

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（肝炎克服緊急対策研究事業）
肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発
分担研究報告書

研究分担者 松井 修
金沢大学 医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：肝細胞癌の早期診断における各種画像診断法の診断能を比較検討し、早期診断アルゴリズムの確立を目的として研究を行った。本年度はとくに Gd-EOB-DTPA 造影 MRI による肝癌の診断能と肝癌多段階発癌における造影メカニズムについての検討を行い以下の予備的な結果を得た。EOB 造影 MRI は乏血性の早期肝細胞癌あるいは境界病変・前癌病変の検出に極めて優れている。一方、多血性肝細胞癌（古典的肝細胞癌）の検出には肝動脈造影下 CT(CTHA)には劣るものの、一般的な CT や MRI や超音波診断に比べて精度は高い。また、EOB を肝細胞に取り込み排泄するトランスポーターは肝癌の多段階的発癌にともなって変化し、EOB の肝癌における集積の程度は肝癌の悪性度診断に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスによる肝癌の発生は近年増加し、特に過去の種々の医療行為による感染者からの発生が緊急の問題となっている。こうした肝炎に対する緊急克服事業の一環として、肝癌の早期発見システムの開発・普遍化は重要である。画像診断の立場から、早期の肝癌に診断をいかに有効に効率的に行うかを目的として、特に新しい MRI の肝細胞・胆道系造影剤である Gd-EOB-DTPA の有用性を他の診断法と比較検討する。

B. 研究方法

2008 年 4 月から 9 月の間に肝細胞

癌診断目的で動注 CT と EOB 造影 MRI を施行した慢性肝疾患 87 症例。動注 CT で「多血性 foci を内包する乏血性結節」と診断された 41 結節を対象に EOB 肝細胞造影相画像（造影後 20 分 T1 強調画像）における画像所見（背景肝と比較した結節の非多血部の信号強度）を検討した。

2008 年 4 月から 9 月までに動注 CT と EOB・プリモビスト造影 MRI を施行した慢性肝疾患 99 症例のうち、動注 CT で「多血性肝細胞癌と診断された 2cm 以下の結節」（1 症例あたり 20 結節以上あるものは除外）を有した 59 症例（160 結節）が対象として、Gd-DTPA 造影 MRI による検出能を検討した。

EOB のラット肝細胞への取り込み

と制御するトランスポーターoatp1と排泄系トランスポーターmrp2が実験的に誘発された肝癌および前癌病変でどのように変化するかをreverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)で実験的に検討した。

C. 研究結果

EOB造影MRI肝細胞造影相画像における多血巣を内包する乏血性結節の非多血部分は約80%は低信号に描出された。残り約20%では周辺肝と等～高信号であった。

EOB造影MRI肝細胞造影相画像における2cm以下の古典的肝細胞癌の検出能は良好であり、特に1cm以上のものでは90%が検出された。1cm以下では約40%が検出されなかった。

Oatp1は肝細胞性結節の悪性度が良性の過形成性結節から高分化肝癌・中分化肝癌と上昇するにつれて減少し、一方、mrp2は過形成性結節で周辺肝に比べ増加し、その後悪性度上昇にしたがって減少した。

D. 考察

Gd-EOB-DTPA造影MRIは乏血性の早期肝細胞癌あるいは多血性肝癌発生の母地となる高リスクな境界病変の検出に従来の方法に比べ極めて優れている。約80%のこうした病変が早期に検出できる可能性がある。多血性の古典的肝癌の検出にも他の非侵襲的診断法にくらべ優れているが、1c

m以下では約40%（動注CTで検出可能なもののうち）が検出できない可能性があり、その原因として肝機能障害による造影不良などが考えられた。EOBへの肝細胞におけるトランスポーターの検索から、EOB造影MRI所見が肝癌の多段階発癌に伴って多段階的に変化することが示唆され、肝癌・前癌病変の質的診断や臨床的対応の決定に有用であることが示唆された。

E. 結論

EOB造影MRIは乏血性の早期肝細胞癌あるいは境界病変・前癌病変の検出に極めてすぐれている。一方、多血性肝細胞癌（古典的肝細胞癌）の検出には肝動脈造影下CT(CTHA)には劣るものの、一般的なCTやMRIや超音波診断に比べて精度は高い。また、EOBを肝細胞に取り込み排泄するトランスポーターは肝癌の多段階的発癌にもなって変化し、EOBの肝癌における集積の程度は肝癌の悪性度診断に有用であることが示唆された。なをこれらの研究は継続中であり、また投稿中である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui O, Gabata T, Kobayashi S. Optimal imaging of hepatic mass lesions.

