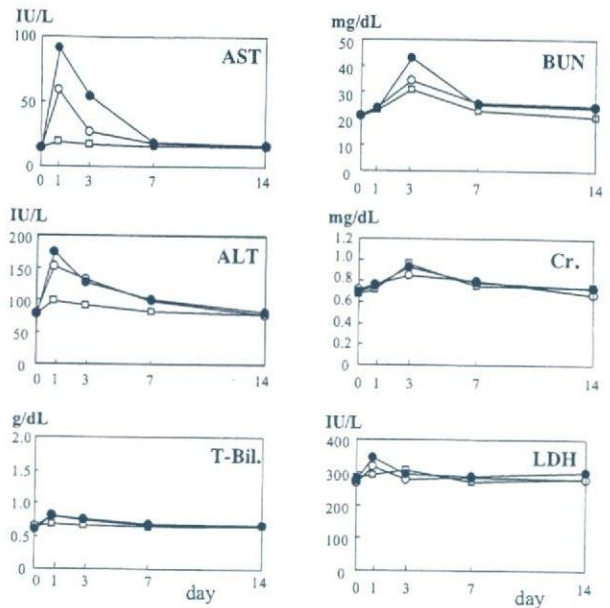


FIG. 5. Changes of biochemical parameters after gene transfer. Although, liver enzymes were elevated 24 h after gene transfer, it was normalized in 14 days. Transient increase of BUN was also evident. There was no statistically significant difference between PVI and PVI + TVE groups. (Closed circle; PVI + TVE, open circle; PVI, closed square; control). Abbreviations: AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine transaminase; T-Bil, total bilirubin; BUN, blood urea nitrogen; Cr., creatinine; LDH, lactate dehydrogenase; AST, aspartate alanin transferase.

HVJ-Liposome Mediated Gene Transfer Under TVE is Safe

Serum samples were collected at 1, 3, 7, 14 days after transfection. As shown in Fig. 5, TVE induced transient liver enzyme deterioration, however, completely normalized by 14 days after transfection. The value of BUN also transiently increased after transfection, although the creatinine level, which is another indicator of the renal function, did not significantly deteriorate. In addition, no histologically toxic findings were observed in any of the tissue specimens including the liver for up to 6 months (Fig. 6).

DISCUSSION

Numerous gene therapy protocols have been developed and applied to patients, however, very few cases have thus far shown successful results. Improving the therapeutic efficacy of *in vivo* gene therapy in clinical trials mainly depends on the gene transfection efficiency to the target tissues, while preventing any leakage to the non-target tissues. Namely, safer and more efficient gene transfer vectors for humans need to be developed. For liver directed gene therapy, a great many strategies have been reported, that is, the use of albumin promoter, asialoglycoprotein ligand-receptor, *ex vivo* approach using retrovirus, and adenovirus that demonstrates tropism to the liver [17–20].

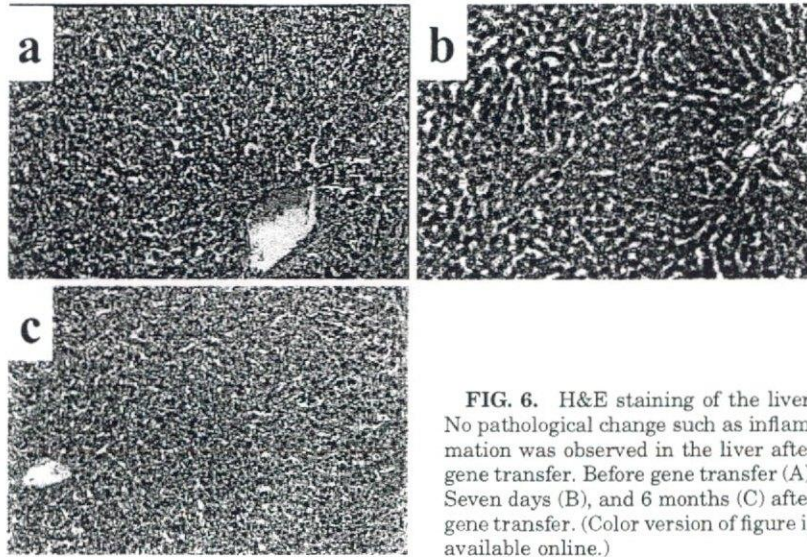


FIG. 6. H&E staining of the liver. No pathological change such as inflammation was observed in the liver after gene transfer. Before gene transfer (A). Seven days (B), and 6 months (C) after gene transfer. (Color version of figure is available online.)

The HVJ-liposome method has been reported to be an efficient vehicle for various organs including the liver [12], however, it does not appear to demonstrate strong liver-tropism, similar to adenovirus. There are two types of HVJ-liposomes regarding the net charge of liposome used, one of which is negatively charged "anionic" liposome and the other is positively charged "cationic" liposome [21]. We selected HVJ-anionic-liposome because its negative charge has been reported to inhibit the attachment of the liposome to the vascular wall, thereby allowing perfusion throughout the liver, while the HVJ-liposome is trapped mainly by parenchymal hepatocytes. Our pilot experiments showed that portal vein injection resulted in a more efficient gene expression in the liver in comparison to the intravenous injection from the tail vein. Therefore, for liver directed gene transfer using HVJ-liposome, some modification of the delivery method will be needed. In the case of a one shot injection from the portal vein, a significant amount of vectors would pass through the liver without attaching themselves and thus being transfected to parenchymal cells, because the luciferase activities of the extrahepatic organs were barely detected after transfection via portal vein. TVE of the liver has been exploited for decades during major hepatectomy in clinics [22–28]. We hypothesized that prolonged retention time of the vehicles in the liver may facilitate the HVJ-liposome to contact with the parenchymal hepatocytes, thereby enhancing its fusion process. Furthermore, TVE of the liver would possibly increase the openings of sinusoidal fenestrae beyond their normal size of 100 nm to enable HVJ-liposome with an >150 nm in size to pass through. At hepatic surgery, we sometimes experienced that transient occlusion of inflow vessels, portal vein and hepatic artery would paradoxically improve liver function after operation [29]. Indeed, data obtained from the present ex-

periments clearly showed that these surgical pretreatments would not induce any detrimental effects for general conditions of the rats according to biochemical parameters and histopathological analyses. Contrary to our expectations, the level of transgene expression in the spleen was observed to increase, which probably reflects the liver and spleen association via the portal venous circulation. Thus, HVJ-liposome mediated gene transfer under TVE of the liver may be one promising approach in the field of hepatic gene therapy. Although our data provided evidence of efficacy and safety of TVE in rats, selective hepatic lobe exclusion with infusion of the vectors might be safer [30].

With regard to clinical application, the suitable target diseases for our strategy would include correction of liver enzyme deficiency, genetic modification during liver resection, or gene therapy for liver cancer.

In conclusion, TVE enhances the liver directed gene transfer by using HVJ-liposome method without causing any detrimental effect to the general conditions in animals, supporting potential use of this strategy to treat liver diseases. TVE could be applicable to other viral or non-viral gene transfer systems to enhance liver specific gene transfer.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Dr. H. Satoh, for approval of animal experimentation, in the laboratory of the Animal Center for Biomedical Research, Nagasaki University School of Medicine.

REFERENCES

1. Anderson, W. F. Human gene therapy. *Science* **256**: 808, 1992.
2. Miller, A. D. Human gene therapy comes of age. *Nature* **357**: 455, 1992.
3. Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* **270**: 475, 1995.

4. Horwich, A. L. Inherited hepatic enzyme defects as candidates for liver-directed gene therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **168**: 185, 1991.
5. Goins, W. F., Wolfe, D., Krisky, D. M., et al. Delivery using herpes simplex virus: An overview. *Methods Mol. Biol.* **246**: 257, 2004.
6. Kafri, T. Gene delivery by lentivirus vectors an overview. *Methods Mol. Biol.* **246**: 367, 2004.
7. Buning, H., Nicklin, S. A., Perabo, L., Hallek, M., and Baker, A. H. AAV-based gene transfer. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **5**: 367, 2003.
8. Herweijer, H., Zhang, G., Subbotin, V. M., Budker, V., Williams, P., and Wolff, J. A. Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J. Gene. Med.* **3**: 280, 2001.
9. Smyth Templeton, N. Liposomal delivery of nucleic acids in vivo. *DNA Cell. Biol.* **21**: 857, 2002.
10. Kaneda, Y., Iwai, K., and Uchida, T. Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science* **243**: 375, 1989.
11. Kato, K., Nakanishi, M., Kaneda, Y., Uchida, T., and Okada, Y. Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. Co-introduction of DNA and nuclear protein by a simplified liposome method. *J. Biol. Chem.* **266**: 3361, 1991.
12. Hirano, T., Fujimoto, J., Ueki, T., et al. Persistent gene expression in rat liver in vivo by repetitive transfections using HVJ-liposome. *Gene Ther.* **5**: 459, 1998.
13. Arnone, M. I., Dmochowski, I. J., and Gache, C. Using reporter genes to study cis-regulatory elements. *Methods Cell. Biol.* **74**: 621, 2004.
14. Kawashita, Y., Ohtsuru, A., Kaneda, Y., et al. Regression of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation. *Hum. Gene. Ther.* **10**: 1509, 1999.
15. Kawashita, Y., Ohtsuru, A., Fujioka, H., et al. Safe and efficient gene transfer into porcine hepatocytes using Sendai virus-cationic liposomes for bioartificial liver support. *Artif. Organs.* **24**: 932-938, 2000.
16. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248, 1976.
17. Ponder, K. P., Dunbar, R. P., Wilson, D. R., Darlington, G. J., and Woo, S. L. Evaluation of relative promoter strength in primary hepatocytes using optimized lipofection. *Hum. Gene. Ther.* **2**: 41, 1991.
18. Herweijer, H., and Wolff, J. A. Progress and prospects: Naked DNA gene transfer and therapy. *Gene. Ther.* **10**: 453, 2003.
19. Chowdhury, J. R., Grossman, M., Gupta, S., Chowdhury, N. R., Baker, J. R., Jr., and Wilson, J. M. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* **254**: 1802, 1991.
20. Ilan, Y., Droguett, G., Chowdhury, N. R., et al. Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular immune responses and permits long-term gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 2587, 1997.
21. Kaneda, Y. Development of a novel fusogenic viral liposome system (HVJ-liposomes) and its applications to the treatment of acquired diseases. *Mol. Membr. Biol.* **16**: 119, 1999.
22. Yin, Z. Y., Wang, X. M., Yu, R. X., et al. Total vascular exclusion technique for resection of hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **9**: 2194, 2003.
23. Torzilli, G., Makuuchi, M., Midorikawa, Y., et al. Liver resection without total vascular exclusion: Hazardous or beneficial? An analysis of our experience. *Ann. Surg.* **233**: 167, 2001.
24. Habib, N., Zografos, G., Dalla Serra, G., Greco, L., and Bean, A. Liver resection with total vascular exclusion for malignant tumours. *Br. J. Surg.* **81**: 1181, 1994.
25. Emond, J., Wachs, M. E., Renz, J. F., et al. Total vascular exclusion for major hepatectomy in patients with abnormal liver parenchyma. *Arch. Surg.* **130**: 824, 1995.
26. Moussa, M. E., Sarraf, C. E., Uemoto, S., Sawada, H., and Habib, N. A. Effect of total hepatic vascular exclusion during liver resection on hepatic ultrastructure. *Liver Transpl. Surg.* **2**: 461, 1996.
27. Berney, T., Mentha, G., and Morel, P. Total vascular exclusion of the liver for the resection of lesions in contact with the vena cava or the hepatic veins. *Br. J. Surg.* **85**: 485, 1998.
28. Evans, P. M., Vogt, D. P., Mayes, J. T., 3rd, Henderson, J. M., and Walsh, R. M. Liver resection using total vascular exclusion. *Surgery* **124**: 807, 1998.
29. Man, K., Fan, S. T., Ng, I. O., Lo, C. M., Liu, C. L., and Wong, J. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study. *Ann. Surg.* **226**: 704, 1997.
30. Smyrniotis, V. E., Kostopanagiotou, G. G., Contis, J. C., et al. Selective hepatic vascular exclusion versus Pringle maneuver in major liver resections: Prospective study. *World J. Surg.* **27**: 765, 2003.

