

厚生労働省科学研究費補助金（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

肝細胞癌に対する肝移植の適応に関する画像情報を基にした基準の限界と、  
新しい基準の提唱：ミラノ基準の再検討に関する研究

研究分担者 川崎誠治 順天堂大学肝胆膵外科 教授

研究要旨：肝細胞癌（HCC）に対する肝移植後の再発の最も強力な予知因子は脈管侵襲と腫瘍の分化度（低分化癌）であるとされているが、これらは移植後の摘出肝の病理組織学的な検討ではじめて判る因子であり、その意味で現行の数と大きさから成る基準（ミラノ基準）はこれらの代替因子による基準であると考えられる。HCCにはAFPとPIVKA-IIという互いに独立した腫瘍マーカーが存在しており脈管侵襲と腫瘍の分化度とよく相関している。そこでHCC肝切除例において、脈管侵襲と腫瘍の分化度を、数と大きさから予測するモデルを、これらにAFPとPIVKA-IIを組み込んだモデルと比較すると、後者において有意に予測能が高かった。HCCに対する移植の基準には現行の数と大きさに加えて腫瘍マーカー（AFPとPIVKA-II）の値も組み込むべきである。

#### A. 研究目的

HCCに対する移植の選択基準としては、ミラノ基準（単発5cm以下、多発では最大径3cm以下、総数3個以下）が世界標準であり、他にもBismuthらによるものや、拡大基準（UCSF基準）等があるが、これらはすべて移植前の画像により診断された数と大きさから構成されている基準である。

移植後のHCC再発には肝内の脈管侵襲が大きな役割を果たしていると考えられ、移植後のHCC再発のもっとも強い独立した危険因子されている。さらに腫瘍の分化度（低分化HCC）も独立した予後不良因子であるとされている。しかしこれらは移植後の標本の検討で初めてわかる因子である。つまり数と大きさは、これらにかわる代替

因子であると考えられる。

HCCは、AFPとPIVKA-IIという相互に独立した腫瘍マーカーを有しこれらの病理学的因子と強い関連があるとされている。これらの事実から、数と大きさから構成される肝移植の適応基準に、腫瘍マーカーの情報を付加することにより、HCC移植後の再発に直接関与している脈管侵襲と腫瘍の分化度の二つの因子の予測度が向上するという仮説を立てた。本研究ではこの仮説をHCC肝切除症例で検討した。

#### B. 研究方法

HCC根治手術症例549例中、術前の画像診断で脈管侵襲が判明していた79例を除いた478例を対象とした。切除標本の検討で判明した脈管侵襲と

微少肝内転移（病理学的に門脈侵襲から発生すると考えられている）を脈管侵襲として扱い、腫瘍の分化度を、高一中分化に対して低分化に分類して検討した。

まず数と大きさのみの情報からどの程度HCCの脈管侵襲陰性が予測可能かを、数と大きさに様々なカットオフ値を設定して検討した。各カットオフ値に対応して予測の感度と特異度は変化するため、全体としての予測モデルを Logistic regression analysis を用いて ROC 曲線として作成した。ミラノ基準や他の基準（Bismuth 基準、UCSF 基準）は数と大きさよりなり、この ROC 曲線上の点として表現される。さらに数と大きさに AFP と DCP の二つのマーカーの値の情報を加えた予測モデルを同様にして作成した。これらモデルの予測能の比較は、ROC 曲線下の面積（AUC）の比較によって行った。特にミラノ基準に関しては、同じ感度での ROC 曲線の特異度を比べて診断能を比較した。高一中分化 HCC の予測に対する二種類のモデルの作成、およびの予測能の比較も同様にして行った。

### C. 研究結果

脈管侵襲は 150 例（31%）に、低分化 HCC は 49 例（10%）に認めた。AFP と PIVKA-II 相互の相関はなかった。脈管侵襲陰性に対する予測モデル：数と大きさのみからなるモデル（Model 1A）と、これらに二つの腫瘍マーカーを加えたモデル（Model 1B）を ROC 曲線に

より比較した。現行の数と大きさからなる基準である Bismuth、ミラノ、UCSF 基準はそれぞれ Model 1A の ROC 曲線上の点として表現される。ミラノ基準の感度・特異度は 81.2% および 43.3% であった。この感度における Model 1B の特異度は 52.4% であり、その差と 95% C. I. は 9.1%（1.3-14.2%）であった。Model 1A と Model 1B の AUC は、69.1% と 75.2% であり、その差と 95% C. I. は 6.1%（2.33-10.7%）であった。

高一中分化 HCC に関する予測モデル：数と大きさのみからなるモデル（Model 2A）と、これらに腫瘍マーカーを加えたモデル（Model 2B）を同様にして比較した。ミラノ基準の感度・特異度は 74.5% および 38.8% であった。この感度における Model 2B の特異度は 57.1% であり、その差と 95% C. I. は 18.3%（2.4-32.7%）であった。Model 2A と Model 2B の AUC は 59.0% と 71.5% であり、その差と 95% C. I. は 12.5%（5.84-21.4%）であった。

### D. 考察

HCC に対する現行の移植選択基準は、HCC 再発に直接関与すると考えられる脈管侵襲陽性および低分化 HCC の代替因子からなる基準という限界を超えない。

AFP と DCP は相互に相関が無く、理論的にはこれらの同時測定は病理学的予後因子予測の特異度を低下させることなく感度を上昇させる。腫瘍マーカーを組み入れたモデルの ROC 曲線



は脈管侵襲陰性、高一中分化 HCC のいずれの予測においても、画像だけの情報からなる ROC 曲線と重なることなく左上方に凸であり、もとの基準がミラノ基準であるか他のものであるかによらず、これらに腫瘍マーカーの情報を組み入れることによって、予測能が向上することを意味している。

#### E. 結論

HCC に対する移植の適応基準には現行の術前画像診断による腫瘍の数と大きさの情報に、腫瘍マーカーのそれを追加すべきであると考えられる。

文献: Hasegawa K, Imamura H, Ijichi M, et al. Inclusion of tumor markers improves the correlation of the Milan criteria with vascular invasion and tumor cell differentiation in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver resection. *J Gastrointestinal Surg* 2008;12:858-66.