- J Gastroenterol Hepatol, 2008;23:1466-1468.
- 2) Miyayama S, Yamashiro M, Okuda M, Yoshie Y, Sugimori N, Igarashi S, Nakashima Y, Matsui O. Usefulness of Cone-Beam Computed Tomography During Ultraslective TranscatheterArterial Chemoembolization for Small Hepatocellular Carcinomas that Cannot be Demonstrated on Angiography. Cardiovasc Intervent Radiol, 2008 Dec 9. [Epub ahead of print]
- 3) Miyayama S, Mitsui T, Zen Y, Sudo Y, Yamashiro M, Okuda M, Yoshie Y, Sanada T, Notsumata K, Tanaka N, Matsui O. Histopathological findings after ultraslective transcatheter arterialchemoembolization for hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 2008 Nov 25. [Epub ahead of print]
- 4) Shinmura R, Matsui O, Kadoya M, Kobayashi S, Terayama N, Sanada J, Demachi H, Gabata T. Detection of hypervascular malignant foci in borderline lesions of hepatocellular carcinoma: comparison of dynamic multi-detector row CT, dynamic MR imaging and superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging. Eur Radiol, 2008;18:1918-1924.
- 5) Miyayama S, Matsui O, Yamashiro M, Ryu Y, Takata H, Takeda T, Aburano H, Shigenari N. Detection of hepatocellular carcinoma by CT during arterial portography using a cone-beam CT technology: comparison with conventional CTAP. Abdom Imaging, 2008 Mar 29. [Epub ahead of print]
2. 学会発表
- 1) Matsui O.: Hepatocarcinogenesis: stepwise changes of hemodynamics and angiogenesis. 12th Asian Oceanian Congress of Radiology. Oct. 25, 2008, Seoul, Korea.
- 2) Matsui O.: Malignant hepatic tumors: radiologic-pathologic correlations. . 12th Asian Oceanian Congress of Radiology. Oct. 27, 2008, Seoul, Korea.
- 3) Kozaka K, Matsui O, Kobayashi S, Koda W, Nakanuma Y, Zen Y: Dynamic CT appearance of interface between hepatic cancers and surrounding liver: correlation with growth pattern. 12th Asian Oceanian Congress of Radiology. Oct. 25, 2008, Seoul, Korea.
- 4) Kitao A, Zen Y, Nakanuma Y, Matsui O: Late-phase images of CT during hepatic arteriography (CTHA) reflect histological drainage vessels of hepatocellular carcinoma. 12th Asian Oceanian Congress of

- Radiology. Oct. 25, 2008, Seoul, Korea.
- 5) Ryu Y, Zen Y, Abo H, Kitao A, Ueda K, Matsui O: Multicystic biliary hamartoma: radiologic-pathologic correlation. 12th Asian Oceanian Congress of Radiology. Oct. 25, 2008, Seoul, Korea.
- 6) Ozaki K, Matsui O, Suzuki M, Gabata T, Ohta T, Tanaka S: Assessment of the relationship between hepatic artery and portal vein using MDCT. 12th Asian Oceanian Congress of Radiology. Oct. 25, 2008, Seoul, Korea.
- 7) Matsui O: Intravascular therapies: Spectrum of imaging findings. 19th European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology. June 10-13, 2008, Istanbul, Turkey.
- 8) Kozaka K, Matsui O, Kobayashi S, Nakanuma Y, Zen Y: Pure bile ductular carcinoma: imaging pathologic correlation in comparison with ordinal type of cholangiocellular carcinoma. June 10-13, 2008, Istanbul, Turkey.
- 9) 小坂一斗、松井 修、小林 聡、蒲田敏文、全 陽、中沼安二: 細胆肝癌の血流画像: 通常型胆肝癌との対比. 第 67 回日本医学放射線学会総会. April, 2008、横浜市.
- 10) 小林 聡、松井 修、蒲田敏文、眞田順一郎、香田 渉、南 哲弥、龍 泰治、宮山士朗: 経動脈性門脈造影下 CT (CTAP) で高吸収を呈する結節の経静脈性造影 CT 所見について. 第 67 回日本医学放射線学会総会. April, 2008、横浜市.
- 11) 津田 奈津子、松井 修: Gd-E0B-DTPA 造影 MRI に関連するトランスポーター活性比較 (ラット). 第 36 回日本磁気共鳴医学会大会. Sept. 2008, 旭川市.
- 12) Kitao A, Zen Y, Nakanuma Y, Matsui O: A radiopathological study of drainage veins of hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule. ISIR & JSIR 2008, May 14-17, 2008. 軽井沢.
- 13) 小林 聡、松井 修、蒲田敏文、小坂一斗、瀧 圭一、井上 大、上田和彦、全 陽、原田憲一、中沼安二、眞田順一郎、香田 渉、南 哲弥、龍 泰治: 小型の細胆管細胞癌の造影画像所見の特徴について. May 22-23, 2008. 大阪市.
- 14) 北尾 梓、全 陽、中沼安二、松井 修: 肝細胞癌および腺腫様過形成の流出血管: 動脈造影下 CT 所見と病理像による検討. May 22-23, 2008. 大阪市.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。

3.その他
なし。

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業)
肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発
分担研究報告書

切除肝癌の病理学的特徴と腫瘍肉眼型

研究分担者 佐田 通夫 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 教授

研究要旨：根治目的で肝切除が施行された5cm以下の小肝癌110例において、臨床、病理学的因子を用い、再発、生存にかかわる因子について検討した。多変量解析の結果、再発、生存の両方にかかわる因子として、病理学的脈管侵襲(mvp)が重要であった(再発;P=0.013, 生存P=0.005)。mvpを治療前に予測するため、切除前に検討可能な腫瘍因子についてmvpとの相関を検討したところ(Logistic regression analysis)、腫瘍肉眼型(単純結節周囲増殖型、多結節癒合型)と強く相関した。腫瘍径30mm以下の小肝癌のmvpの存在する割合は、単純結節型で20%であるのに対し、単純結節周囲増殖型、多結節癒合型では、50%以上であった。腫瘍肉眼型を早期診断することにより、治療前にmvpを予測することが可能となり、治療方針の決定や予後の推測に有用であると考えられる。

共同研究者

黒松亮子 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 講師

住江修治 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 助教

A. 研究目的

切除後の生存に関わる因子として、Microvascular invasion (mvp) が報告されている。

しかし、MDCT や MRI の進歩により、早期診断のレベルが向上したにもかかわらず、mvp を術前に診断することは、いまだ困難であるのが現状である。

mvp が、治療前に評価できれば、治療法の選択や、治療後の予後の推測に有用と考えられる。そこで、小肝癌において、mvp が、切除後の再発や予後に影響するか否か、さらに、切除前に評価可能な腫瘍因子を中心に、mvp の予測因子を検討した。

B. 研究方法

対象は、1995年1月から2005年12月の期間に肝癌を診断され肝切除がおこなわれた142例のうち、根治切除が行われた腫瘍径5cm以下単発、あるいは腫瘍径3cm以下腫瘍個数3個以下の肝癌110例とした。