2. 部分切除*

江口 晋 兼松隆之**

【要旨】 高度の肝硬変を伴う肝細胞癌(HCC)に対する低侵襲術式としての部分切除術について概説した。適応としては①肝硬変が高度なために肝予備能が低下し、肝癌の解剖学的切除に耐術できない症例、②肝縁および肝表面に存在する被膜を伴う小肝癌などが考えられる。とくに肝予備能が低下している症例では、部分切除とその他の切除では5年生存率はとくに有意差を認めなかった。また、他の治療法との比較でも、肝予備能が低下している症例でも可能ならば部分切除を施行することで予後を改善させうることが示唆された。

はじめに

肝癌は肝硬変を母地とする多中心性発癌も多く、また背景肝不全が致命的になることもあり、「深達度が浅い小病変なら長期予後は良好である」という一般的な癌治療の概念は適応しない。肝癌の治療として、癌の根治を期するあまりに障害肝を併存した肝癌に対しても広範囲切除にこだわり、術後肝不全も少なくなかった。1980年代のはじめごろまで肝切除後の肝不全発生率は約10%を超えていた。そこで筆者らは、高度肝障害を有する肝癌例に対する縮小手術を提唱した¹⁾。すなわち、高度肝障害(Child-Pugh B～C、肝障

害度B～C)を有する肝硬変合併肝癌に対しては、悪性腫瘍に対する従来の外科治療原則とは別の立場で腫瘍のみを摘出し、非癌部肝組織を可及的に温存する術式—縮小手術, limited resectionが容認されるのではないかと考えたのである。ここでいう縮小手術とは、腫瘍の核出に主眼を置いたもので、肝硬変併存肝癌に対する外科治療概念であり、最低1 cmのマージンを確保した肝部分切除が一般的である。

そこで本稿では、肝部分切除の概論およびその肝細胞癌(HCC)に対する治療効果、とくに患者生存率などに対するアウトカムをEBM(evidence based-medicine)的に検証していきたい。

I. 肝部分切除の定義

肝腫瘍辺縁より肝実質を1cm程度つける小範囲肝切除を肝部分切除(limited resection)と呼び、肝葉、区域、亜区域切除などの系統的切除を除く肝切除を総称している。腫瘍が肝辺縁に浅く存在

キーワード：肝細胞癌，部分切除，解剖学的切除，肝硬変

* Limited hepatic resection for hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis

** S. Eguchi, T. Kanematsu(教授)：長崎大学大学院移植・消化器外科。

する場合の肝部分切除を楔状切除(wedge resection)と呼ぶこともある。また腫瘍被膜ぎりぎりでの切除を核出術(enucleation)として区別している。腫瘍を含めた支配門脈領域を系統的に切除する系統的亜区域切除に対し、肝部分切除は腫瘍支配門脈域と無関係な非解剖学的小範囲肝切除である。第16回日本肝癌研究会追跡調査ではHCC切除例($n=5,003$)において部分切除は33.1%($n=1,645$)に、亜区域切除は22.5%($n=1,127$)に行われていた²⁾。

II. 肝部分切除の適応

HCCでは安全な切除範囲が背景肝疾患の重症度により自ずから規定されているという特徴がある。肝部分切除の適応としては①肝硬変が高度なために肝予備能が低下し、肝癌の解剖学的切除に耐術できない症例、②肝縁および肝表面に存在する被膜を伴う小肝癌などが考えられる。また、腫瘍が複数の別区域に存在する場合や、別亜区域の境界部に腫瘍が存在する場合は、肝部分切除の適応となることがある。

III. 肝部分切除での肝予備能検査

筆者らはICG15分停滞率(ICGR₁₅)およびアシアロ肝シンチでのLHL15を肝予備能評価に用いている。加えて一般的な血清Alb値、Bil値などを用いた肝障害度およびChild-Pugh分類などを用い耐術可能かを客観的に評価する。また治療法、手術術式選択はICGR₁₅値、T-Bil値、プロトロンビン時間、術中門脈圧により決定している。幕内らの基準によると、系統的亜区域切除が不可能な肝機能の症例、すなわちT-Bilが正常でICGR₁₅値が30%以上の症例、T-Bilが 1.0 mg/dl 以上の症例が肝部分切除の対象となる³⁾。肝機能がこの基準より良好であっても、系統的切除が不可能な複数個の切除の場合も部分切除の適応となりえる。

IV. 手術手技

当科では、基本的には超音波外科吸引装置(CUSA)、電気メス、結紮、血管クリップを用い

て部分切除を施行している。とくに肝硬変が高度な症例ではマイクロターゼを用いてまずHCC周囲を焼灼した後に、CUSAを用いた肝切除を施行することもあるが、最近ではダイセクティングシーラー(Tissue Link社)を用い、部分切除を行うこともある。肝門操作では必要なGlisson一括処理を行い、個別処理に伴う術後の腹水や出血などの危険性を減ずる。肝表面の腫瘍やS₃、S₆の辺縁に突出する腫瘍では、腹腔鏡下肝部分切除術も可能である。術中超音波検査にて腫瘍の性状、解剖学的な脈管との位置関係の把握、他病変の有無を検査する。その後、術中超音波検査(US)にて腫瘍の辺縁から1~2cm離して電気メスにより切離線をつける。このさい、肝静脈の走行や結紮すべきGlissonの位置を把握しておく。Inflow controlが必要な場合は、Glisson一括処理にて左枝、右前区、右後区のテーピングを行いプラスチックチューブをターニケットにて選択的に25分遮断、5分開放を繰り返して行い、血流解除前に肝離断面にオキシセル綿をあて、乾ガーゼをはさんで圧迫止血し解除する。この間に腫瘍と離断面との位置関係をUSでよく観察し、腫瘍が露出しないように注意する。どの深さで腫瘍の背面に離断面をかえていくのかもUSで観察し決定する。肝切離終了後、ターニケットをはずし血流を再開し、離断面の出血をチェックする。

V. 肝部分切除のさいのマージン

部分切除を施行するさいには、腫瘍とのマージンを確保するように努め、局所再発を可及的に防止することが重要である。TakanoらはHCCに対する肝切除300例を解析し、cancer-free marginが1cm以上と1cm未満で有意な無再発生存率の差を認めている⁴⁾。このように肝部分切除のときは、最低1cmのマージンをとって切除をすすめることが提唱される。とくにマージンが問題となる部分切除105例で1cm以上のマージンが確保できたのは75%($n=75$)であり⁴⁾、他の切除と比し、十分にマージンを確保するよう術中超音波検査などで確認する必要がある。

VI. 肝予備能別の肝部分切除の意義とエビデンス

日本肝癌研究会の第16回全国調査では、肝切除後の予後に関する因子の一つとして肝障害度があげられている (hazard ratio 1.26, 95% CI 1.17~1.35, $p=0.0001$). そこで今回は、肝障害度(国際的にはChild-Pughスコア)別とし、患者肝障害度を併せたうえで、肝部分切除の意義をEBM的に検証してみる。

1. Child-Pugh AのHCC患者

肝予備能が比較的保たれている患者でのHCCは、もちろん肝切除のよい適応となる。さまざまな理由で種々の術式が選択されるが、この患者群での部分切除(非解剖学的切除)と解剖学的切除のアウトカム比較は以前より報告されている。

1999年Nagasueらは肝硬変のない患者(Child A)で10 cm以下のHCCに対し、拡大切除($n=25$, 2亜区域以上切除)と部分切除($n=33$, 亜区域切除5例も含む)のアウトカムをretrospectiveに比較した。患者生存率、無再発生存率に術式別では有意差を認めていない⁵⁾。この論文のlevel of evidenceは2b(ランダム割付を伴わない過去のコントロールを伴うコホート研究), subtypeは5:対象者数が100人未満, 平均(あるいはメディアン)追跡期間が5年以上, 脱落率10%未満で, recommendationはgrade B(行うようすすめられる)であった。