#### 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

Konishi N, Ishizaki Y, Sugo H, Yoshimoto J, Miwa K, Kawasaki S. Impact of a left lobe graft without modulation of portal flow in adult-to-adult living donor liver

transplantation. *Am J Transp*, Jan; 8(1):170-174, 2008

Ishizaki Y, Yoshimoto J, Sugo H, Miwa K, Kawasaki S. Hepatectomy using traditional Péan clamp-crushing technique under intermittent Pringle maneuver. *Am J Surg*, Sep; 196(3):353-357, 2008

Ishizaki Y, Kawasaki S. The evolution of liver transplantation for hepatocellular carcinoma (past, present, and future). *J Gastroenterol*, 43(1): 18-26, 2008

##### 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

厚生労働省科学研究費補助金（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

研究分担者 角谷 眞澄 信州大学 画像医学講座 教授

研究要旨：新しい診断法・診断機器により、臨床に有用な肝癌早期発見システムの構築を目的とした研究である。具体的には、画像（細胞外液性造影剤および胆道排泄性造影剤を用いた造影 MRI や動注 CT）と病理組織所見との対比および画像による経過観察を行うことで悪性度との関連性を推察し、新しい肝細胞癌の診断基準あるいはアルゴリズムを作成する。

#### A. 研究目的

年間約4万人が死亡している肝疾患は我が国の国民病であり、その多くがウイルス性慢性肝障害を基盤とする肝細胞癌（肝癌）である。高度危険群が明らかになりつつあるが、適切な治療時期を失った患者も多く、より精緻で効率の良い早期診断法の開発が喫緊の課題である。新しい画像診断法・診断機器により臨床に有用な肝癌早期発見システムを構築することを目的とする。

#### B. 研究方法

1. 磁気共鳴診断法(MRI)拡散強調像の信号強度と肝硬変に伴う結節性病変の悪性度との関連を手術・生検標本における組織所見と対比する。その結果から、早期肝細胞癌診断における診断的意義を検討する。

2. MRIにおける新しい肝胆道系造影剤(EOB)による造影所見と手術・生検所見を対比し、肝硬変に伴う肝細胞性結節の悪性度との関連を検討する。その結果から、早期肝細胞癌診断における診断的意義を検討する。

3. 手術・生検で確認された早期肝細胞癌・肝細胞癌の診断能（検出能および質的診断能）を超音波検査(造影超音波検査を含む)、dynamic CT、従来のMRI(T1強調像、T2強影像、dynamic MRI)、動注CT(経動脈性門脈造影下CT:CTAP、肝動脈造影下CT:CTHA)と上記の新しいMRI診断法との間で比較する。

4. 非組織診断例では、経過観察(一年以上)と画像所見の組み合わせによる臨床診断をゴールドスタンダードとして、3の検討を行う。

5. これらの検査はすべてを行う必要はない。MRIの新しい診断法が施行された前後一ヶ月以内に行われた画像診断法を比較検討の対象とする。

6. 画像所見の解析は各施設の複数の専門家(少なくとも1名は放射線科専門医)で行いそれを基本的に採用するが、必要に応じて本プロジェクトにおける専門家で総合的に判定する。



### C. 研究結果

1. 症例を蓄積中である。
2. 本年度は Gd-EOB-DTPA (EOB) を用いた造影 MRI に関して研究を行った。まず、EOB を用いたダイナミック MRI では従来の細胞外液性造影剤の 2 分の 1 の造影剤量であるため、ファントム実験にて従来の細胞外液性造影剤と造影能を比較したところ、生理的食塩水にて希釈した場合は、従来の造影剤の濃度の倍希釈された EOB の信号強度は、従来の造影剤ほど造影効果が得られないことがわかった。より生体内に近くするため、血液で希釈したところ、従来の造影剤濃度とその 2 分の 1 濃度の EOB を比較すると、ほぼ同等の造影効果が得られることが明らかとなった。また、EOB による dynamic MRI は、従来の細胞外液性造影剤に比して注入量が半量のため注入速度が同一の場合、血中における造影剤のピーク持続時間が短くなることが予想されたため、Dynamic MRI で用いられている 2D-FLASH 法と 3D-VIBE 法の 2 種類の撮像法を比較し、artifacts の出現頻度を検討した。それぞれの画像を視覚的に 5 段階評価し点数を比較すると、2D-FLASH 法が  $4.40 \pm 0.88$  点であったのに対し、3D-VIBE 法は  $3.61 \pm 0.60$  点と低い点数であり、両者の間には統計学的有意差を認めた。
- 3-6. 臨床研究に関しては、研究期間が短く現在症例を蓄積中である。