症例は、平均年齢62.6歳、男性90例女性20例であった。ウイルスマーカーはHBs抗原陽性27例、HCV抗体陽性74例、ともに陰性9例であった。肝機能は、慢性肝炎57例肝硬変(Child-Pugh A)53例、平均観察期間は51.5±32.1ヵ月であった。肝癌の診断は、21例は細径針腫瘍生検にて病理学的に診断し、他の89例は腹部超音波検査、ダイナミックCT、MRI、DSA、CTHA、CTAPの画像診断、腫瘍マーカーにより総合的に診断した。肝癌の平均腫瘍径は

28.1mm、AFP 中央値 25ng/ml、PIVKA-II 中央値 63mAU/ml であった。切除肝において、mvp、病理学的肝内転移(im)、cell encapsulation の有無が検討され、mvp +/- は49/61例、im +/- は17/93例、fc +/- は77/33例であった。腫瘍肉眼型は、肝癌取り扱い規約に基づき決定され、境界不明瞭型3例、単純結節型59例、単純結節周囲増殖型29例、多結節癒合型19例であった。腫瘍分化度については、高分化/中分化/低分化がそれぞれ4/102/4例であった。

切除後、1-3ヶ月ごとに腹部超音波検査、腫瘍マーカーを測定、3-6ヶ月ごとにダイナミックCTまたはMRIを行い、注意深く経過観察をした。

これらの症例は、患者背景の比較には、Man-Whitney U 検定、 χ^2 検定を用いた。Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析、多変量解析により、再発、生存に関わる因子を、ロジステック回帰分析を用い、mvp の予測因子を検討した。また、生存曲線の作成は Kaplan-Meier 法を用い、再発率、生存率の比較は log-rank test により行った。

C. 研究結果

1) 再発に関わる因子の検討：肝切除後の再発に関わる因子は、単変量解析では、肝硬変、mvp、im、肉眼型(境界不明瞭型+単純結節型 / 単純結節癒合型+多結節癒合型)、腫瘍個数で、これらの5因子について多変量解析を行うと、肝硬変 ($P=0.032$)、mvp ($P=0.013$) が独立因子であった。mvp +/- 群での1年無再発生存率は66.9%、93.2%、3年無再発生存率は27.7%、62.5%、5年無再発生存率は20.8%、52.6%で、mvp + 群で有意に無再発生存率が低かった ($P=0.0001$)。

2) 生存に関わる因子の検討：肝切除後の生存に関わる因子は、単変量解析では、mvp、im、腫瘍個数で、これらの3因子について多変量解析を行うと、mvp ($P=0.005$)、im ($P=0.043$)、腫瘍個数 ($P=0.012$) が独立因子であったが、mvp が最も強い因子であった。mvp +/- 群の3年生存率は69.6%、92.3%、5年無再発生存率は59.3%、92.0%で、mvp+群で有意に生存率が低かった ($P=0.001$)。

3) mvp の予測因子の検討：肝癌切除前に評価可能な AFP、PIVKA-II、腫瘍径、腫瘍個数、腫瘍分化度、腫瘍肉眼型の6項目について、mvp の予測因子を検討した。腫瘍肉眼型(単純結節周囲増殖型+多結節癒合型) が有意に mvp と関連性が認められた ($P<0.0001$)。

4) 腫瘍径 30mm 以下の小肝癌の腫瘍肉眼型と mvp、im の頻度：腫瘍径 30mm 以下の小肝癌 71 例における腫瘍肉眼型別 mvp の頻度は、境界不明瞭型 0%、単純結節型 20.5%、単純結節周囲増殖型 58.8%、多結節癒合型 75.0%と、単純結節周囲増殖型、多結節癒合型の 50%以上で mvp が認められた。また、im は、境界不明瞭型と単純結節型では 0%、単純結節周囲増殖型は 23.5%、多結節癒合型で 25%と、単純結節周囲増殖型と多結節癒合型で高率に認められた ($P<0.01$)。

D. 考察

肝癌の早期診断のモダリティとして、画像診断や腫瘍マーカーに加え、分子生物学的マーカーなどの有用性が報告されているが、実際、臨床の場で有用であるのは、迅速かつ簡便な診断法である。本研究では、肝癌の根治切除後の再発、生存に関わる因子について、容易に得られる臨床病理学的

因子を中心に検討し、mvp が再発、生存の両方の危険因子として重要であることを明らかにした。しかし、mvp は切除後の病理学的診断により始めて明らかにされるものであり、術前、術中に診断することは困難である。そこで、mvp の予測因子を、手術前に得られる因子を用い検討した。その結果、腫瘍肉眼型が mvp と強く相関し、単純結節周囲増殖型と多結節癒合型で mvp が高頻度に認められた。腫瘍肉眼型は、術前の画像診断の総合評価により約 80% は評価可能と考えられている。近年、腫瘍肉眼型の評価にはダイナミック CT に加え、造影超音波検査が有用であることも明らかにされつつあり、より高率に腫瘍肉眼型の推測が可能となるものと期待される。

腫瘍肉眼型を治療前に評価し、mvp の有無を推測することは、治療法の選択の一助となり、予後の推定に有用であると考えられた。

E. 結論

肝癌の腫瘍肉眼型を治療前に評価することで、切除肝癌の再発、生存に関わる因子として最も重要な mvp の推測することが可能であると考えられた。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishida Y, Nagamatsu H, Koga H, Yoshida H, Kojiro M, Sata M. Hepatocellular carcinoma with a "nodule-in-nodule" appearance reflecting an unusual dilated pseudoglandular structure. Intern Medicine, 2008;47:1215-1218.