2002年RegimbeauらはChild-Pugh Aの肝硬変患者で4 cm以下のHCCに対し、治癒切除として最低1 cmのマージンをとった部分切除($n=34$)と解剖学的切除($n=30$)のアウトカムをretrospectiveに比較した。術後1ヵ月のmortality(6% vs 7%)とmorbidity(35% vs 45%)に有意差を認めなかった⁶⁾。5年, 8年患者生存率はそれぞれ(35% vs 54%), (6% vs 45%)と解剖学的切除群で有意に良好であった。また5年, 8年無再発生存率はそれぞれ(26% vs 45%), (0% vs 21%)と解剖学的切除群で有意に良好であった。部分切除群では有意に局所再発が多かった。この論文はlevel of evidenceは2b(ランダム割付を伴わない

過去のコントロールを伴うコホート研究), subtypeは5:対象者数が100人未満, 平均(あるいはメディアン)追跡期間が5年以上, 脱落率10%未満で, recommendationはgrade B(行うようすすめられる)であった。

2004年HasegawaらはChild-Pugh A, B(83%がChild-Pugh A)の単発HCCに対し、解剖学的切除と非解剖学的切除のアウトカムの比較をretrospectiveに行った。5年患者生存率と無再発生存率は解剖学的切除群で有意に良好であった(各66% vs 35%, 34% vs 16%)⁷⁾。多変量解析で解剖学的切除が有意な予後因子であった。この論文はlevel of evidenceは2b, subtypeは2:対象者数が中程度(100人以上200人未満), 平均(あるいはメディアン)追跡期間が5年以上, 脱落率10%未満で, recommendationはgrade Bである。この論文では各群で患者背景に有意差があり, とくにvascular invasion, Child-Pughスコアは多変量解析にて術式よりも強力な予後因子となっている。

2. Child-Pugh B~CのHCC患者

肝予備能別が低下している患者(大部分は肝硬変患者)での肝切除では、前述したように拡大切除は不可能である。1980年代にわれわれは肝硬変患者でのHCCに対する部分切除と通常切除のアウトカムを比較した。小HCCに対する肝切除で, limited 37例 vs major 13例をretrospectiveに比較すると, 患者生存率はそれぞれlimited: majorで1年79.9%:78.7%, 3年60.3%:67.5%, 5年32.6%:22.5%であった(有意差なし)。Mortality rateはlimited: majorで10.8%:15.4%であった。つまり、肝予備能の低下した患者ではそれだけで予後が不良であるため、limited resectionで十分癌治療の意義があると結論づけた。本論文はlevel of evidenceは2b, subtypeは6:対象者数が100人未満, 平均(あるいはメディアン)追跡期間が5年未満, 脱落率10%未満で, recommendationはgrade B(行うようすすめられる)であった。その後は、肝予備能検査の進歩とともに低肝予備能患者では外科切除が可能であるなら、自ずと肝部分切除が選択されており、ran-

domized studyはありえない。また、ヨーロッパ(たとえばオランダ)などでは肝硬変の患者のHCCは切除の適応とはならない。最近、まず肝切除を行いその後再発した時点で肝移植を行う2期的な肝移植(salvage liver transplantation)の意義が取り沙汰されている⁸⁾。肝機能のよい患者には切除は通常の解剖学的切除でよいと考えられるが、肝予備能の低下している患者には、もし外科治療が可能であるなら部分切除で対応し、再発があった時点や、もしくは肝不全が進行した場合には肝移植を考慮するといった流れも考えられる。

VII. 他の治療法との比較

日本肝癌研究会の第16回全国調査をみると、肝障害度(liver damage: LD)別の外科切除後5年生存率はLD-Aで52.5% ($n=15,718$), LD-Bで41.2% ($n=6,884$), LD-Cで33.3% ($n=713$)であり、LD-Cの症例にはほとんど部分切除が施行されていると推測される。そこでLD-Cの症例において他の治療と部分切除を比較すると、local ablation therapyでの5年生存率が22.5% ($n=1,665$), 肝動脈塞栓療法(TAE)での5年生存率が7.6% ($n=2,500$)であることから、LD-Cなどの肝予備能不良例においても肝部分切除を施行することにより、予後が十分に改善されることが明らかとなった。

おわりに

高度の肝硬変を伴うHCCに対する低侵襲術式としての部分切除術について概説した。肝硬変が高度なために肝予備能が低下し、肝癌を解剖学的切除に耐術できない症例、または肝縁や肝表面に存在する被膜を伴う小肝癌などが適応と考えられる。部分切除を施行するさいには、腫瘍とのマ-

ージンを確保するように努め、局所再発を可及的防止することが重要である。

◆ ◆ ◆ 文献 ◆ ◆ ◆

- 1) Kanematsu T, Takenaka K, Matsumata T et al: Limited hepatic resection effective for selected cirrhotic patients with primary liver cancer. *Ann Surg* 199; 51-56, 1984
- 2) Ikai I, Arii S, Kojiro M et al: Reevaluation of prognostic factors for survival after liver resection in patients with hepatocellular carcinoma in a Japanese nationwide survey. *Cancer* 101: 796-802, 2004
- 3) Makuuchi M, Kosuge T, Takayama T et al: Surgery for small liver cancers. *Semin Surg Oncol* 9: 298-304, 1993
- 4) Takano S, Oishi S, Kono S et al: Retrospective analysis of type of hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 87: 65-70, 2000
- 5) Nagasue N, Yamanoi A, el-Assal ON et al: Major compared with limited hepatic resection for hepatocellular carcinoma without underlying cirrhosis; a retrospective analysis. *Eur J Surg* 165: 638-646, 1999
- 6) Regimbeau JM, Kianmanesh R, Farges O et al: Extent of liver resection influences the outcome in patients with cirrhosis and small hepatocellular carcinoma. *Surgery* 131: 311-317, 2002
- 7) Hasegawa K, Kokudo N, Imamura H et al: Prognostic impact of anatomic resection for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 242: 252-259, 2005
- 8) Poon RT, Fan ST: Is primary resection and salvage transplantation for hepatocellular carcinoma a reasonable strategy? *Ann Surg* 240: 925-928, 2004

*

*

*

多発性進行肝細胞癌に対する手術戦略

江口 晋* 兼松 隆之*²

はじめに

肝細胞癌 (HCC) が多発した場合の外科治療は適応が狭く、とくにウイルス性肝硬変などにより肝機能障害を併存する場合は、拡大切除は困難である。もちろん肝予備能が良好な場合は拡大切除で治癒切除が可能であり、また減量手術の有用性も報告されている¹⁾²⁾。また、破裂出血の制御のために外科切除が選択されることもある。そこで本稿では、肝予備能、腫瘍局在別に高度進行多発 HCC に対する外科治療手技について概説する。

I. 多発性進行肝細胞癌の定義

原発性肝臓取扱い規約第4版ではT因子の分類として、①大きさ：2 cm, ②個数：単発か否か, ③脈管侵襲, 漿膜浸潤の有無が挙げられており、多発性進行肝細胞癌の定義としては、大きさ2 cm以上のHCCが片葉もしくは両葉に多発しているもの (T2以上) と考えられる。しかし、本特集のテーマである高度進行肝臓を考えた場合、T4 (上の3つすべてがあてはまるもの) の症例を指すのではないだろうか。

* Susumu EGUCHI 長崎大学移植・消化器外科

*² Takayuki KANEMATSU 同外科 教授

key words : 多発進行肝臓, 肝切除, 肝移植

そこで本稿では、この定義 (T4) に従った多発性進行 HCC に対する外科治療について述べる。

日本肝臓学会の第16回全国追跡調査では、切除例の12.1% (n=2,988) が3個以上の多発例であり (大きさは限定せず), その5年生存率は30.9%と2個以内のHCCに比べて不良である。さらに、肉眼的肝内高度進行 T4 Stage IVA HCC の治癒切除後1, 3, 5年生存率は62.1, 34.7, 24.4%と不良である³⁾。

実際にはT4であるといえども、多発性進行HCCに対する外科治療は背景肝の肝機能、片葉多発か両葉多発かで手術適応、術式が規定される⁴⁾。外科治療としては肝切除 (拡大切除, 部分切除), 焼灼術 (RFA, MCT), 肝移植などが考えられ、上述した因子で、選択もしくは組み合わせることで治療を行うことになる。

II. 肝予備能が良好な場合

1. 片葉多発進行肝臓

HCCが多発であっても片葉に局在し、肝予備能が保たれている場合はもちろん拡大肝切除で治癒切除が可能となりうる。

2. 両葉多発進行肝臓

進行HCCが両葉に多発しているが、肝予備能が保たれている場合には数カ所の切除や切除とRFAなどとの組み合わせで治療可能となる。



図 1 両葉多発進行肝癌，46 歳，B 型肝炎陽性。S3 HCC の破裂で来院。S6, 7 にも下大静脈内進展 HCC を認めた。

切除には複数の解剖学的切除や複数の部分切除が考慮される。もしくは main tumor のみを減量切除し，残りを TAE などで制御する方法もある¹⁾。図1では B 型肝炎陽性の 46 歳，男性で，外側区域の破裂 HCC と右後区域の下大静脈内腫瘍栓を伴う HCC を合併している。アシアロ肝シンチの LHL15 も 0.91 と肝予備能が良好であったため，左右の解剖学的切除を施行した。まず，定型的左外側区域切除を施行したのち，右後区域切除 + 下大静脈内腫瘍栓摘出術を行った (図 2a~d)。