### D. 考察

2. で EOB を用いたダイナミック MRI は、動脈優位相で多血性である肝細胞癌を検出するとともに、造影後約 25 分で撮像され

る肝細胞造影相でも造影されない結節として描出できる、いわゆる「One-stop-shopping」が可能な造影剤と言われている。しかしながら、従来の細胞外液性造影剤の半分量でダイナミック MRI を施行すると、造影剤のピークの持続時間が短くなるため、画像への影響も予想された。近年、ダイナミック MRI の撮像法は、三次元でデータを収集する方法が主流となりつつあるが、二次元でデータを収集する方法と比較した結果、EOB を用いてダイナミック MRI を行う際は、二次元でデータを収集する撮像法 (2D-FLASH 法) の方がアーチファクトは少なく、良好な画像が得られることが明らかとなった。従って、臨床研究で用いる撮像法は、2D-FLASH 法が望ましいと考えられた。

### E. 結論

2. の研究の結論として、EOB を用いてダイナミック MRI を施行する際は、三次元で画像データを収集する撮像法 (3D-VIBE 法) より、二次元で画像データを収集する方法 (2D-FLASH 法) を用いる方が望ましいといえる。

### F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照。

### G. 研究発表

- ### H. 知的財産の出願・登録状況
- なし

厚生労働省科学研究費補助金（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

腫瘍内蛋白（分子マーカー）発現からみた肝細胞癌の悪性度診断：ラジオ波焼灼術後の  
再発や長期予後からみた検討

研究分担者 泉 並木 武蔵野赤十字病院 副院長・消化器科部長

研究要旨：肝細胞癌は分化の過程でCK-19陰性となるが、一部肝幹細胞由来で胆管上皮の特性を併せ持つ肝癌細胞が存在すると考えられる。この肝幹細胞から発生するCK-19陽性の肝細胞癌と考えられる腫瘍の予後や再発に関与しているか否かを解析した。ラジオ波焼灼術で治療した初発肝細胞癌110結節の腫瘍生検を抗CK-19抗体を用いた酵素抗体法で染色し陽性率を調べ、肝細胞癌の再発や予後との関連を調べた。CK-19陽性例は6例存在し、すべて中分化肝細胞癌であり高分化型では染色がみられず、HE染色ではCK-19陰性例の差はみられなかった。CK-19陽性例ではいずれも早期他部位再発がみられた。CK-19は肝細胞癌の早期再発予測マーカーになりえると考えられた。

共同研究者

土谷 薫 武蔵野赤十字病院  
消化器科

坂元亨宇 慶応大学病理学

A. 研究目的

肝細胞癌は根治した後も再発率が高く、腫瘍の分化度や脈管浸潤が予後に関係する。これまで血液中の腫瘍マーカーによって再発率や予後の解析が行われてきたが、再発や予後を予測しえる別の分子マーカーの探索が重要な課題である。早期発見された肝細胞癌に対しては、ラジオ波焼灼術（radiofrequency ablation; RFA）による治療が行われ、外科切除に匹敵する生命予後が認められている。しかし、RFA後に早期に肝内他部位に再発を認

める例がしばしば存在するため、その特徴を把握し、再発予防を目的とした治療に結び付けていく努力が重要である。最近、肝細胞の分化過程の分子発現が詳細に解析され、肝幹細胞からアルブミン合成能を有する肝芽細胞となり、さらに肝細胞に分化した時点では胆管上皮マーカーであるCK-19が陰性となることが判明している。一方、胆管上皮に分化する場合にはアルブミン合成がなくなり、CK-19は細胞質で陽性となる。肝細胞癌や胆管細胞癌はこれらの分化過程の細胞から癌化が起こると考えられ、肝幹細胞の形質を有する肝幹細胞由来の癌も存在する。最近胆管細胞癌ではCK-19が陽性となることが判明し、細胞内発現蛋白マーカーとして用いられている。そこで、われわれの施設でRFAにて治療を



行った早期肝細胞癌の腫瘍生検を行い、これらの細胞内発現蛋白をしらべ、予後との関連性を検討した。

## B. 研究方法

### (1) RFA治療を行った肝細胞癌の腫瘍病理所見とCK-19陽性率の関連性

2002年から2006年にわれわれの施設で腫瘍径3cm以下、かつ腫瘍数3個以下の早期肝細胞癌と診断された110結節に対してRFAにて治療を行った。治療前に全例で21G生検ニードルとガンを用いて腫瘍生検を施行した。腫瘍組織に対して通常のHE染色以外に、抗CK-19抗体を用いた酵素抗体法によって染色を行い、病理組織所見とCK-19陽性率を比較検討した。

### (2) 腫瘍内CK-19発現と血液検査や腫瘍マーカーの関連

RFA治療を行った110例の、血液検査や腫瘍マーカーとCK-19発現の関連を検討した。

### (3) 腫瘍内CK-19を始めとする蛋白発現（分子マーカー）と再発や生命予後との関連

RFA治療後3ヶ月に1回の造影CTスキャンを行い再発の有無を検討した。また、門脈や肝静脈など脈管浸潤や遠隔転移、および生命予後と分子マーカー発現の関連性を検討した。

## (倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説

明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した（新GCPに遵守）。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

## C. 研究結果

(1) 110結節の腫瘍生検中肝細胞癌7結節でCK-19が陽性であった。腫瘍生検による肝病理所見との対比を検討すると、高分化型肝細胞癌34結節では1例もCK-19陽性例は見られなかった。腫瘍検で中分化型と判定された70結節中、3例(4.2%)にCK-19が陽性であった。CK-19の陽性率は20%程度であった。また、低分化型の肝細胞癌では4結節(6.7%)でCK-19が陽性であり、ほとんどすべての腫瘍細胞が陽性であった。低分化型肝細胞癌の広い間質には陽性所見は認めなかった。