Fukumori K, Yano Y, Sumie S, Kuwaki K, Yamashita F, Tanaka M, Sata M. Transarterial chemoembolization as salvage therapy after unsuccessful hepatic arterial infusion chemotherapy in advanced hepatocellular carcinoma. Mol Med Report, 2008;1:521-524.

Sumie S, Kuromatsu R, Okuda K, Ando E, Takata A, Fukushima N, Watanabe Y, Kojiro M, Sata M. Microvascular invasion in patients with hepatocellular carcinoma and its predictable clinicopathological factors. Ann Surg Oncol, 2008;15:1375-1382.

黒松亮子、安東栄治、高田晃男、福嶋伸良、住江修治、佐田通夫. 初発肝癌と再発肝癌の再発、予後の比較と治療法選択. 消化器科 2008;47:97-104

田中正俊、佐田通夫. RFA:経皮的ラジオ波焼灼治療 小切開したラジオ波焼灼療法. 映像情報 Medical 2008;20:696-699

2. 学会発表

田中正俊、由谷茂、村島士朗、工藤まいさ、倉岡圭、原田和徳、黒松亮子、佐田通夫. 小肝細胞癌患者の自然経過. 第94回日本消化器病学会総会、口演、5月8日、福岡(日本消化器病学会雑誌 Suppl, A176)

黒松亮子、安東栄治、高田晃男、福嶋伸良、住江修治、長岡栄、黒木淳一、佐田通夫. 腫瘍径 3-5cm 腫瘍個数 2 個以下の肝細胞癌における RFA と TAE の治療効果の比較 (Retrospective Study). 第44回日本肝臓学会総会、口演、6月5日、松山(肝臓

Suppl.1:A133)

黒松亮子、安東栄治、佐田通夫. 5cm 以下単発肝癌の治療方針. 第 12 回日本肝臓学会大会、第 50 回日本消化器病学会大会合同パネルディスカッション 5、10 月 2 日、東京 (肝臓 49 Suppl.2:A462)

永松洋明、平城守、佐田通夫. 脈管侵襲を伴う肝細胞癌症例に対する治療. 第 12 回日本肝臓学会大会、第 50 回日本消化器病学会大会合同パネルディスカッション 5、10 月 2 日、東京 (肝臓 49 Suppl.2:A464)

住江修治、黒松亮子、奥田康司、黒木淳一、安東栄治、高田晃男、福嶋伸良、長岡栄、井上欣哉、新関敬、鳥村拓司、佐田通夫. 肝細胞癌の診断における Sonazoid-US の有用性. 第 12 回日本肝臓学会大会ポスター、10 月 2 日、東京 (肝臓 49 Suppl.2:A576)

永松洋明、平城守、水上直久、佐田通夫. 脈管侵襲を伴う切除不能肝細胞癌症例に対する治療. 第 46 回日本癌治療学会総会ワークショップ 18、10 月 31 日、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発
分担研究報告書

高感度測定法による AFP、AFP-L3 および PIVKA II の臨床的有用性の評価

研究分担者 青柳 豊

新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器内科学分野 教授

研究要旨

AFP、AFP-L3 および PIVKA II の新しい高感度測定法（全自動マイクロチップ電気泳動イムノアッセイシステム； Wako 純薬工業株式会社）を用いて、肝癌 147 例、C 型慢性肝炎 29 例を対象として、肝細胞癌マーカーとしての臨床的有用性についての評価を行なった。結果、1) AFP、AFP-L3 の新しい高感度測定法による測定値は従来法（LiBASys）と良好な相関性を示したが、AFP-L3 は測定低値域での相関性が低い傾向であった。2) ROC 曲線（Receiver operating characteristic curve）を用いた評価では AFP、AFP-L3 および PIVKA II の 3 つの新しい高感度測定法の曲線下面積はそれぞれ、0.804、0.840、0.829 であった。3) 従来法 AFP-L3 10% の感度／特異度は 42.7%/100% であった。一方、高感度法 AFP-L3 では Cut off 値を 10% とした場合、感度／特異度は 47.6%/100%、7.5% とした場合は感度／特異度は 56.6%/96.6% であり高特異度を維持しつつ感度を上げることが可能であった。4) 腫瘍進展度別に従来法 AFP-L3、高感度法 AFP-L3 による診断能を比較検討した結果、進展早期（T1、T2）における高感度法 AFP-L3 による診断能向上を確認した。5) 生命予後予測因子として AFP-L3 を評価した結果、従来法と同様、高感度法 AFP-L3 は良好に肝癌患者の生命予後を層別化することを確認した。今後、更に症例を蓄積し新しい AFP-L3 高感度測定法の臨床的有用性の評価を確認する予定である。

A. 研究目的

フコシル化 AFP（AFP-L3）は肝細胞癌（HCC）のスクリーニングおよび予後予測に用いられている。また、我々は、生命予後予測因子としての AFP-L3 は、AFP 濃度高値 HCC 患者群よりも AFP 濃度低値群において、

より重要であることを確認している。

（Hepatol Res, 37:914-22, 2007）。この知見は、臨床で遭遇する AFP 濃度低値 HCC 患者に対する AFP-L3 の正確な評価の必要性を示すものである。

今回、Wako 純薬工業株式会社より開発さ

れた新しい高感度AFP-L3測定法の臨床的有用性について、従来法 (LiBASys) との比較・評価を行ったので報告する。

HCC の早期診断と予後予測におけるAFP-L3 の役割を明確にすることは、HCC 患者の治療入院期間の短縮、結果としての在院日数の短縮や医療費削減へ寄与するものと考えられる。

B. 研究方法

1999年4月から2008年1月に新潟大学医学部附属病院でHCCと診断された147例を対象とした。対照患者は2001年9月から2006年7月に同病院でC型慢性肝炎と診断された29例とした。HCC患者の治療前血清と対照C型慢性肝炎患者血清中AFP (ng/ml)、AFP-L3 (%) およびPIVKA II (mAU/ml) 値を従来法 (LiBASys) と高感度法で測定し以下の項目について評価した。