III. 肝予備能が不良の場合

1. 片葉多発進行肝癌

肝予備能が不良なため区域切除や葉切除など

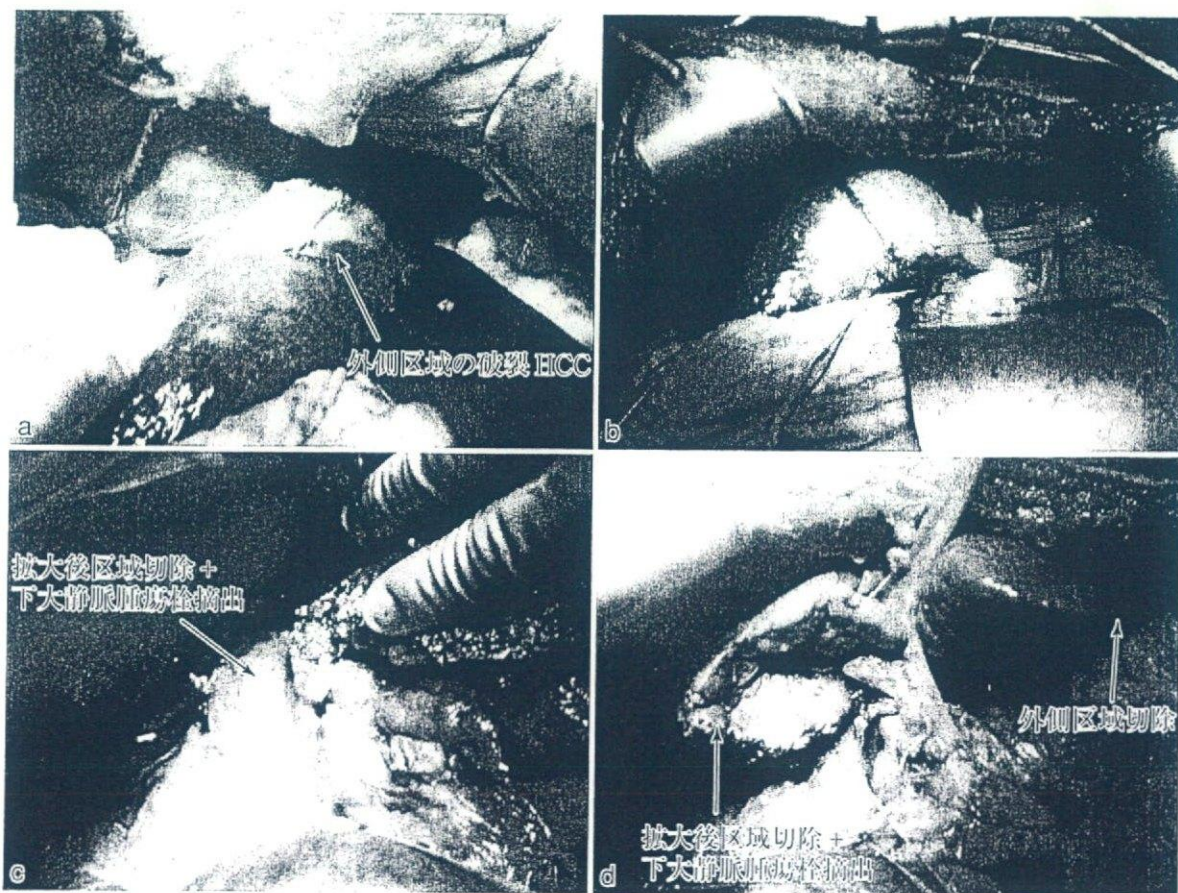


図 2

- a) S3 に破裂 HCC を認めた。 b) 定型的な外側区域切除
- c) d) S6, 7 の IVC 内進展 HCC に対して，拡大後区域切除 + 下大静脈内腫瘍栓摘出術を施行

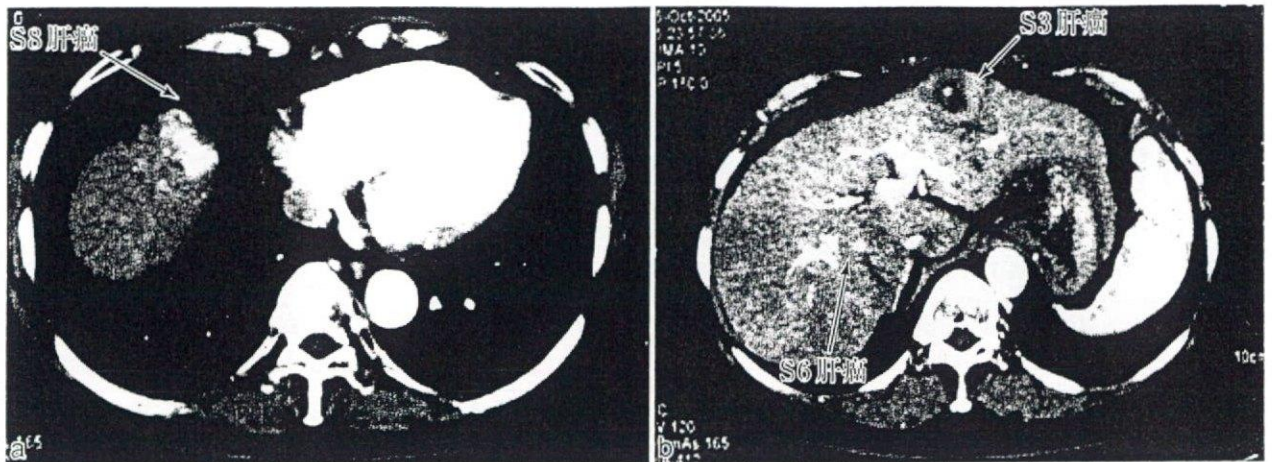


図3 C型肝硬変に発生した両葉多発HCC症例。S3 HCCは vascularity 低く TAE 不可

の解剖学的切除が不可能な場合、HCCの制御のため、limited resection（部分切除やenucleation）を数カ所、もしくはlimited resectionとRFAなどの局所療法との組み合わせを行うことがある⁵⁾。また、ミラノ基準内（3個以内、最大径3 cm以内）なら肝移植も保険診療内で施行可能であり、再発率も5年で15%以下と良好な成績が期待できる⁶⁾。

手術手技：

Glisson一括処理でプラスチックテープを掛け、ターニケットを締めることにより、いつでも片葉、区域の阻血を可能とする。ただし、将来、肝移植（salvage liver transplantation）を考慮しているならば、肝門部はnon-touchとすることもある⁷⁾。その後、最小限肝授動を行い術中エコーで病変部位を同定後、limited resection（部分切除やenucleation）をdissecting sealerを用いたり、また切離線をマイクロウェーブで焼灼したのちにCUSAを用いて行う。さらには、開腹RFA、MCTを併用することで、多発腫瘍の制御を行うこともある。

2. 両葉多発進行肝癌

a) 肝切除

肝予備能が不良な場合、HCC両葉多発の場合、基本的には外科治療の適応になることは少なく、TAEを第一選択治療としている。しか

し、肝表面にある腫瘍の破裂出血の制御や、TAEなどの治療で制御不可の病変が存在する場合、肝予備能に応じて肝部分切除や局所療法（RFAなど）を行うこともある。

手術手技：

図3は62歳、女性、C型肝硬変でフォロー中、両葉多発HCCを指摘された。TAE治療が行われたが、外側区域のHCCは vascularity が低く、TAEで制御不能であった。そこで、肝外側区域部分切除と開腹RFAを施行した（図4a～d）。肝門部にはできるかぎり手を付けたくないが、必要ならGlisson一括処理でプラスチックテープを掛け、ターニケットを締めることにより、いつでも片葉、区域の阻血を可能とする。その後、enucleationのような形でdissecting sealerを用いたり、または切離線をMTC焼灼したあとにCUSAを用い部分切除を行う。さらには開腹RFAを併用することで、腫瘍の制御を行うこともある。

b) 肝移植

一般的には、肝予備能が不良（肝硬変）の両葉多発進行肝癌に対しては、外科治療の適応と考えられる。肝臓移植に関しては、前述のように、ミラノ基準内（3個以内、最大径3 cm以内）なら保険診療内で施行可能であり、再発率も低い。しかし、ミラノ基準外であれば保険適応はなく、医学的にも再発率が高く絶対移植適

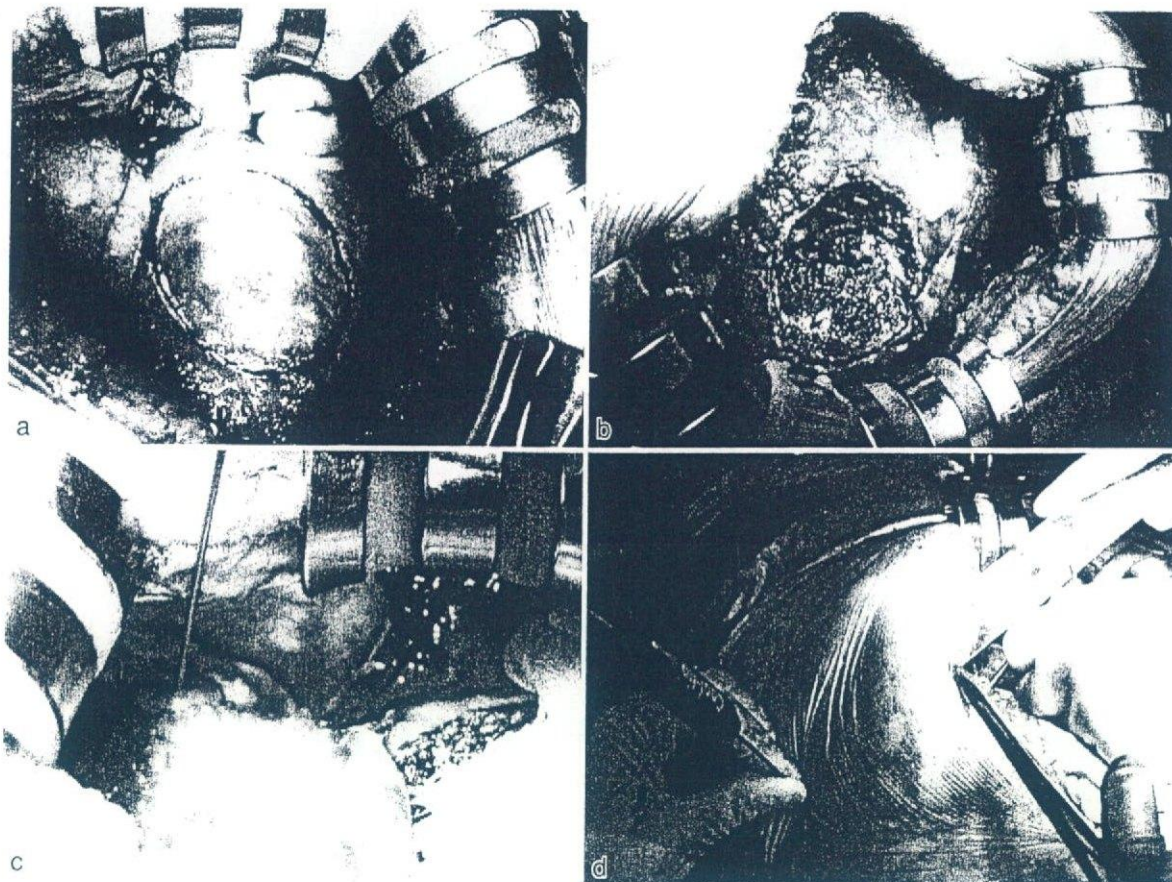


図 4

a) 外側区域の HCC に対し部分切除 b) dissecting sealer を用い、マージンを確保し、肝部分切除を施行
c) S8 の HCC に対し直視下 RFA d) S6 の HCC に対し経皮 RFA

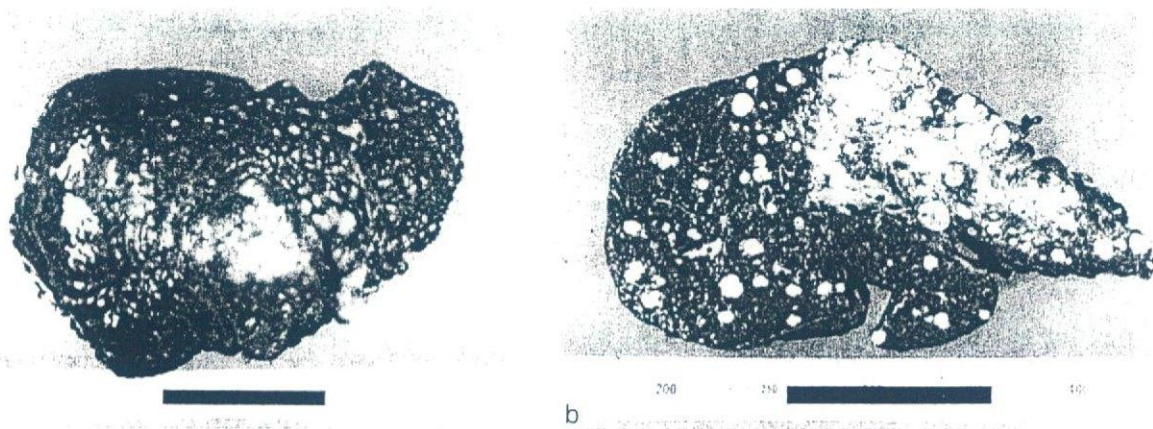


図 5

a) 摘出全肝標本
b) 全肝断面の肉眼像。両葉多発肝癌を認める。

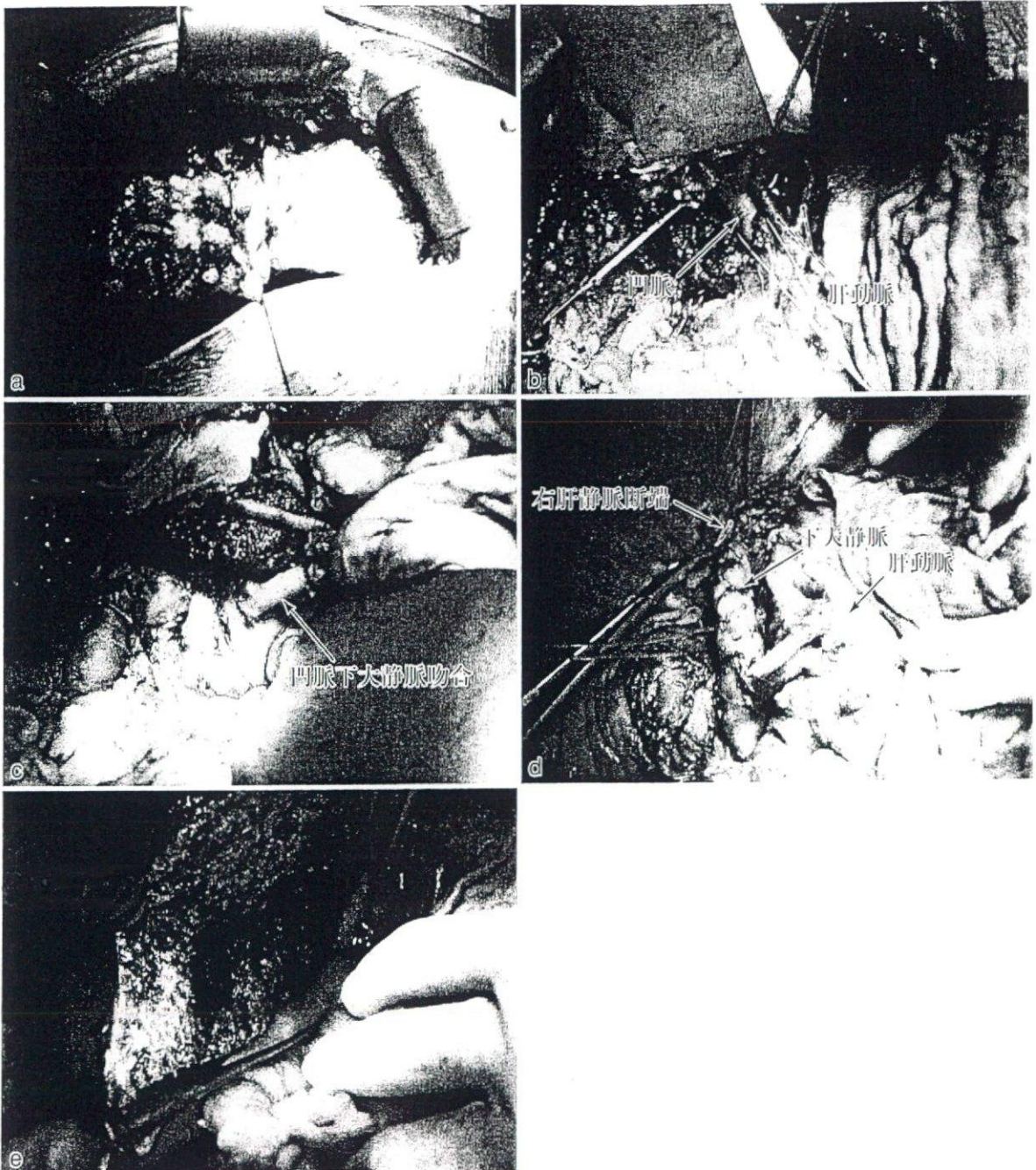


図 6
a) 両葉多発進行 HCC ミラノ基準外 b) 肝門操作先行 c) 門脈下大静脈吻合
d) 無肝期。右肝静脈は部分クランプしている。 e) 右肝グラフトを用いた implantation を施行

応からは外れると考えられる。しかし、遠隔転移、HCC の大血管への浸潤がない患者で、ほかに治療法がまったくありえない場合、またドナーの自発的な意思がある場合、生体肝移植の絶対非適応とはいいいにくく、なかには長期生存

可能な症例も存在する⁸⁾。そのような場合は、本邦では自費診療とはなるが、肝移植のみが唯一可能性のある治療となりうる。

手術手技：

本症例は 57 歳男性，S4 を主体とした高度進

行多発HCCである(摘出標本:図5)。術前画像により遠隔転移, HCCの大血管浸潤がないことを,十分に確認する。

(1) ドナー搬入前にレシピエントを開腹し, 腹水, 腹腔内洗浄液などを細胞診断に提出し, 腹膜播種のないことを確認する。また, 肝門部リンパ節を迅速病理診断に提出し, 陰性であることを確認する。この時点でドナーを搬入し, 生体肝移植を開始する。また, この時期に当科では抗癌薬の静注を行っている(図6a)。

(2) HCCの脱転操作による播種を避けるために, 肝の脱転に先立ち, 肝門部操作を行う(図6b)。我々は胆管, 動脈を切離し, Kocherの授動を行い, 門脈・下大静脈吻合を作製し, 脱転前に肝腫瘍へのinflowの完全遮断を先行している(図6c)。

(3) 次に, 肝授動を行い, 肝全摘出に備える。この際, 静脈バイパスを用い, TVEを行い, 肝授動に伴う腫瘍の播種を防止するのの一法である(図6d)。

(4) 肝を全摘し, グラフト搬入後, implantationを開始する(図6e)。

おわりに

以上, 肝予備能と腫瘍の局在別に, 高度進行HCCに対する手術手技を概説した。本稿に示したように, 患者の肝予備能に応じ, 各種手術手技を用い, 患者治療を行うことで, 高度進行多発HCCに対する予後の改善, または破裂出血などの制御によるQOLの改善を行うことが

可能となると考えられた。

文 献

- 1) Inoue K et al: Volume reduction surgery for advanced hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 130: 362-366, 2004
- 2) Liu CL et al: Hepatic resection for bilobar hepatocellular carcinoma: is it justified? *Arch Surg* 138: 100-104, 2003
- 3) Ikai I et al: Report of the 16th follow-up survey of primary liver cancer. *Hepatol Res.* 2005 Jul 14 (e-pub ahead of print)
- 4) Poon RT et al: Prognosis after hepatic resection for stage IVA hepatocellular carcinoma: a need for reclassification. *Ann Surg* 237: 376-383, 2003
- 5) Kanematsu T et al: Limited hepatic resection effective for selected cirrhotic patients with primary liver cancer. *Ann Surg* 199: 51-56, 1984
- 6) Mazzaferro V et al: Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334: 693-699, 1996
- 7) Poon RT et al: Is primary resection and salvage transplantation for hepatocellular carcinoma a reasonable strategy? *Ann Surg* 240: 925-958, 2004
- 8) Todo S et al: Japanese Study Group on Organ Transplantation. Living donor liver transplantation for adult patients with hepatocellular carcinoma: experience in Japan. *Ann Surg* 240: 451-459, 2004

肝原発悪性腫瘍の手術

江口 晋* 兼松 隆之**

はじめに

肝原発悪性腫瘍（肝癌）に対する外科治療の時代変遷について概説する。1970年代までは、肝硬変に合併した肝癌に対しては肝切除は適応とされなかった。しかし、手術手技の向上、関連機械の進歩、肝予備能評価の向上などにより、次第に肝切除が切除の対象となり、縮小切除、亜区域切除などが施行されるようになった。これらはすべて本邦発であり、肝臓切除手技は本邦の外科により世界が引っ張られていったといっても過言ではない。本稿ではここ 30 年の肝癌に対する肝切除（肝移植も含めて）の変化を示し、日本の肝臓外科医の功績を明らかにする。

I. 約 30 年前

1970年代は肝癌に対する肝切除は、葉切除などの解剖学的切除のみが治療として論じられていた。すなわち、硬変肝に発生した肝癌はそれだけで切除の適応とは考えられていなかった。当時の肝臓外科の教科書にも、図 1 に示すように“Resection should not be done for tu-

* Susumu EGUCHI 長崎大学移植・消化器外科

** Takashi KANEMATSU 同外科 教授

key words : 肝細胞癌, 外科切除

mors occurring in cirrhotic livers unless it is necessary to control hemorrhage”と述べてある¹⁾。実際、1970年代は肝切除後の肝不全発生率は約 10% を超えていた。

そのような時代背景のなかで、とくに正常肝を切除する際に使用する実質クランプが開発された。その代表的なものは台湾の林教授が開発した林クランプ、Longmire のクランプなどであり、それらを図 2 で示す²⁾。

肝実質の切離にはおもに破砕法、つまり finger fracture 法や Péan fracture 法が用いられていた。

また、この時代には現実的には腫瘍の摘出がメインの debulking 手術であることも多かった。それらの切除例における肉眼、病理学的検索の結果、肝細胞癌は門脈浸潤が多いこと、肝内転移や肝内多発が多いことなどが明らかになってきた。それらの知見をもとに 1980 年代の本邦において肝臓外科医が新しい術式、それらを用いた手術適応の拡大、とくに硬変肝においても根治手術の確立の時代へ移った。

II. 約 20 年前

1980年代に入り、さまざまな手術器具、および医療機器の肝臓外科への導入が始まった。それにより今までは外科手術の適応と考えられていなかった硬変肝に発生した HCC の手術が本邦の外科医により果敢に試みられるように

FOSTER AND BERMAN

SOLID LIVER TUMORS

PRIMARY EPITHELIAL CANCER IN ADULTS

101

When primary epithelial carcinoma is found in a noncirrhotic liver and when no evidence of spread beyond liver capsule is evident, it should be resected if tumor anatomy allows. Neither the size of the tumor, the presence of multiple nodules (if confined to one lobe), nor the histologic type or grade should influence the decision. Diaphragmatic invasion or peritoneal rupture does not exclude the possibility of cure, and patient age and sex have no correlation with immediate or prolonged survival. Resection should not be done for tumors occurring in cirrhotic livers unless it is necessary to control hemorrhage.

Volume XXII in the Series
MAJOR PROBLEMS IN
CLINICAL SURGERY

図 1 1977 に刊行された Foster と Berman による SOLID LIVER TUMOR 内の一節である。肝硬変に発生した肝癌は破裂出血以外は切除の対象ではなかった。

T Y Lin's Hepatic resection inst

肝臓切除鉗子 右 41cm
Hepatic clamp right

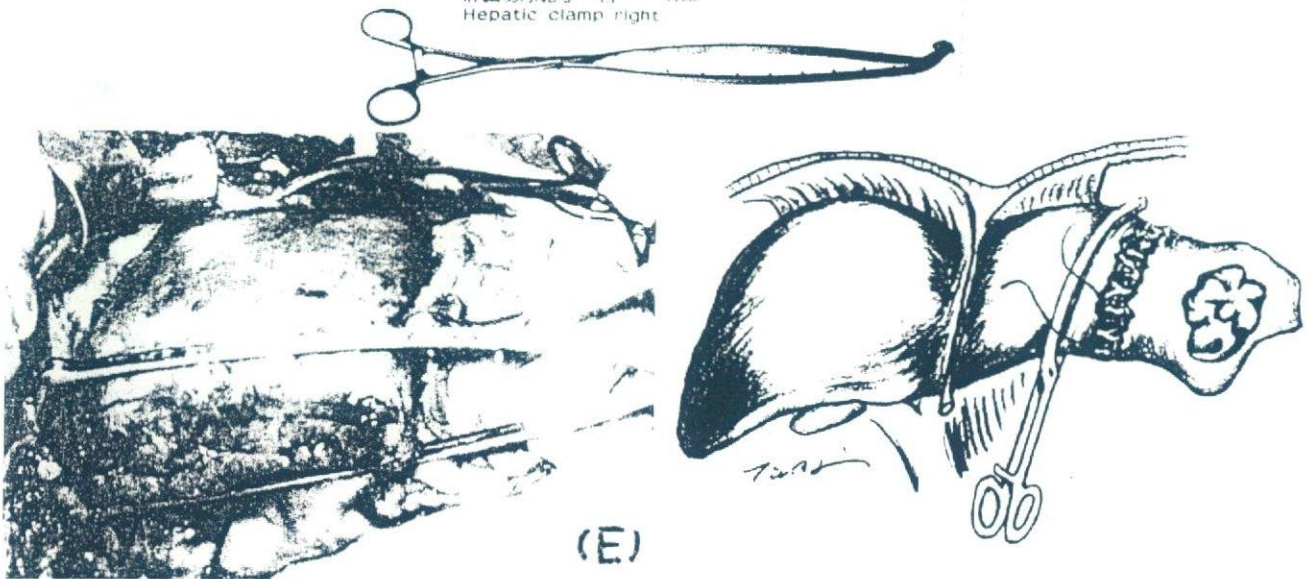


図 2 台湾の林より開発されたクランプである。おもに正常肝の切除の際に出血量を減少，手術時間短縮のために実質を一括して挟み，圧坐クランプで実質切離を行う。〔文献 2〕より転載〕

なった。とくに超音波装置（エコー）の発達により，それまでの肝の大きな区域の概念より，いわゆるクイノーの亜区域がはっきり認識できるようになった。

幕内らはこの超音波検査を肝臓外科，とくに術中に導入し（術中エコー），リアルタイムで腫瘍および周囲の脈管を評価する試みを開始した³⁾。それにより系統的亜区域切除など，縮小

かつ解剖学的切除などの新しい術式が可能となり，前に示したように HCC の経門脈的腫瘍進展を加味した治癒切除を施行できるようになった⁴⁾。図 3 に当科での最近の系統的亜区域切除の術中写真を示す。

同時期に筆者らは retrospective な検討で，硬変肝内に発生した肝癌では，拡大切除せずとも縮小手術（limited resection）で十分に予後

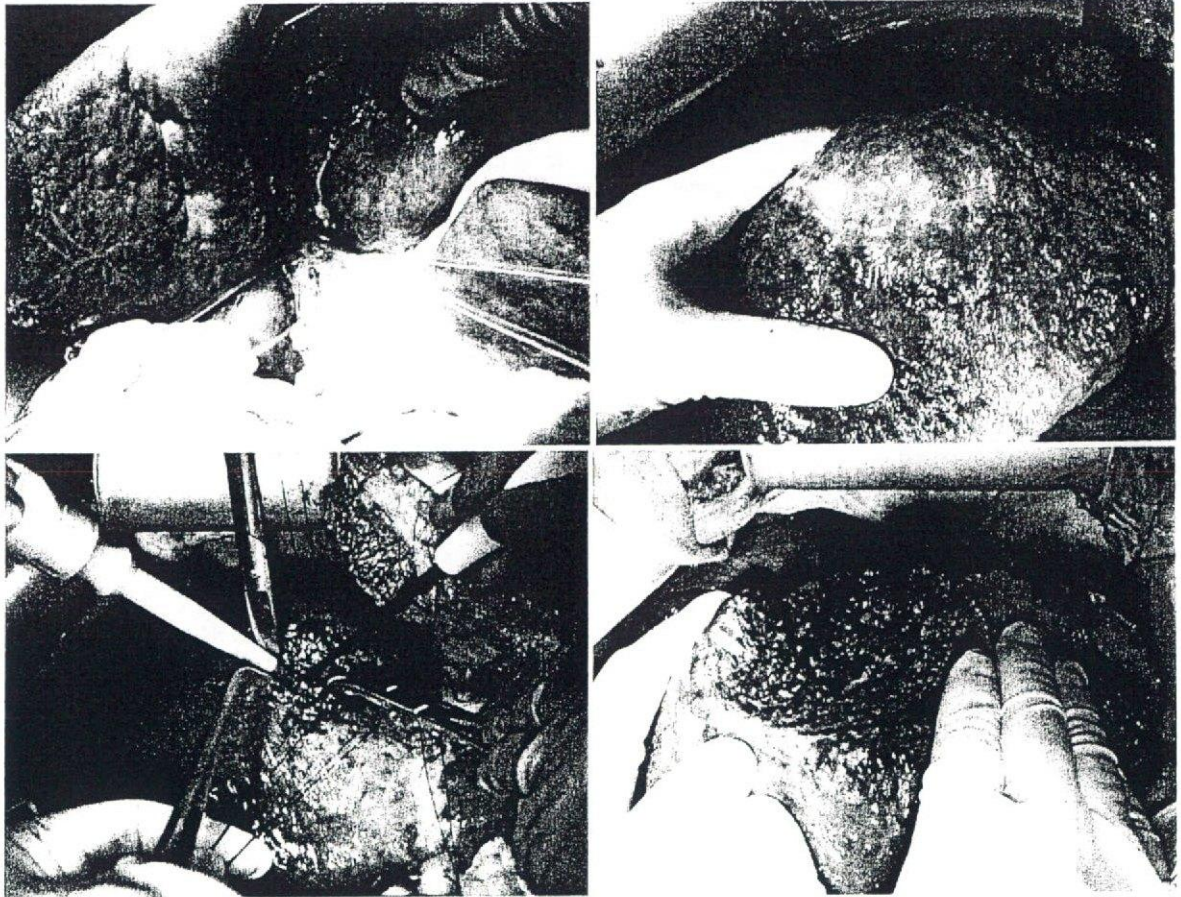
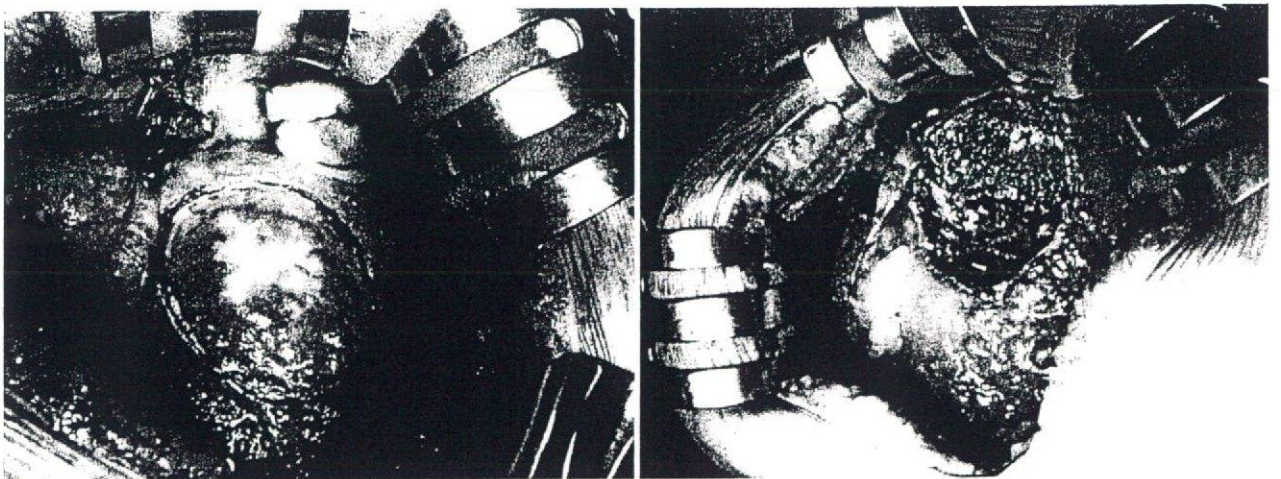


図 3 系統的亜区域切除

術中エコーを用い、色素注入法で肝亜区域を同定し、責任 Glisson を処理する。



a) 外側区域の HCC に対し部分切除

b) 外側区域の HCC に対し部分切除

図 4 硬変肝患者の肝癌に対する limited resection

肝予備能が低下している患者に対して腫瘍の摘出を目的とした術式

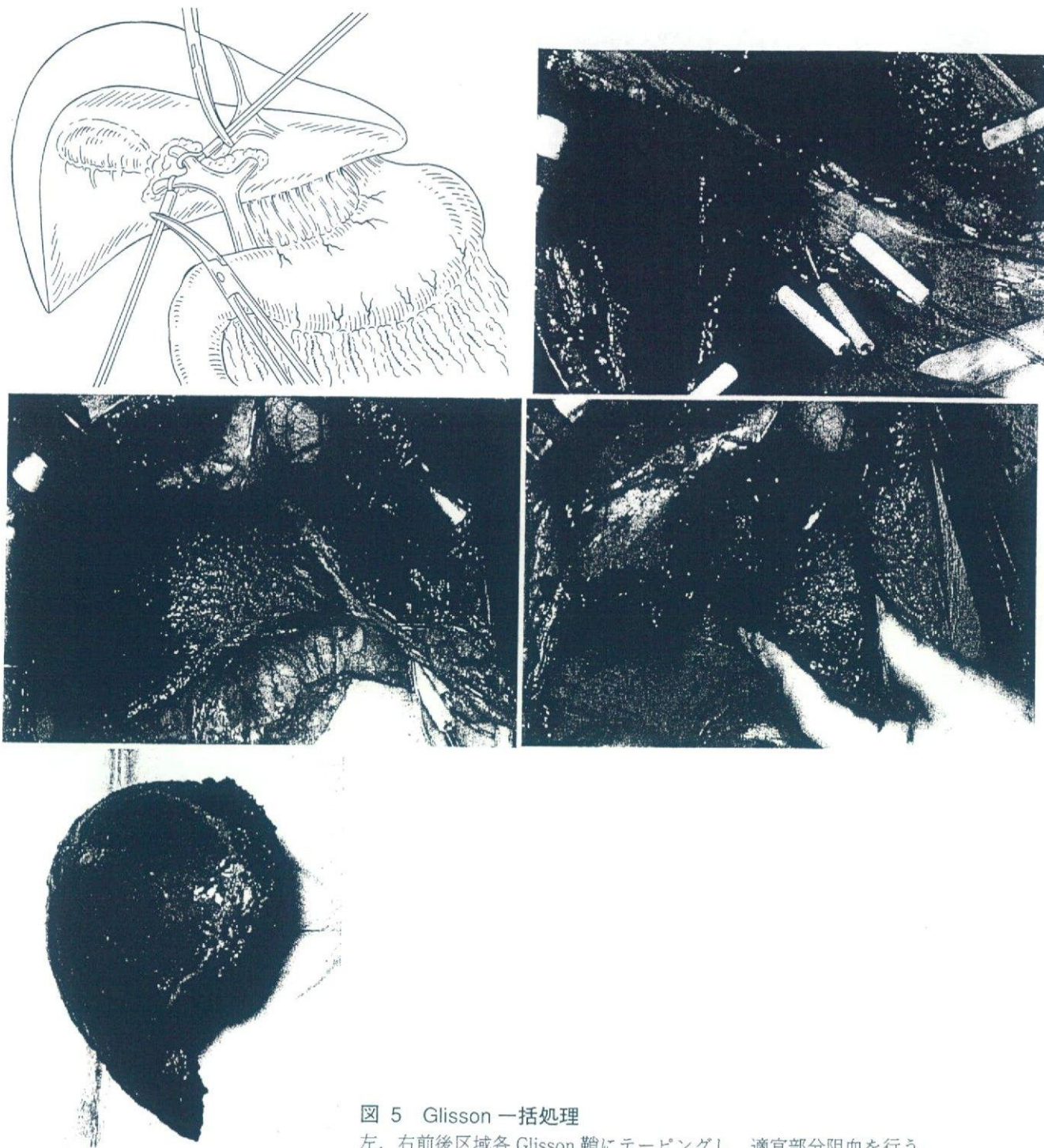
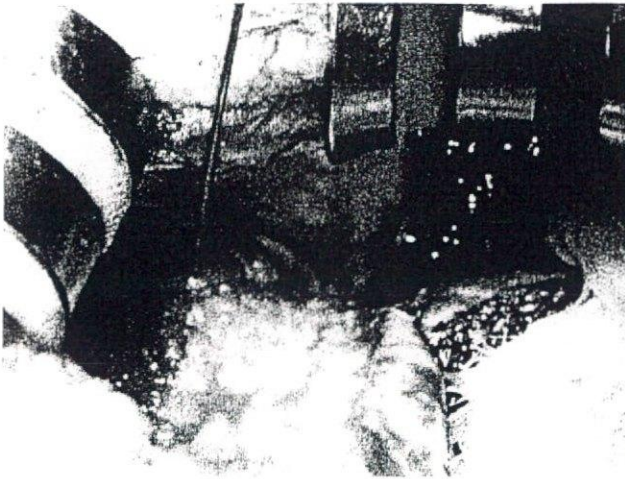


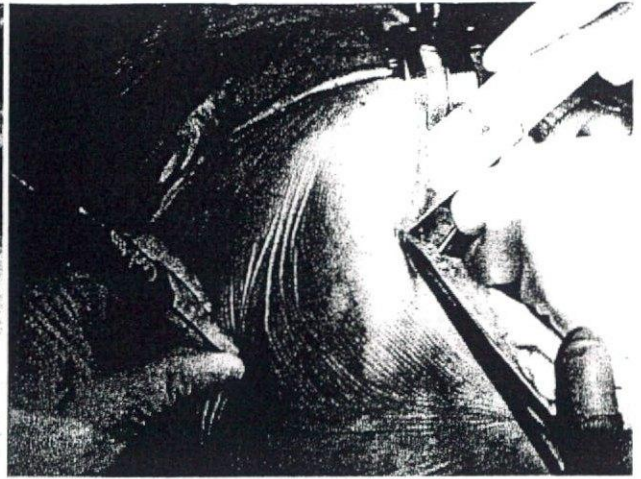
図 5 Glisson 一括処理
左、右前後区域各 Glisson 韌にテーピングし、適宜部分阻血を行う。

を改善させることができることを示した⁹⁾。つまり高度肝障害 (Child-Pugh B-C, 肝傷害度 B-C) を有する肝硬変合併肝癌に対しては、悪性腫瘍に対する従来の外科治療原則とは別の立場で、腫瘍のみを摘出し、非癌部肝組織をできるかぎり温存する術式—縮小手術, limited

resection が容認されるのではないかと考えたのである。ここでいう縮小手術とは、腫瘍の核出に主眼をおいたもので、肝硬変併存肝癌に対する外科治療概念であり、最低 1 cm のマージンを確保した肝部分切除が一般的である。その実際を図 4 に示す。



S8 の HCC に対し直視下 RFA



S6 の HCC に対し術中経皮 RFA

図 6 硬変肝患者の肝癌に対する balanced surgery limited resection+術中 RFA

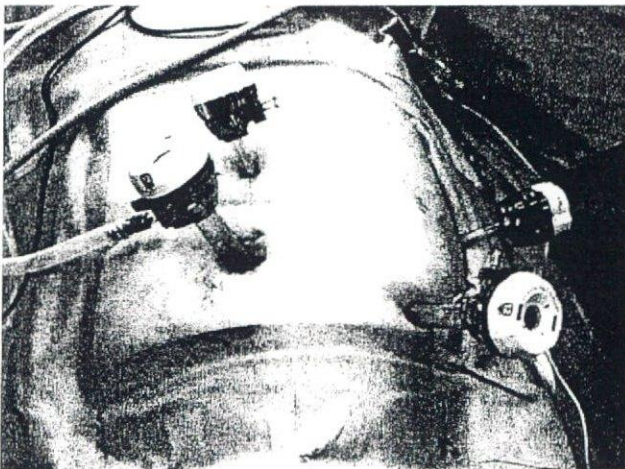
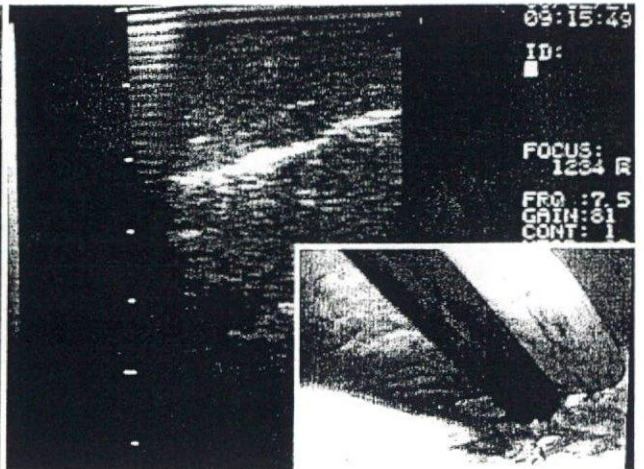


図 7 腹腔鏡下肝切除術

鏡視下用エコープローブを用い、病変を同定する。



III. 約 10 年前

1990年代にはCUSA, microwaveなどの手術器具が開発され、手術手技がさらに簡略化し、出血量が減少し、安全に肝切除が可能となった。また、エコーなどの診断器具もさらに高性能となり、血流を評価できるエコードプラ機能も併設され、リアルタイムに肝の血行動態、腫瘍の血行動態の評価が可能となり、さらに選択的切除が可能となった。高山らの尾状葉単独切

除などの特殊な術式が報告されたのもこの時期である⁶⁾。

また、高崎らは肝門部 Glisson を大きく3つに分ける概念を発表し、肝門部の Glisson 一括処理を提唱し、肝門部個別処理に伴う煩雑さ、危険性を減じることに成功した⁷⁾(図5に当科での Glisson 一括処理による systematized hepatectomy を示す)。

1990年代は肝細胞癌に対する Ablation の方法、器械も発達し、局所療法、焼灼療法も発展してきた。まずはエタノールで腫瘍を凝固壊死

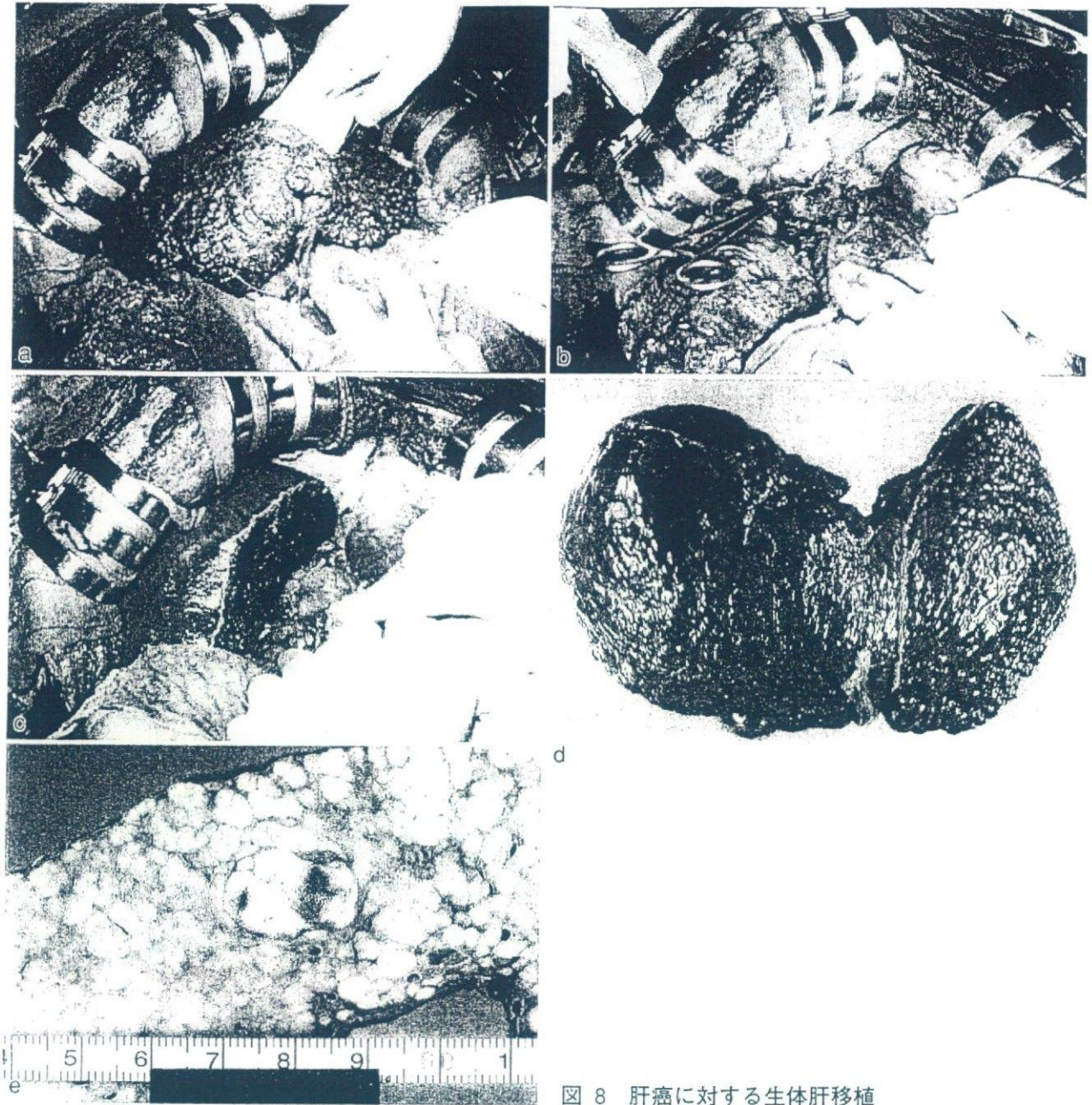


図 8 肝癌に対する生体肝移植

させる PEIT さらには microwave coagulation therapy (MCT), その後 radiofrequency ablation therapy (RFA) が登場した。これらの器械, 手技を腹腔鏡下, 直視下に行うことにより, 小肝癌ならば切除と同様な根治性を持ち, 低侵襲な手技が可能となった。また, RFA や MCT を併用することにより肝切除を安全に施行すること, いわゆる balanced surgery も可能となった (図 6)。

IV. 現 在

21 世紀に入り, 肝切除の適応, 手技は確立し, 手術死亡率, 合併症率も減少し, また, エビデンスに基づいた肝癌治療のためのガイドラインも 2005 年に刊行され, 普遍的なものになった感がある。

さらに, 内視鏡外科も他領域から開始され,

最終的には肝切除も腹腔鏡下に試みられるようになった。また、鏡下用のエコープローブなども開発され、肝表面の腫瘍に対する部分切除やS3, 6などに突出する腫瘍が腹腔鏡肝切除術のよい適応となる(図7)。

最近では、肝癌の手術として生体肝移植も保険適応(脳死肝移植も2006年に保険適応となる予定)となり、さらなる根治術が施行可能となった。現在では再発の少ないグループ、つまりミラノクライテリア内(単発5cm以内、多発3個まで、最大径3cm以内)のみが肝移植の保険適応となっている。このグループの患者であるならば、5年生存率が約70%と切除で問題になる肝内再発の問題が回避でき、本当の意味での根治術となりうる。本邦では依然、脳死ドナーは少なく、生体ドナー肝の右葉、左葉を用いた部分肝移植が大多数である。図8では生体肝移植の手術写真を示す。

一方で新たな手術器具(dissecting sealer)なども続々開発され、手術のmorbidity, mortalityも以前と比べると断然低下した。しかも、最近では術前のCT, MRIによる3D構築により腫瘍と脈管の関係が客観的に評価でき、手術計画の立案が容易となった。

おわりに

肝原発悪性腫瘍(肝癌)に対する外科治療の時代変遷について概説した。以前は肝硬変に発生した肝癌の手術適応はないとされていたが、各種手術機器の進歩、手術技術の発展などによ

り侵襲を減じた肝切除が可能となってきた。それ以上に、肝臓外科黎明期に障害肝に発生した肝癌に対して、さまざまな工夫を凝らして果敢に切除の可能性を模索した肝臓外科医の先輩方に敬意を表したい。

文 献

- 1) Foster JH et al: SOLID LIVER TUMORS. Major Probl Clin Surg 22: 1-342, 1977
- 2) Lin TY: Results in 107 hepatic lobectomies with a preliminary report on the use of a clamp to reduce blood loss. Ann Surg 177: 413-421, 1973
- 3) Makuuchi M et al: Intraoperative ultrasonic examination for hepatectomy. Ultrasound Med Biol 2: 493-497, 1983
- 4) Makuuchi M et al: Ultrasonically guided subsegmentectomy. Surg Gynecol Obstet 161: 346-50, 1985
- 5) Kanematsu T et al: Limited hepatic resection effective for selected cirrhotic patients with primary liver cancer. Ann Surg 199: 51-56, 1984
- 6) Takayama T et al: Segmental liver resections, present and future-caudate lobe resection for liver tumors. Hepatogastroenterology 45: 20-23, 1998
- 7) Takasaki T et al: Highly anatomically systematized hepatic resection with Glissonean sheath code transection at the hepatic hilus. Int Surg 75: 73-77, 1990