(2) CK-19陽性例と陰性例では、性、年齢、HBあるHBやHCVの肝障害成因、腫瘍径、腫瘍数、Child-Pughの肝予備能には差がみられなかったが、血清αフェトプロテイン値が陽性例で有意に高値であった。しかし、PIVKA IIには差はみられなかった。また術前の血管造影下CTスキャンを含めた画像所見とCK-19の陽性率には差がみられなかった。

(3) RFA治療後の肝内再発率は3ヶ月毎の造影CTスキャンにより評価した。Kaplan-Meier法でCK-19陽性例と陰性例を比較検討したところ、Logrank

testで有意にCK-19陽性例の方が肝内再発率が高かった。しかし、遠隔転移や脈管浸潤では両者に差は認めなかった。低・中分化型肝細胞癌症例の方がCK-19陽性率が高かったため、高分化型と低分化型で肝内再発を比較したが、Logrank testで明らかな差はみられなかった。したがってCK-19は肝細胞癌の病理組織学的分類とは独立の再発予測因子と考えられた。

しかし、生命予後との関連は認められなかった。

#### D. 考察

(1) 肝幹細胞型胆管細胞への分化の過程で出現するCK-19の細胞内発現は、従来胆管細胞癌で高発現することが知られている。今回初回RFA治療を行った肝細胞癌で検討したところ、HE染色で中から低分化と診断された肝細胞癌の一部の例でCK-19の発現が観察された。中分化型の症例ではHE染色の病理組織形態とCK-19の発現の有無には関連はなく、同じ中分化と判定された中にCK-19陽性例が存在すると考えられた。したがって、HE染色では判別できなくても肝細胞癌のなかに胆管上皮由来と考えられるCK-19陽性例は、肝幹由来の可能性が示唆された。

(2) CK-19の発現の有無と症例背景や腫瘍径、腫瘍個数などの腫瘍側因子と肝硬変のChild-Pugh分類には差がみられなかった。しかし、CK-19陽性例では血中AFP値が有意に高かった。CK-19陽性例は病理組織学的に中・低

分化のものが多いため、AFP陽性であることと直接的な因果関係はないものと推定される。むしろ肝幹細胞由来の可能性が高く、血液腫瘍マーカーとして新たなものを検索していく必要があると考えられる。

(3) CK-19の陽性例では治療前の血管造影下CTスキャンを含む画像所見との明らかな関連性は認めなかった。しかし、CK-19陽性例では、RFAによって局所根治が得られても、肝内他部位再発が高い頻度でみられることが判明した。CK-19陽性は、胆管上皮由来であることを示唆しており、腫瘍が肝幹細胞由来である可能性がある。腫瘍の分化度と肝内他部位再発には関連性がなかったため、CK-19陽性は再発の独立危険因子と考えられる。

CK-19陽性が再発予測因子であれば、RFA治療後の早期再発を入念に行う必要がある。今後、血液腫瘍マーカーになりえるか否かや、分子標的治療法の開発に向けて、さらに症例を蓄積して解析する必要があると考えられた。

#### E. 結論

RFA治療を行った早期肝細胞癌症例について、治療前の腫瘍生検でCK-19陽性の症例は肝内再発のリスクが高く、入念な経過観察が必要である。CK-19は腫瘍がどの細胞に起因するかの解析に有用であるだけでなく、肝細胞癌の悪性度評価の分子マーカーや新た



な分子標的治療の開発の一助になりえる。

## 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

1) Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase level are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. *J Hepatol* 2008;48:736-42.

2) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology* 2008; 134:1396-405.

### 2. 学会発表

1) 中西裕之他. 肝細胞癌に対する Realtime virtual sonography (RVS) 下 RFA と Sonazoid 造影超音波下 RFA の有用性の比較検討. 第 44 回日本肝臓学会総会一般演題 2008.

2) 田中智大他. HCC に対する 3D CT による術前シュミレーションを用いたラジオ波焼灼術の戦略. 第 44 回日本肝臓学会総会一般演題. 2008.

3) 土谷薫他. 単発肝癌ラジオ波治療 (RFA) の適応と限界 第 12 回日本肝臓学会大会パネルディスカッション 2008.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働省科学研究費補助金（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

研究分担者 高山 忠利 日本大学医学部 消化器外科 教授

研究要旨：肝細胞造影相でEOBの取り込みのある小型肝癌の検討を行った。

A. 研究目的

EOB MRIの肝細胞造影相において、悪性腫瘍であってもEOBの取り込みが認められる腫瘍が存在することが報告されている。これが何を表しているか病理学的検討が十分ではないため、これを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