- 1) AFP、AFP-L3 および PIVKA II 測定値の高感度法と従来法との相関性。
- 2) AFP、AFP-L3 および PIVKA II 測定値の高感度法と従来法でのROC曲線下面積の比較。
- 3) 高感度法AFP-L3の感度・特異度の評価。
- 4) 進展早期における高感度法AFP-L3測定感度の評価。
- 5) 生命予後予測因子としての従来法AFP-L3、高感度法AFP-L3の測定意義についての評価。

(倫理面への配慮)

患者血清は研究利用目的を説明した上で、本人の同意のもと採取しており、対象症例のデータは連結可能匿名化を行った上で解

析を行っている。

C. 研究成果

HCC 症例の年齢中央値 (range) は 68 (38-82) 歳、男性 95 例/女性 52 例、HCV 抗体陽性/陰性は 88/59 例、HBs 抗原陽性/陰性は 40/107 例、腫瘍進展度 (原発性肝癌取扱い規約 第 5 版) は T1 ; 26 例/T2 ; 50 例/T3;48 例/T4;23 例であった。一方、C 型慢性肝炎症例の年齢中央値 (range) は 52 (26-73) 歳、男性 20 例/女性 10 例であった (表 1)。

表 2 に HCC 患者と C 型慢性肝炎患者血清中の高感度法 AFP (ng/ml)、高感度法 AFP-L3 (%) および高感度法 PIVKA II (mAU/ml) 値と従来法 AFP (ng/ml)、従来法 AFP-L3 (%) を示す。

表 1

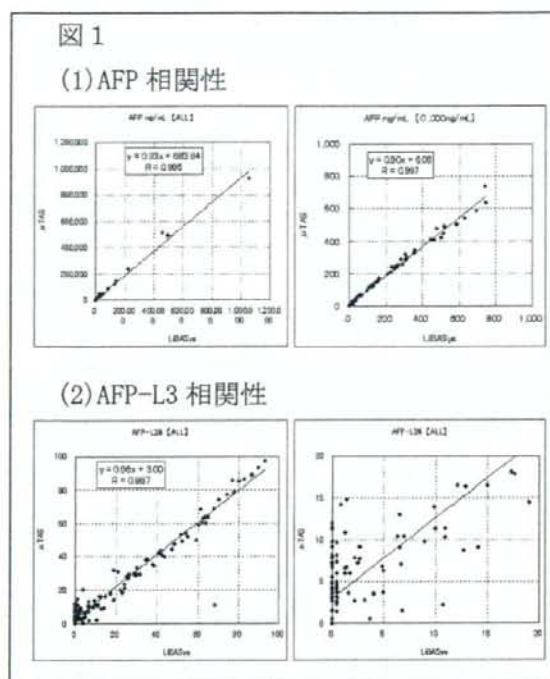
	HCC n=147	CH(C) n=29
年齢 (median, range)	68 (38-83)	52 (26-73)
性別 (F/M)	52/95	10/19
Anti-HCV (+/-)	88/59	29/0
HBsAg (+/-)	40/107	
Child-Pugh (A/B/C)	111/30/6	
TNM (I / II / III / IV)	26/50/48/23	

表 2

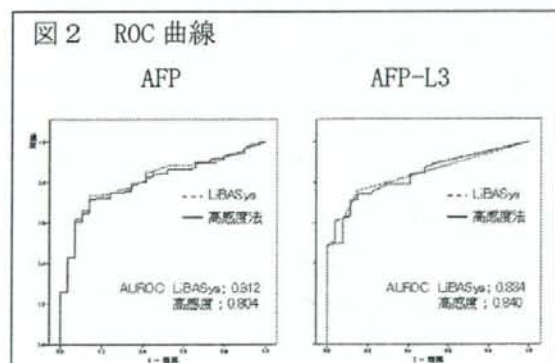
	HCC n=147	CH(C) n=29
LiBASys AFP ng/ml (median, range)	65.5 (0.8-1054347)	2.3 (0.8-521.8)
LiBASys AFP-L3 % (<10/≥10)	82/61	29/0
高感度 AFP ng/ml (median, range)	68.7 (1.5-921613)	6.3 (1.0-489.2)
高感度 AFP-L3 % (<10/≥10)	77/70	29/0
高感度 PIVKA II mAU/ml (median, range)	55.0 (5.0-119600)	15.0 (6.0-32.0)

- 1) AFP、AFP-L3 の新しい高感度測定法による測定値は従来法 (LiBASys) と良好な相関性を示したが、AFP-L3 は測定低値域での

相関性が低い傾向であった (図1)。



2) ROC 曲線 (Receiver operating characteristic curve) を用いた評価では AFP、AFP-L3 および PIVKA II の 3 つの新しい高感度測定法の曲線下面積はそれぞれ、0.804、0.840、0.829 であった (図2)。



3) 従来法 AFP-L3 10%の感度/特異度は

42.7%/100%であった。一方、高感度法 AFP-L3 では Cut off 値を 10%とした場合、感度/特異度は 47.6%/100%、7.5%とした場合は感度/特異度は 56.6%/96.6%であり高特異度を維持しつつ感度を上げることが可能であった。(表3)。総 AFP 濃度低値例 (<30ng/ml) においてもその傾向を認めた (図3)。

表3

(1) AFP 感度・特異度

	Cut-off	Sensitivity	Specificity
LiBASys	10%	42.7% (61/143)	100% (29/29)
高感度法	5%	66.7% (98/147)	86.2% (25/29)
	7.5%	56.6% (83/147)	96.6% (28/29)
	10%	47.6% (70/147)	100% (29/29)

(2) AFP 感度・特異度 (<AFP 30ng/ml)

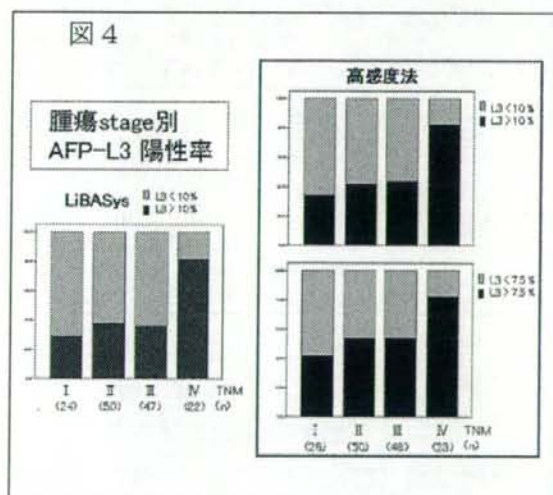
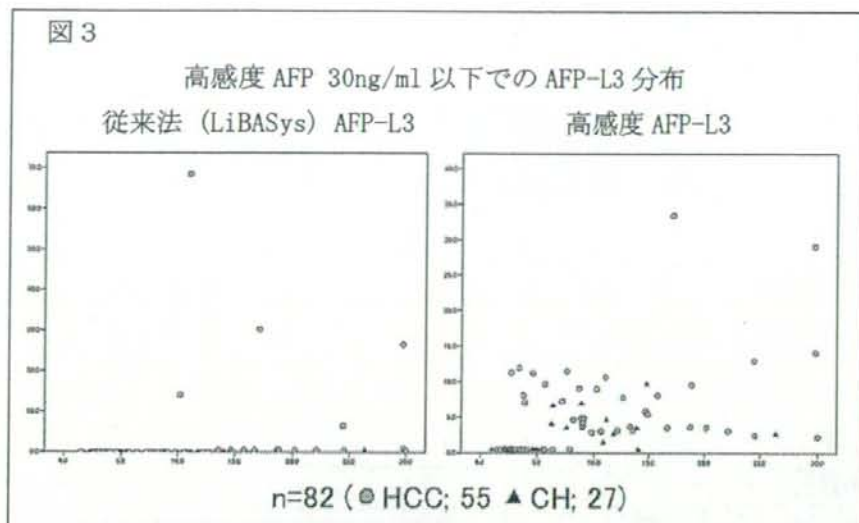
	Cut-off	Sensitivity	Specificity
LiBASys	10%	7.8% (4/51)	100% (24/24)
高感度法	5%	36.4% (20/55)	88.5% (23/26)
	7.5%	29.1% (16/55)	96.2% (25/26)
	10%	16.4% (9/55)	100% (26/26)

4) 腫瘍進展度別に従来法 AFP-L3、高感度法 AFP-L3 による診断能を比較検討した結果、進展早期 (T1、T2) 症例における高感度法 AFP-L3 による診断能向上を確認した (図4)。

5) 生命予後予測因子として AFP-L3 を評価した結果、従来法と同様、高感度法 AFP-L3 は良好に肝癌患者の生命予後を層別化することを確認した (図5)。

D. 考察

フコシル化 AFP (AFP-L3) は肝細胞癌 (HCC) で特異的に上昇し、HCC のスクリーニングおよび予後予測に用いられている。我々は以前より、HCC 患者における治療前お



よび治療後 AFP-L3 測定 of 臨床的意義を報告してきた (Cancer, 83: 2076-82, 1998, Hepatol Res, 23:287-295, 2002, 27: 280-288, 2003, 厚生労働科学研究費肝炎等緊急対策研究平成 17~19 年度研究報告)。更に、生命予後予測因子としての AFP-L3 は、AFP 濃度高値 HCC 患者群よりも AFP 濃度低値群において、より重要であることを確認している。(Hepatol Res, 37:914-22, 2007)。この知見は、臨床で遭遇する総 AFP 濃度低値 HCC 患者症例に対する AFP-L3 の正確な

評価の必要性を示すものである。

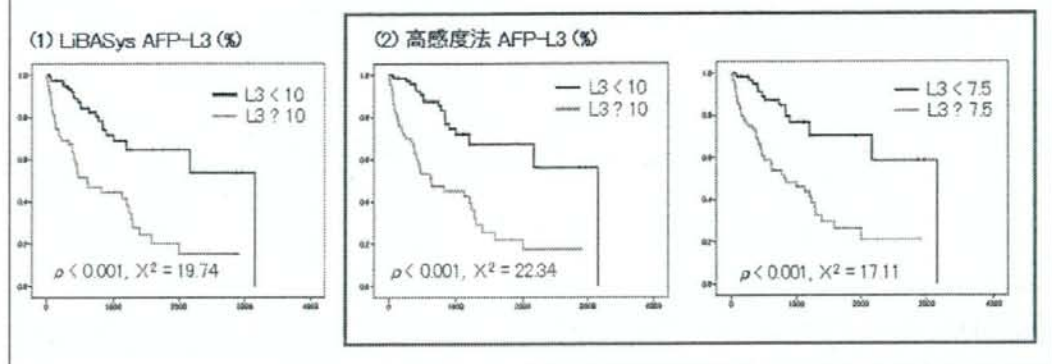
今回、Wako 純薬工業株式会社より開発された新しい高感度 AFP-L3 測定法の臨床的有用性についての評価を行なった。結果、従来法 AFP-L3 測定法に比較し、特異度を維持しつつ HCC 診断感度を上げることが可能であり、総 AFP 濃度低値例 (<30ng/ml) においてもその傾向を確認することが出来た。

また、腫瘍早期進展 (T1、T2) 症例においても高感度 AFP-L3 による診断能向上を確認した。一方、予後予測因子としての AFP-L3 の意義においては、高感度 AFP-L3 は従来法同様、良好に HCC 患者の生命予後を層別化することを確認した。