肝細胞造影相でEOBの取り込みのある小型肝癌に対して、病理学的検討を行う。病理所見との対比を行い、診断能の向上を目的とする。

（倫理面への配慮）

個人情報について配慮した。

C. 研究結果

今回の検討では病理所見で Sinusoid 拡張、うっ血を認めた。

D. 考察

うっ血のある腫瘍にEOBの取り込みが認められ、従来指摘のあった胆汁産生は認めなかった。Sinusoid 拡張、うっ

血の原因は不明だが、EOB 取り込みの一因である可能性が示唆される。

E. 結論

肝細胞癌でEOB MRIの肝細胞造影相での取り込みは Sinusoid 拡張、うっ血が一因である可能性がある。

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

未発表、症例集積ののち発表予定。

2. 学会発表

未発表、症例集積ののち発表予定。

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  
なし。

厚生労働省科学研究費補助金（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

肝細胞癌患者に対するソナゾイドを用いた肝切除術中造影超音波の  
臨床的有用性の検討

研究分担者 國土 典宏  
東京大学医学部附属病院肝胆膵・移植外科 教授

研究要旨：【目的】肝細胞癌患者に対して新しい第二世代超音波造影剤ソナゾイドを用いた術中造影超音波検査を行い、術前検査で指摘できなかった新たな肝細胞癌を発見する効果について検討した。【方法】76人の肝細胞癌患者に対して術中造影超音波を行なった。ソナゾイド投与後約1分間を早期相とし、15-20分以降をクッパー相と定義した。最終診断は、切除した場合は組織学的検査を、非切除病変は6ヶ月後の造影CTによった。【結果】76人中17人に計17個の術中超音波による新病変が見つかった（肝細胞癌9個）が、術中造影超音波による良悪性の鑑別診断は、感度78%、特異度88%、正診率82%であった。また、76人中3人に計6個のクッパー相新病変が見つかった。【結論】肝細胞癌患者にソナゾイド術中造影超音波を行なうことで、新たな肝細胞癌を過不足なく切除できる。

#### A. 研究目的

肝細胞癌患者では、術中に超音波を行なうことにより約1/3の症例で術前画像では指摘されなかった新病変が発見される<sup>1</sup>が、従来それらの良悪性を鑑別診断する方法は存在しなかった。新しい第二世代超音波造影剤であるソナゾイドには肝クッパー細胞に蓄積する性質を持っており<sup>2</sup>、本来備わっている血流評価への付加価値を期待されている。本研究は肝細胞癌患者に対してソナゾイドを使用した術中造影超音波を行ない、新たな肝細胞癌を発見・切除できる効果を検討する。本研究の結果によっては小さな早期肝癌を術中に診断する方法が開発され

るため、厚生労働行政の課題である「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」に直結するものと考えられる。

#### B. 研究方法

肝細胞癌に対する肝切除を予定されており、文書により同意の得られた連続76人の患者が対象。全身麻酔下に開腹して術中超音波を行い新病変の有無を確認する。続いてソナゾイド0.015ml/kgをボース静注して約1分間ハーモニックモードで対象病変の血流評価を行なう（早期相と定義）。その後観察を中断し、静注後15-20分より全



肝スクリーニングを行ない、低エコー病変をチェックする(クッパー相と定義)。観察対象病変が複数ある場合はソナゾイド再投与による早期相の観察を追加した。

全ての超音波検査はアロカ社の超音波装置「ProSound a10」を使用した。造影、非造影ともに術中超音波には各々専用のマイクロコンベックスプローブを用いた。術中造影超音波はExPHDモード(広帯域ハーモニック)で撮像した。

術中造影超音波において肝細胞癌の診断基準は、「早期相でhypervascular」「クッパー相で低エコー」のいずれかを満たすこととした。肝細胞癌と診断された新病変は安全に考慮して可及的に切除した。各病変の最終診断は、切除した病変については病理結果とし、切除しなかった病変については6ヶ月間の造影CTで行なった。

(倫理面への配慮)

本研究は東京大学医学部附属病院の治験審査委員会において審査を受け、自主臨床試験として承認されており、その際に研究により患者が被る危険性やインフォームドコンセントなど、必要な倫理面について網羅・確認されている。

### C. 研究結果

76人中17人に計17個の術中超音波による新病変が見つかり(径中央値0.8cm)、うち9個が肝細胞癌の最終診断を受けたが、術中造影超音波による良悪性の鑑別診断は、感度78%、特異度88%、正診率82%であった。また、76人中3人に計6個(径中央値1.2cm)の術中造影超音波クッパー相による新病変が見つかり、うち5個が肝細胞癌の

最終診断を受けたので、この病変群に対する正診率は87%となった。

### D. 考察

肝細胞癌患者において、術中超音波での新病変に対するソナゾイド術中造影超音波の正診率は、SonoVueを用いた海外からの報告<sup>3</sup>での正診率とほぼ同等の結果が得られた。腫瘍径が非常に小さなことと、術前画像検査で発見・診断できなかった結節であることを考慮すると十分満足しうる結果であると考えられた。また、術中造影超音波クッパー相で初めて発見された肝細胞癌の出現頻度は臨床的有用性を指示する数値であると考えられた。

### E. 結論

ソナゾイドを用いて術中造影超音波を行なうことで、術前指摘されなかった新たな肝細胞癌を過不足なく切除できる。

### 引用文献

1. Kokudo N, Bandai Y, Imanishi H, et al. Management of new hepatic nodules detected by intraoperative ultrasonography during hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Surgery* 1996; 119(6):634-40.
2. Watanabe R, Matsumura M, Munemasa T, et al. Mechanism of hepatic parenchyma-specific contrast of microbubble-based contrast agent for ultrasonography: microscopic studies in rat liver. *Invest Radiol* 2007; 42(9): 643-51.
3. Torzilli G, Palmisano A, Del Fabbro

D, et al. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography during surgery for hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis: is it useful or useless? A prospective cohort study of our experience. *Ann Surg Oncol* 2007; 14(4): 1347-55.

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

1. Gao FJ, Cui SX, Chen MH, Cheng YN, Sun LR, Ward SG, Kokudo N, Tang W, Qu XJ. Des-gamma-carboxy prothrombin increases the expression of angiogenic factors in human hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci* 2008;83(23-24): 815-820.
2. Ma M, Qu XJ, Mu GY, Chen MH, Cheng YN, Kokudo N, Tang W, Cui SX. Vitamin K(2) Inhibits the Growth of Hepatocellular Carcinoma via Decrease of Des-Gamma-Carboxy Prothrombin. *Chemotherapy* 2008;55(1): 28-35.
3. Zhang W, Tang W, Inagaki Y, Qiu M, Xu HL, Li X, Sugawara Y, Nagawa H, Nakata M, Kokudo N. Positive KL-6 mucin expression combined with decreased membranous beta-catenin expression indicates worse prognosis in colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2008;20(5): 1013-1019.
4. Tamura S, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Systematic grading of morbidity after living donation for liver transplantation. *Gastroenterology* 2008;135(5): 1804.
5. Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Kokudo N, Makuuchi M. Pseudomonas aeruginosa infection after living-donor liver transplantation in adults. *Transpl Infect Dis* 2008.
6. Tamura S, Sugawara Y, Kaneko J, Togashi J, Matsui Y, Yamashiki N, Kokudo N, Makuuchi M. Recurrence of cholestatic liver disease after living donor liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2008;14(33): 5105-5109.
7. Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Matsui Y, Togashi J, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Portal vein complications after adult-to-adult living donor liver transplantation. *Transpl Int* 2008.
8. Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Kokudo N, Omata M, Makuuchi M. Double-dose double-phase use of second generation hepatitis B virus vaccine in patients after living donor liver transplantation: Not an effective measure in transplant recipients. *Hepato Res* 2008.
9. Xiang CH, Zhang W, Inagaki Y, Zhang KM, Nakano Y, Kokudo N, Sugawara Y, Dong JH, Nakata M, Tang W. Measurement of serum and tissue des-gamma-carboxyprothrombin in resectable hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2008;28(4B): 2219-2224.
10. Hashimoto T, Minagawa M, Aoki T, Hasegawa K, Sano K, Imamura H,



- Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Caval invasion by liver tumor is limited. *J Am Coll Surg* 2008;207(3): 383-392.
11. Kishi Y, Sugawara Y, Matsui Y, Akamatsu N, Makuuchi M. Late onset portal vein thrombosis and its risk factors. *Hepatogastroenterology* 2008;55(84): 1008-1009.
12. Shin N, Hasegawa K, Ikeda M, Ishizawa T, Kokudo N, Sugawara Y, Makuuchi M. Adult intussusception induced by the stump of the jejunal loop after liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2008;55(84): 898-899.
13. Hasegawa K, Makuuchi M, Takayama T, Kokudo N, Arii S, Okazaki M, Okita K, Omata M, Kudo M, Kojiro M, Nakanuma Y, Takayasu K, Monden M, Matsuyama Y, Ikai I. Surgical resection vs. percutaneous ablation for hepatocellular carcinoma: a preliminary report of the Japanese nationwide survey. *J Hepatol* 2008;49(4): 589-594.
14. Inagaki Y, Tang W, Xu HL, Guo Q, Mafune K, Konishi T, Nakata M, Sugawara Y, Kokudo N. Localization of N-myc downstream-regulated gene 1 in gastric cancer tissue. *Dig Liver Dis* 2008.
15. Matsui Y, Sugawara Y, Yamashiki N, Kaneko J, Tamura S, Togashi J, Makuuchi M, Kokudo N. Living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Hepatol Res* 2008;38(10): 987-996.
16. Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, Imamura H, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2008;134(7): 1908-1916.
17. Hashimoto T, Miki K, Imamura H, Sano K, Satou S, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Sinusoidal perfusion in the veno-occlusive region of living liver donors evaluated by indocyanine green and near-infrared spectroscopy. *Liver Transpl* 2008;14(6): 872-880.
18. Igaki H, Nakagawa K, Shiraiishi K, Shiina S, Kokudo N, Terahara A, Yamashita H, Sasano N, Omata M, Ohtomo K. Three-dimensional conformal radiotherapy for hepatocellular carcinoma with inferior vena cava invasion. *Jpn J Clin Oncol* 2008;38(6): 438-444.
19. Saiura A, Yamamoto J, Ueno M, Koga R, Seki M, Kokudo N. Long-term survival in patients with locally advanced colon cancer after en bloc pancreaticoduodenectomy and colectomy. *Dis Colon Rectum* 2008;51(10): 1548-1551.
20. Tamura S, Sugawara Y, Kokudo N. Donor evaluation and hepatectomy for living-donor liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2008;15(2): 79-91.
21. Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M. Surgery or ablation for hepatocellular

carcinoma? Ann Surg 2008;247(3): 557-558.

22. Hasegawa K, Kokudo N, Sano K, Seyama Y, Aoki T, Ikeda M, Hashimoto T, Beck Y, Imamura H, Sugawara Y, Makuuchi M. Two-stage pancreatojejunostomy in pancreaticoduodenectomy: a retrospective analysis of short-term results. Am J Surg 2008;196(1): 3-10.

23. Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Yamashiki N, Matsui Y, Togashi J, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Outcome of living donor liver transplantation for post-Kasai biliary atresia in adults. Liver Transpl 2008;14(2): 186-192.

24. Ishizawa T, Kokudo N, Makuuchi M. Right hepatectomy for hepatocellular carcinoma: is the anterior approach superior to the conventional approach? Ann Surg 2008;247(2): 390-391; author reply 391-392.

25. Hasegawa K, Imamura H, Ijichi M, Matsuyama Y, Sano K, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Inclusion of tumor markers improves the correlation of the Milan criteria with vascular invasion and tumor cell differentiation in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver resection (#JGSU-D-07-00462). J Gastrointest Surg 2008;12(5): 858-866.

26. Makuuchi M, Kokudo N, Arii S, Futagawa S, Kaneko S, Kawasaki S, Matsuyama Y, Okazaki M, Okita K,

Omata M, Saida Y, Takayama T, Yamaoka Y. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. Hepatol Res 2008;38(1): 37-51.

## 2. 学会発表

1. 國土典宏 教育講演 安全で正確な肝臓手術に寄与する肝画像診断の進歩と今後の展望 第27回日本画像医学会 2月22日 東京コンファレンスセンター 品川
2. 國土典宏 肝癌外科治療とインターフェロン 第7回 兵庫難治性肝疾患先端治療研究会 3月14日 ホテル阪急インターナショナル
3. Norihiro Kokudo, Masatoshi Makuuchi (Keynote lecture) Evidence-based practice guidelines for hepatocellular carcinoma in Japan: the J-HCC Guidelines 日本消化器病学会雑誌 第105巻 臨時増刊号 A30 第94回日本消化器病学会総会 2008.5.8-10 福岡国際会議場
4. 國土典宏、長谷川潔、高山忠利、幕内雅敏 肝胆膵外科における無作為化比較試験(PCT)の経験 第108回日本外科学会定期学術集会 in 長崎 5月14-16 長崎 (日本外科学会雑誌 109 (2) 第6回臨床研究セミナー 5月16日
5. 國土典宏 特別講演 化学療法の進歩をふまえた肝転移に対する外科治療戦略 第4回転移性肝癌術後補助化学療法研



- 研究会 2008.6月11日 千葉(京成ホテルミラマーレ)
6. 國土典宏 特別講演  
肝切除 基本手技と最近の進歩 第40回兵庫県手術手技研究会 兵庫  
2008.6月10日 生田神社館
  7. 國土典宏 特別講演: 肝切除手技の進歩 第18回 東北肝臓外科研究会 仙台  
2008.6月13日
  8. 國土典宏 特別講演: 肝癌の外科治療-最近の話題- 第11回福島県肝胆膵疾患研究会 2008.6月14日 コラッセ福島
  9. 國土典宏 講演: 肝細胞癌治療とインターフェロン療法 第13回肝癌治療シンポジウム 2008.6月20日 名古屋  
ホテルグランコート名古屋
  10. 國土典宏 特別講演: 肝切除をめぐる最近の話題 第10回山梨消化器外科手術手技研究会 2008.6月21日 山梨  
アピオ甲府
  11. Norihiro Kokudo, Y Sugawara Donor hepatectomy and Recipient's Hepatic Vein Reconstruction for Extended Right lobe Graft The 6th "5Asian Center's Living Donor Liver Transplantation Meeting
  12. Norihiro Kokudo Aggressive Surgery for Liver Tumours International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists (Mumbai) 28th 29th April 2008
  13. 國土典宏 肝腫瘍患者に対するソナゾイドを用いた肝切除術中造影超音波の臨床的有効性の検討 第2回ソナゾイド研究会 2008年7月12日 東京国際フォーラム
  14. 國土典宏 特別企画 今世紀初頭の肝臓外科の動向  
肝道外科の動向 第63回日本消化器外科学会総会 2008年7月16日~18日
  15. 國土典宏 肝癌診療ガイドライン改訂に向けて 外科的治療の位置付け 第63回日本消化器外科学会総会、2008年7月16日
  16. 國土典宏 Surgical treatment comparison between resection and transplantation 第5回 Japan-Korea Liver Symposium(日韓肝疾患シンポジウム) 2008年8月30日 近畿大学(大阪)
  17. 國土典宏 講演: 肝細胞癌治療(移植) 平成20年度 日本肝臓学会後期教育講習会 2008年12月4日 ホテルオークラ東京
  18. 國土典宏、橋本拓哉 多発肝転移に対する拡大肝切除術 日本外科学会雑誌 109(5): 318
  19. 國土典宏、長谷川潔、高山忠利、幕内雅敏 肝胆膵外科における無作為化比較試験(RCT)の経験 第108回日本外科学会定期学術集会 外科臨床研究の実践
  20. Norihiro Kokudo STATE OF THE ART LECTURE  
Ultrasound use in liver surgery and living donor liver transplantation  
EUROPEAN SCHOOL OF SURGICAL ULTRASONOGRAPHY  
2008年10月27日-11月1日  
AUDITORIUM

Istituto Clinico Humanitas - IRCCS  
Via Manzoni 56  
20089 Rozzano, MI - Italy

21. 國土典宏 シンポジウム 12: 肝癌診療  
ガイドラインと臨床最前線 第 50 回日  
本消化器病学会 2008 年 10 月 1 日-4  
日 グランドプリンスホテル新高輪  
国際館パミール グランドプリンスホ  
テル高輪
22. 國土典宏 イブニングセミナー  
E-2 肝胆膵手術の現況と未来 日本  
レーザー医学会  
第 29 回日本レーザー医学会総会  
2008 年 11 月 15 日 東京工科大学八王  
子キャンパス
23. 國土典宏 多発肝転移に対する拡大肝切  
除術 日本外科学会第 74 回卒後教育セ  
ミナー 2008 年 11 月 29 日 ホテルニ  
ューオオタニ東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案取得  
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

研究分担者 稲澤譲治 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝 教授

**研究要旨：** 肝細胞癌臨床検体を対象に、自作 BAC アレイによるゲノムコピー数解析を施行し、集計の終了した肝細胞癌の多くに染色体の短・長腕レベルでのコピー数異常が検出されたが、特に予後不良群においてゲノム全体により高頻度の異常が認められた。また、肝癌細胞株・臨床検体を対象に、CpG island の過剰メチル化と発現を検索することにより、メチル化異常により高頻度に発現が抑制される肝癌抑制性マイクロRNA (miRNA) を同定した。

#### A. 研究目的

年間約 4 万人が死亡している肝疾患は我が国の国民病であり、その多くがウイルス性慢性肝障害を基盤とする肝細胞癌（肝癌）である。肝癌の高危険群が明らかになりつつあるが、適切な治療時期を失った患者も多く、より精緻で効率のよい早期診断法の開発が喫緊の課題である。本研究では、課題のうち、肝癌の細胞株ならびに臨床検体の包括的分子解析に基づく新規早期発見マーカーの開発を含む肝癌関連遺伝子マーカーの同定とその検出法の開発を目的とする。

#### B. 研究方法

**B 1. 肝癌臨床検体におけるゲノム一次構造の解析と臨床・病理学的因子との比較検討：** 肝癌臨床検体 100 例を対象に自作 bacterial artificial chromosome (BAC) アレイ (MCG Cancer Array-800 ならびに MCG Cancer Array-1500) を用

いて、既報の方法に従いアレイ comparative genomic hybridization (CGH) 法を施行し、ゲノム一次構造異常（ゲノムコピー数異常）を評価した。既に術後再発の有無などを含め詳細な臨床病理学的情報が得られている症例については、それらとゲノムコピー数異常との関連について比較検討した。

**B 2. 肝癌において異常メチル化により発現抑制を受ける肝癌抑制マイクロRNA (miRNA) の同定：** 肝癌細胞株を test に非腫瘍部肝組織を reference に用い、近傍に CpG アイランドを有する miRNA を対象にして combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法での癌部特異的 DNA 高メチル化を示す miRNA のスクリーニングを行った。抽出された miRNA について、発現低下細胞株の 5-aza 2'-deoxycytidine (5-aza-dCyd) 処理による発現回復の評価、臨床検体における癌部特異的発現低下とその DNA



メチル化状態との関連を行い、DNAメチル化による発現抑制をうける肝癌抑制miRNAを同定した。

### (倫理面への配慮)

本研究においては、事前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを交わし、標本データの匿名化と孤立化によりプライバシーの完全な保護を図っている。「ヘルシンキ宣言」、「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する指針」その他を遵守し、遺伝子研究に際しては科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守するとともに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日 文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示）及び平成13年3月29日12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿い、倫理委員会の審査を経て実施している。

## C. 研究結果

C1. 肝癌臨床検体におけるゲノム一次構造の解析と臨床・病理学的因子との比較検討： 自作BACアレイ（MCG Cancer Array-800ならびにMCG Cancer Array-1500）により、肝癌臨床検体においてゲノムコピー数変化が検出された（図1A）。ゲノムコピー数異常としては、1q、5p、6p、8q、17qなどにコピー数増加、1p、4p、4q、8p、13q、14q、8q、17pなどにコピー数減少を認めたが、症例によりほとんど異常を認めない腫瘍から著明なコピー数増加・減少を示す腫瘍まで様々であった（図2A）。MCG

Cancer Array-800で解析した症例のうち5年以上経過が追えた19例について、

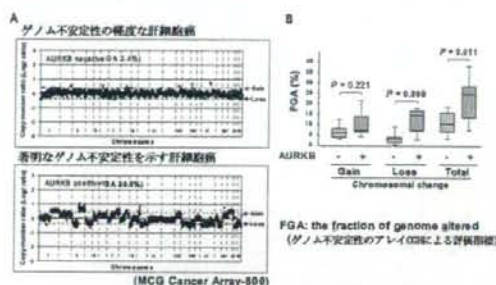


図1. 肝細胞癌におけるゲノム不安定性(FGA)とAURKB発現(予後不良例)の相関

アレイCGHで検出したコピー数異常領域の全ゲノム領域に対する割合を計算しfraction of genome altered (FGA)としてあらわすと、予後不良例でよりゲノムコピー数異常が著明であった。また、予後不良例で発現の高いAurora B (AURKB)とFGAは相関を示し(図1B)、Aurora Bの高発現によりゲノム不安定性が引き起こされることが示唆された(論文発表1)。

## C2. 肝癌において異常メチル化により発現抑制を受ける肝癌抑制マイクロRNA(miRNA)の同定：

肝癌において異常メチル化により発現

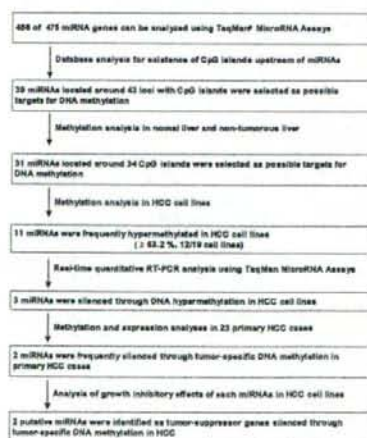


図2. 肝細胞癌における新規メチル化標的miRNA候補の同定