現在の測定法では、総 AFP 濃度が低い場合は AFP-L3 の測定は困難であり、AFP-L3 の正確な評価がなされていない症例も存在していたと予想される。今後、更に症例を増やして再度詳細に検討確認する必要があるが、高感度 AFP-L3 測定法を用いることにより、より多くの HCC 患者の AFP-L3 の正確な評価が可能となり、HCC 患者の早期診断と予後予測、治療効果の正確な判定に大きく

図 5

AFP-L3 による HCC 患者の生命予後



貢献できると予想される。

E. 結論

高感度 AFP-L3 は従来法 (LiBASys) に比較し、特異度を維持しつつ HCC 診断感度を上げることが可能であり、総 AFP 濃度低値例 (< 30ng/ml) においてもその傾向を認めた。腫瘍早期進展 (T1、T2) 症例における高感度 AFP-L3 による診断能向上を確認した。高感度 AFP-L3 は従来法同様、良好に HCC 患者の生命予後を層別化することを確認した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuchiya A, Heike T, Baba S, Fujino H, Umeda K, Matsuda Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y, Nakahata T. Sca-1+ endothelial cells (SPECs) reside in the portal area of the liver and contribute to rapid recovery from acute liver disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, (365)595-601
2. Isogawa M, Higuchi M, Takahashi M, Oie M, Mori N, Tanaka Y, Aoyagi Y, Fujii

M. Rearranged NF-kappa B2 gene in an adult T-cell leukemia cell line. *Cancer Sci.* 2008 Apr;99(4):792-8.

3. Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Honda Y, Takamura M, Sugahara S, Ishikawa T, Ohkoshi S, Sato Y, Aoyagi Y. Sustained response to interferon-alpha plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells. *Hepatol Res.* 2008 Jul;38(7):664-72.
4. Nakamura J, Toyabe SI, Aoyagi Y, Akazawa K. Economic impact of extended treatment with peginterferon alpha-2a and ribavirin for slow hepatitis C virologic responders. *J Viral Hepat.* 2008 Apr;15(4):293-9.
5. Nakamura J, Terajima K, Aoyagi Y, Akazawa K. Cost-effectiveness of the national screening program for hepatitis C virus in the general population and the high-risk groups.

Tohoku J Exp Med. 2008
May;215(1):33-42.

6. Ohkoshi S, Yoshimura A, Yamamoto S, Yano M, Kurita S, Yamazaki K, Aoki Y, Yamagiwa S, Wakabayashi H, Sugiyama M, Takahashi T, Ishikawa T, Matsuda Y, Ichida T, Kamimura T, Aoyagi Y. Successful treatment with lamivudine may correlate with reduction of serum ferritin levels in the patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis type B *HepatoI Int* 2008 2:382-387.
7. Watanabe T, Soga K, Hirono H, Hasegawa K, Shibasaki K, Kawai H, Aoyagi Y. Features of hepatocellular carcinoma in cases with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2009 Jan 14;15(2):231-9.
8. Kurita S, Ohkoshi S, Yano M, Yamazaki K, Suzuki K, Aoki YH, Matsuda Y, Wakai T, Shirai Y, Ichida T, Aoyagi Y. Progression of hypermethylation of the p16 (INK4A) gene from normal liver to nontumorous liver and hepatocellular carcinoma: an evaluation using quantitative PCR analysis. *Dig Dis Sci.* 2009 Jan;54(1):80-8.
9. Tamura Y, Yamagiwa S, Aoki Y; Kurita S, Suda T, Ohkoshi S, Nomoto M, Aoyagi Y. Serum alpha-fetoprotein levels during and after interferon therapy and the development of hepatocellular carcinoma in patients

with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci.*
in press.

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業)
肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発
分担研究報告書

パスウェイおよび遺伝子ネットワークを用いたマイクロアレイデータの
解析手法に関する研究

研究分担者 田中 博 東京医科歯科大学大学院 生命情報科学教育部 教授

研究要旨：より精度の高い早期肝がん診断用分子マーカーの同定を目指して、種々の臨床病理学的因子に対して特異的な発現変動を示す遺伝子群の解析を進めるとともに、疾患形成に関わる遺伝子パスウェイを分析する手法の開発を行った。

A. 研究目的

マイクロアレイを用いることにより、一度に数万遺伝子の発現量を測定することができるが、その医学的・生物学的な解釈は困難であることが少なくない。近年では、既知の遺伝子パスウェイに遺伝子発現変化をマッピングすることで、疾患を織りなす系としての変化を捉えるような解析手法の研究が進められている。また、タンパク質相互作用データベースの情報を用いることにより、既知のパスウェイ概念に留まらず、横断的な遺伝子間の相互作用を解析することができる。

本研究では、肝細胞癌における遺伝子発現プロファイルを多角的に分析することで、肝細胞癌における発癌および進行のメカニズム解明、およびこれらの知見に基づいたより精度の高い早期肝がん診断用分子マーカーの解明を目的とし、研究を進めている。本年度はプロトタイプとして、門脈侵襲(vp)の有無に相関する遺伝子発現変動に着目し、解析を行った。

B. 研究方法

東京医科歯科大学 肝胆膵外科で手術を受けた、原発性肝細胞癌 168 症例の臨床献体を用いた。本研究は本学・倫理審査委員会において承認されており、すべての患者から同意書を得た。

これらの癌部組織から mRNA を抽出し、Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 アレイを用いて遺伝子発現解析を行った。これらの症例を、門脈侵襲の認められた vp(+)群(n=81)と認められなかった vp(-)群(n=87)に分け、各遺伝子に対して Wilcoxon の順位和検定で false discovery rate < 5% (p<0.00213)かつ平均発現量の倍差が 1.2 倍より大きい 1583 プローブセットを抽出し、門脈侵襲関連遺伝子群として規定した。

C. 研究結果

まず、門脈侵襲関連遺伝子群 1583 プローブセットを個別に検討したところ、vp(+)群での細胞周期関連遺伝子の全体的な亢進が認められた。さらに、これらの遺伝子群

に共通する遺伝子パスウェイを調べるため、京都大学で公開している KEGG PATHWAY データベースを用いて解析を行ったところ、細胞周期の亢進のみならず、補体合成・脂質代謝系・チトクローム P450 代謝系などの肝代謝機能の低下を確認した。さらに、タンパク質相互作用データベースから門脈侵襲関連遺伝子群に関連するものを抽出してネットワークを作成したところ、KEGG PATHWAY には収録されていない Aurora kinase A/B および Survivin などの細胞周期関連遺伝子についての知見を得ることができた。

D. 考察

遺伝子パスウェイを用いた解析により、門脈侵襲は細胞周期の亢進だけではなく、肝代謝機能の低下を惹起することが分かった。これは、癌の悪性化に伴って肝細胞の脱分化が起り、本来の代謝機能が失われていることを示唆していると考えられる。また、タンパク質相互作用データベースを用いて、既知のパスウェイに限定されない探索的な相互作用解析を行うことにより、細胞周期の M 期において染色体分配に重要な役割を果たす Aurora kinase A/B や Survivin などの異常亢進が見出すことができ、これらは癌における異数性に影響を与えていると考えられる。

E. 結論

遺伝子パスウェイおよび遺伝子相互作用データベースを用いることにより、血管侵襲の有無に関わる遺伝子群の機能解析を行った。今後、ほかの臨床病理学的因子への適

用を進めるとともに、得られるネットワークの解釈や、ハブ遺伝子等のネットワーク的な特徴を考慮した早期肝がん診断用分子マーカー候補分子の効率的な選定についても研究を進めたいと考えている。

F. 研究危険情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yasen M, Mizushima H, Mogushi K, Obulhasim G, Miyaguchi K, Inoue K, Nakahara I, Ohta T, Aihara A, Tanaka S, Arii S, Tanaka H. Expression of Aurora B and alternative variant forms in hepatocellular carcinoma and adjacent tissue. *Cancer Sci.* (in press)

Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Kurokawa T, Nakamura N, Inazawa J, Tanaka H, Arii S. Surgical contribution to recurrence-free survival in patients with macrovascular invasion-negative hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg.* (in press)

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発
分担研究報告書

Gd-EOB-DTPA 造影 MRI の肝癌診断における有用性

研究分担者 森安 史典 東京医科大学 消化器内科 教授

研究要旨

我々は 184 結節の肝腫瘍において Gd-EOB-DTPA 造影 MRI（以下 EOB-MRI）と血管造影下 CT・造影超音波所見とを対比・検討した。また、得られているものに関してはその病理学的診断との関連も検討した。その結果、血管造影下 CT で古典的肝細胞癌と診断された結節の 98%は EOB-MRI の肝細胞相のみで検出可能であった。一方、造影超音波検査のクッパー相と EOB-MRI 肝細胞相との関連性は見られなかった。全体として高分化型肝細胞癌の診断・検出能は EOB-MRI が優れていた。

A. 研究目的

新しい MRI 造影剤である肝細胞特異性造影剤（Gd-EOB-DTPA）が臨床適応となり、HCC 診断における新たな展開が期待されている。今回、我々は肝腫瘍における Gd-EOB-DTPA の診断能について血管造影下 CT および造影超音波所見と対比検討し肝癌診療における有用性について考察する。

B. 研究方法

対象は 2008 年 1 月～2008 年 9 月に当院で肝細胞結節が疑われ EOB-MRI・CTHA/CTAP・造影超音波検査が施行された 52 症例、184 結節である。患者背景は、HBV : HCV : nonB-nonC = 12 : 35 : 5、平均年齢 70.4 歳であった。EOB-MRI では、20 分後の肝細胞相で低信号を呈した結節を病変とし、各腫瘍において各 modality の検査結果と比較検討した。また、病理学的所見が得られているものは病理所見とも対比した。

（倫理面への配慮）

本臨床研究はヘルシンキ宣言を遵守して実施している。さらに、担当医師は本試験実施に際し、試験内容について被験者本人に十分説明し、本試験への参加について、被験者本人の自由意志による同意を文書で得ている。

C. 研究結果

EOB-MRI の肝細胞相では、HCC だけでなく Dysplastic nodule (DN) でも 3 結節が低信号として認められた。血管造影下 CT で診断された古典的 HCC は肝細胞相のみで 98.0%検出可能であった。血管造影下 CT で血流変化のない肝細胞癌も肝細胞相で 9 例が診断可能であったが、Sonazoid による造影超音波 Kupffer 相では一定の傾向が無かった。全検査で検出能という点で比較すると EOB-MRI が優れていた。

D. 考察

血管造影下 CT は侵襲性の大きさや偽病変の多さが問題であった。また、従来 option で行われていた SPIO-MRI では存在診断・悪性度診断としても不十分であった。EOB-MRI では、偽病変の除外に有効であったものの、悪性度診断への有効性は低いと考えた。その一方で、諸検査で指摘されないような高分化型肝細胞癌が肝細胞相で明瞭に検出される症例が多数認められた。その様な経験から、EOB-MRI は肝癌の存在診断、特に早い段階から病変をとらえる検査法としての有効性が期待される。まだ撮像方法などの検討が必要であるが、今後、低侵襲な外来検査として有用となる可能性がある。

E. 結論

EOB-MRI は肝癌早期発見に有用な検査であると考えられた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Gd-EOB-DTPA 造影 MRI の肝癌診療ガイドラインにおける位置づけ (JDDW2008・第12回肝臓学会大会)

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことなし