

一般演題

### 3. 非アルコール性脂肪性肝炎による肝硬変から発症した肝細胞癌3症例

森田恭代\*・上野隆登\*\*・田口 順\*・石井邦英\*・安倍弘彦\*・黒松亮子\*\*\*・鳥村拓司\*\*\*・加藤絵美子\*  
野田哲弘\*・立石行生\*・長田英輔\*・中島 収\*\*・鹿毛政義\*\*\*・矢野博久\*\*・佐田通夫\*\*\*

#### はじめに

NASH (非アルコール性脂肪性肝炎)は、組織学的に肝細胞の脂肪化と線維化および実質の壊死・炎症像を認め、飲酒歴がないにも関わらず、アルコール性肝障害に類似した肝組織所見を特徴とする<sup>1),2)</sup>。NASHでは肝硬変へ進展する症例が存在し、肝硬変から肝細胞癌(HCC)が発症したとの報告もある<sup>3)-5)</sup>。

今回、久留米大学とその関連病院において、画像診断で脂肪肝、あるいは肝生検で脂肪性肝炎と診断され、HCCを発症した3例を経験したので報告する(表1)。

#### 症例報告

##### ●【症例1】70歳代前半, 女性

1984年50歳代前半に肝機能異常を指摘され、精査のため肝生検を施行。大小の脂肪滴と小葉内の炎症細胞浸潤、肝細胞の風船化を認め、一部 bridging fibrosis を形成していた。3ヵ月間の食事療法、運動療法にて、BMIは26.3から24に改善し、トランスアミナーゼ、 $\gamma$ GTPも正常域まで改善した。肝生検肝組織では、脂肪滴の沈着は軽減し、炎症細胞浸潤、fibrosisも明らかに改善していた。その後、定期観察を受けず放置され、1999年2月、吐血を主訴に近医に緊急入院となった。出血の原因は Mallory-Weiss 症候群からの出血と診断されたが、その口側にCbF<sub>2</sub>RC+の食道静脈瘤を認めたため、同時に内視鏡的食道静脈瘤硬化療法を施行さ

表1 NASHからの発症を認めたHCC症例

症例	性	年齢	BMI	空腹時血糖 (mg/dl)	HbA <sub>1c</sub> (%)	HOMA-IR	背景肝	HCC
1	女性	70歳代前半	29.1	98	5.8	-	LC	多発
2	女性	50歳代後半	29.9	89	4.2	11.8	LC	多発多中心性
3	女性	70歳代半ば	20.1	137	6.3	11.2	LC	多発多中心性

Case report of hepatocellular cancers : they were developed as a consequence of hepatocirrhosis that was triggered by NASH.

\*MORITA Yasuyo et al 清和会長田病院消化器科 [〒832-0059 福岡県柳川市下宮永町523-1]

\*\*UENO Takanobu 久留米大学先端癌治療研究センター

\*\*\*KUROMATSHU Ryoko et al 久留米大学内科学講座消化器内科部門

# TAGUCHI Jun et al 朝倉医師会病院消化器科

## NAKASHIMA Osamu et al 久留米大学病理学教室

### KAGE Masayoshi 久留米大学病院病理部

れた。血液生化学検査では血小板、白血球数の減少、アルブミンの低下など肝硬変の所見を示していた。2000年7月のCTでは、肝表面の凸凹不整と内部の結節がより明瞭となり、肝硬変の所見を認め、この時点のBMIは29.1と1984年よりさらに増加していた。2003年の腹部CTでS4に動脈相で造影効果を認め、静脈相でwash outされる一塊となった占拠性病変を認め、S7にも直径7mmのHCCを疑うSOLを認めた。PIVKA IIも984と上昇していたことからHCCと診断した。しかし、この症例は宗教上の理由から侵襲的な検査および治療を拒否された為、病理診断や治療は行えず、翌年2月に死亡された。初回炎症と肝線維化を伴った脂肪肝の診断がなされてから19年でHCCの発症を認めた1例である。

#### ●【症例2】50歳代後半、女性

1997年50歳代半ばに全身倦怠感と肝機能異常を指摘されたが放置。2000年に全身倦怠感が増強したため受診され、血液生化学検査および画像所見での非B非C非アルコール性の肝硬変と診断された。以後外来で経過観察されていたが、2002年2月腹部膨満感と黄疸が出現し入院となる。BMIが30.3で、眼球黄染と腹水、下肢浮腫を認めた。血液生化学検査では黄疸と肝機能異常、血小板、プロトロビン時間(PT)の低下を認めた。空腹時血糖、HbA<sub>1c</sub>は正常であったが、空腹時インスリン値は54でHOMA-IRは11と高値であった。

腹部超音波検査および腹部CTでは、著明な肝萎縮がみられ肝硬変の所見を呈し、全体的に高エコーを示し、脂肪肝の存在が示唆された。肝庇護剤、アルブミン製剤等の投与を行ったが、徐々に肝機能は悪化し、肝不全および腎不全状態となり、入院後約1ヵ月で死亡した。初めて肝機能異常を指摘されて5年後、肝硬変の診断から2年の経過であった。

病理解剖所見では、肝表面に著明な萎縮、S8に直径9×8mmの結節を認め、肉眼的に被膜を有し、内部には隔壁様の線維化を認めた。S4にも5×4mm、緑色調で皮膜形成のない結節を認めた。S8

の結節は類円形、多形性の核、好酸性の胞体を有する癌細胞が索状に増殖するとともに血洞に沿って著明な線維化を認め、中分化型硬化型HCCと診断した。一部の癌細胞の胞体にMallory-Denk bodyを認めた。また、S8の硬化型HCCの辺縁には高分化型HCCを認めた。S4の結節は異型に乏しい癌細胞が不規則な索状構造を呈し、一部に偽腺管構造を認める高分化型HCCであった。背景肝組織は脂肪滴の沈着と肝細胞の風船化、炎症細胞浸潤、核の空砲化、lipogranuloma、Mallory-Denk bodyを認め、また偽小葉を形成していた。

原因不明の肝硬変で経過観察され、死後の病理解剖により初めてNASHによる肝硬変と診断され、多中心性発生と考えられる2個の肝癌結節を認めた症例である<sup>6)</sup>。

#### ●【症例3】70歳代半ば、女性。

1979年50歳代前半に検診で肝機能異常を指摘されたが、症状なく放置していた。1993年に肝機能異常を指摘され、肝炎ウイルスマーカー、抗核抗体は陰性で、糖尿病の既往、アルコール歴はなく、肝生検の結果、bridging fibrosisを認め、切片の約60~70%に脂肪化を認めた。その後、定期的に経過観察されていたが、2004年7月の腹部超音波検査でS8、S6に肝内占拠性病変を指摘され、精査目的にて入院となった。

トランスアミナーゼは、AST 78、ALT 73と上昇しており、血小板7.8万、PT85%、アルブミン4.6g/dl、ICG15分値18.9%で肝硬変Child Aの状態であった。血糖値は正常範囲であったがHOMA-IRは11.2と高くインスリン抵抗性を認めた。AFP、PIVKA-IIともに上昇していた。

腹部超音波検査では、肝S8に21×18mm大の、S6に9×9mmの低エコーの結節を認め、いずれもCO<sub>2</sub>-USでenhanceされた。Angio-CTでは、S8、S6のSOLはCT-APでperfusion defect、CT-Aでenhanceされた。腹部血管造影では、S8に腫瘍濃染像を認めたが、S6には腫瘍濃染像は認めなかった。以上の結果よりHCCが最も疑われた。

2004年9月の肝生検では、背景肝は小葉改変を

認め、小葉内にリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤、肝細胞の風船化が認められ、脂肪性肝炎の診断であった。S8腫瘍部は厚い索状構造で、腫瘍細胞は好酸性の胞体に腫大し濃染した核を有し、中分化型HCCと診断された。S6腫瘍部は、非腫瘍部と比較して細胞密度の増加が認められ、細索状配列を呈しており、高分化型HCCと診断した。以上の検査結果から、非アルコール性脂肪性肝炎による肝硬変から発生したStage IIのHCCと診断し、経皮的RFA（ラジオ波熱凝固療法）を行った。

NASHと診断され約10年の経過観察中に、多中心性発生と考えられる多発HCCが発症した一例である。

## 考 察

NASHは単なる脂肪肝と異なり、進行性であるが、診断に肝生検が必要であること、血清学的な診断マーカーが確立されていないことや、脂肪肝との違いに対する認識の不徹底などから早期診断が困難で、初回肝生検時に肝硬変であることもある<sup>3), 5), 6)</sup>。さらにNASH肝硬変からHCCの報告例も増えてきている。PowelらはNASH患者の2.4～13%にHCCを認めると報告しており、高度肥満や糖尿病が危険因子であるといわれている<sup>3)</sup>。表1に示すように今回の3症例は閉経後の中高齢女性であったが、これまでの報告ではNASH関連HCC症例での性差は明らかではない。NASH関連HCCの性差や背景に関する本邦における報告を見ると、Hashimotoらは、HCCを併発したNASHの15例のうち女性が7例、56歳から89歳(平均65.4歳)で、7例が肝硬変を呈していたことなどから、発症例は男女差なく、高齢で線維化が進行していることが特徴であると報告している<sup>7)</sup>。Takamatsuらは3例(男性2例、女性1例)のNASH関連HCC症例のうち2例が糖尿病、高脂血症を伴い、3例ともにstage III, IVに進展した例であったと報告している<sup>8)</sup>。また、YatsujiらはNASH肝硬変患者における5年間のHCC発生率は11.3%であり、男女差はなく、平均年齢は70～71歳で、HCC患者ではHCCを認めない

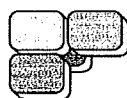
患者よりも糖尿病の合併頻度が高かったと述べている<sup>9)</sup>。HashizumeらはNASH関連HCCの10症例をretrospectiveに検討して、6例が肝硬変を背景としていたと報告し、8例が肥満を、9例が高脂血症、8例が糖尿病を合併していた<sup>10)</sup>。今回の3症例においても2例で肥満を認め、1例に糖尿病、2例にインスリン抵抗性を認めた。背景肝はともに肝硬変であり、線維化が進行し肝硬変へ移行したことがHCC発生に関与していると考えられた。

前述のHashizumeらは、NASH関連HCCの10症例中3例が多発であったと報告し、Maedaらは外科的切除標本において3例のNASH関連HCC症例を報告し、全例単発であるが、2例は中分化型HCCで、1例は辺縁に高分化型HCCを中心に中分化型HCCを示したと報告している<sup>11)</sup>。今回のわれわれの症例では、HCCは全例多発で、2例は多中心性発生例であった。NASHでもウイルス性肝炎と同様に多段階的に癌の脱分化が生じる可能性があることを示唆しており、NASHによる発癌を考えるにあたり貴重な症例と考えられた。

今後、肥満患者や糖尿病患者の増加に伴いNASHが増え、その一部は肝硬変へと進展する例もあることを認識し、高齢で進展した症例ではHCCの発症の可能性も十分あることを考えながら診療する必要がある。

文 献

- 1) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB *et al* : Nonalcoholic steatohepatitis. *Mayo Clin Proc* **5** : 434-438, 1980.
- 2) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T *et al* : Nonalcoholic Fatty liver disease : A spectrum of Clinical and pathological severity. *Gastroenterology* **116** : 1413-1419, 1999.
- 3) Powel EE, Cooksly WG, Hanson R *et al* : The natural history of nonalcoholic steatohepatitis : a follow -up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* **11** : 74-8, 1990.
- 4) Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH : Nonalcoholic steatohepatitis : Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatoogy* **37** : 1202-1219, 2003.
- 5) Saas DA, Change P, Choppa HB : Nonalcoholic fatty liver disease : A clinical review. *Dig Dis Sci* **50** : 171-180, 2005.
- 6) 田口順, 石井邦英, 梶原雅彦, 井上欣哉, 古賀裕之, 齊藤俊昭, 安倍弘彦, 中島収, 神代正道, 佐田通夫 : NASH (非アルコール性脂肪性肝炎) による肝硬変に他中心性発生したと考えられる肝細胞癌の1剖検例. *肝臓* **44** (11) : 559-564; 2003.
- 7) Hashimoto E, Yatsuji S, Kaneda H, Yoshioka Y, Taniai M, Tokushige K, Shiratori K : The characteristics and natural history of Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* **33** (2) : 72-6, 2005.
- 8) Takamatu S, noguchi N, Kudoh A, Nakamura N, Kawamura T, Teramoto K, Igari T, Arii S : Influence of risk factor for metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease on the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* **55** : 609-614, 2008.
- 9) Yatsuji S, Hashimoto E, Tobari M, Taniai M, Tokushige K, Shiratori K : Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol Hepatol* **24** : 248-254, 2009.
- 10) Hashizume H, Sato K, Takagi H, Hirokawa T, Kojima A, Sohara N, Kakizaki S, Mochida Y, Shimura T, Sunose Y, Ohwada S, Mori M : *European J of Gastroenterology and Hepatology* **19** (10) : 827-834, 2007.
- 11) Maeda T, Hashimoto K, Kihara Y, Ikegami T, Ishida T, Aimitsu S, Fujiwara M : Surgically resected hepatocellular carcinomas in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepato-Gastroenterology* **55** : 1404-1406, 2008.



症例報告

## 腫瘍減量術後の動注化学療法および全身化学療法により 著効を得た巨大肝細胞癌の1例

板野 哲<sup>\*1</sup> 久富順次郎<sup>\*1</sup> 永松 洋明<sup>\*2</sup> 有松 秀敏<sup>\*1</sup>  
奥田 康司<sup>\*3</sup> 佐田 通夫<sup>\*4</sup>

### Excellent response in a case of huge hepatocellular carcinoma, treated by hepatic arterial infusion and systemic chemotherapy consisting of cisplatin and 5-FU after cytoreductive surgery

Satoshi Itano<sup>\*1</sup>, Junjiro Hisatomi<sup>\*1</sup>, Hiroaki Nagamatsu<sup>\*2</sup>, Hidetoshi Arimatsu<sup>\*1</sup>, Koji Okuda<sup>\*3</sup> and Michio Sata

<sup>\*1</sup>Kurume Chuo Hospital, Kurume, Japan, <sup>\*2</sup>Dept. of Medicine, Yame General Hospital, Yame, Japan, <sup>\*3</sup>Dept. of Surgery, <sup>\*4</sup>Dept. of Gastroenterology, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

**Summary :** This report describes our therapeutic experience of a case of highly advanced hepatocellular carcinoma (HCC). The patient was a 66-year-old woman with hepatitis type C. At first admission in May 2003, she had a huge HCC, 13 cm in diameter, in the right lobe of the liver with small satellite HCCs around the main tumor and lung metastases. In July 2003, cytoreduction surgery for the main tumor was performed as a pre-treatment of chemotherapy following the surgical operation, because of the treatment results from hepatic arterial infusion chemotherapy for large and massive HCC in our institute. 47 days after the surgery, hepatic arterial infusion chemotherapy via a reservoir system using CDDP + 5-FU (low-dose FP) started. Hepatic arterial infusion chemotherapy from August 2003 to February 2004, and then from March to November in 2004 systemic chemotherapy had been performed. Chemotherapy achieved excellent response. In November 2004, disappearance of liver tumors and lung metastases was recognized by CT scan. The patient has survived without recurrence for more than 5 years and 9 months after the first diagnosis. It is considered that this experience revealed usefulness of the combination of cytoreductive surgery and chemotherapy, especially using CDDP + 5-FU, for advanced large HCC.

**Key words :** hepatocellular carcinoma, cytoreductive surgery, low-dose FP, arterial infusion chemotherapy, systemic chemotherapy

[*Liver Cancer* 15(1) : 109-114, 2009]

\*1 久留米中央病院

\*2 公立八女総合病院・内科

\*3 久留米大学医学部・外科

\*4 同 消化器内科

受理：2009年2月19日，採用：2009年3月6日

はじめに

肝臓は沈黙の臓器と呼ばれるように知覚神経が乏しいため、健診医療の進歩した現在でも直径10 cm超の巨大結節を有する進行肝細胞癌 (hepatocel-

lular carcinoma : HCC)として発見される症例が経験される。われわれは1997年以降, 切除不能HCCに対し, 肝動脈リザーバーを用いた low-dose FP 動注化学療法(LFP)を第一レジメンとして良好な成績をあげてきた<sup>1,2)</sup>。しかし, 腫瘍占拠率の高い塊状型や巨大HCCにはLFPも奏効性に乏しいため<sup>3,4)</sup>, 巨大結節に対しては化学療法と併用して腫瘍減量が必要と考えてきた。今回われわれは肺転移と肝内転移を伴い, 最大腫瘍径が13 cmに及んだHCCに対し腫瘍減量を目的とした姑息的肝切除術を施行し, 術後にシスプラチンと5-FUによる肝動注化学療法(肝動注)および全身性化学療法を用いて, 完全緩解を得ることができた1例を経験したので報告する。

### I. 症 例

患者: 66歳, 女性。

主訴: 右季肋部痛。

既往歴: 特記事項なし。

家族歴: 特記事項なし。

現病歴: 生来健康であったが, 1993年に近医で肝機能異常を指摘されたが放置していた。2003年4月に右季肋部痛を自覚し, 近医を受診したところC型肝炎と巨大な肝内占拠性病変を指摘されたため, 5月に久留米大学消化器内科(当時第二内科)へ入院となった。

入院時検査成績(Table 1): トランスアミナーゼの上昇などの肝機能障害を認めるも, Child-Pugh scoreは6点であり, 肝予備能の保たれた代償期のC型肝炎であった。AFP 107,767 ng/ml, PIVKA-II 28,408 mAU/mlとHCCの腫瘍マーカーが著しい高値を呈していた。

入院時CT: 腹部造影CT(後期相)では, 肝右葉全体に及ぶ最大腫瘍径13 cmの巨大結節と主結節周囲の肝内転移を認め, 門脈は右一分枝より腫瘍のため消失していた(Fig. 1)。胸部単純CTでは右下肺野に肺転移巣と考えられる複数の小粒状陰影を認めた。

治療経過: 以上の入院時検査により, C型肝炎に合併した肺転移併存 Stage IVBの進行HCCと診断した。根治的肝切除が不可能な状況であるため, 入院当初は肝動脈リザーバーによるLFPを第

Table 1 Laboratory data on admission

Hematology		Blood chemistry	
WBC	$3.2 \times 10^3/\mu\text{l}$	T-Bil	1.2 mg/dl
RBC	$4.47 \times 10^6/\mu\text{l}$	D-Bil	0.4 mg/dl
Hb	14.0 g/dl	AST	110 IU/l
Plt	$13.2 \times 10^4/\mu\text{l}$	ALT	97 IU/l
		ALP	255 IU/l
Coagulation		$\gamma$ -GT	123 IU/l
PT	76%	TP	7.9 g/dl
Tumor markers		Alb	3.9 g/dl
AFP	107,767 ng/ml	BUN	14.7 mg/dl
PIVKA-II	28,408 mAU/ml	Cr	1.1 mg/dl

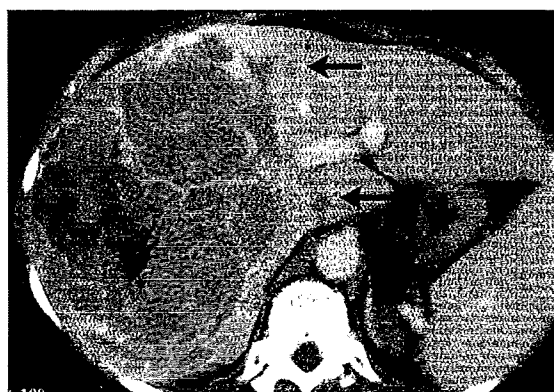


Fig. 1 Late phase enhanced abdominal CT scan shows a huge tumor in the right lobe of the liver with satellite lesions (arrows).

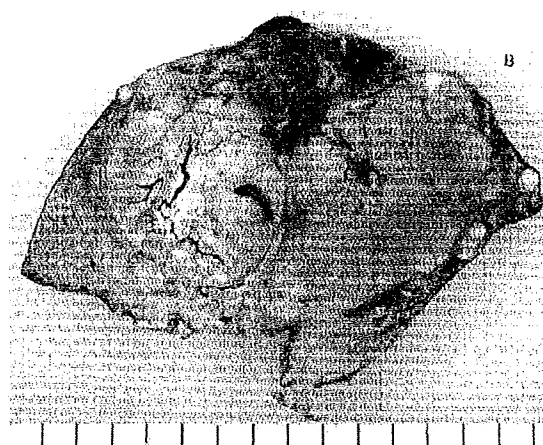


Fig. 2 Cut surface of the tumor. Moderate differentiated HCC, 13 × 12 cm in diameter.

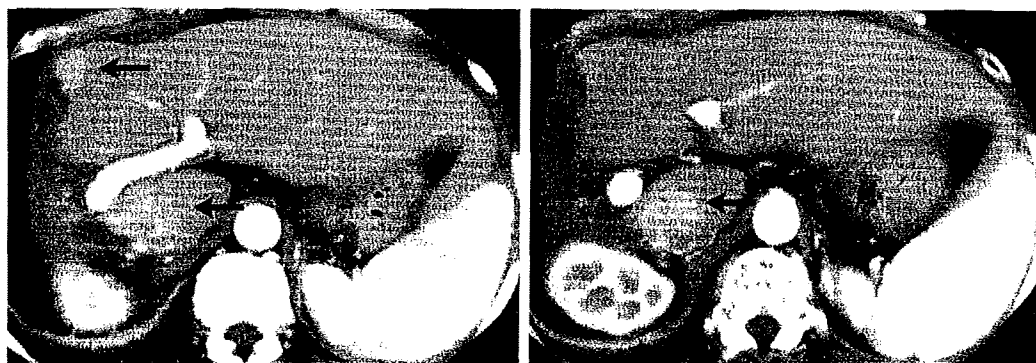


Fig. 3 Early phase enhanced abdominal CTs scan shows two enhanced tumors in S1 and S4 of the liver (arrows).

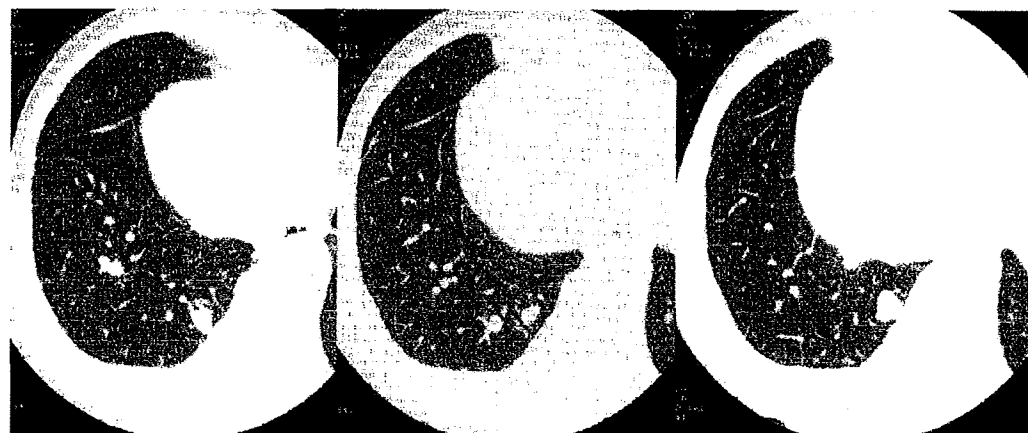


Fig. 4 Chest CTs shows metastatic tumors in the right lung.

一選択とする予定であった。しかし、われわれの施設による肝動注の retrospective study では LFP ばかりでなく、エピルビシンやマイトマイシン C を用いたレジメンも腫瘍占拠率の高い巨大 HCC では効果に乏しく<sup>3,4)</sup>、また本患者の performance status (PS) や肝予備能が良好であったため、外科医と検討した結果、術後早期の化学療法導入を前提とした腫瘍減量術を行うこととなった。2003年7月に肝拡大右葉切除が施行された。切除標本は周囲に複数の satellite lesions を伴う 13×12×12 cm の巨大結節であり、内部には出血壊死とともに大小複数の結節が集簇する中分化型 HCC であった (Fig. 2)。

全身状態の回復を待って、術後 43 日目に胸部 CT と腹部 CT を撮像した。腹部 CT (早期相) では残存肝の S1 に径 30 mm、切除断端である S4 に径 10 mm の腫瘍濃染像を認め、S1 の腫瘍は術前の

CT と比べ著明に増大していた (Fig. 3)。胸部単純 CT では術前と同様に複数の転移巣を右下肺野に認めた (Fig. 4)。この時点で AFP 10,878 ng/ml であり、術前より著減していたものの依然高値であった。

CT 所見から肺転移巣よりも肝病巣の増大が顕著であり、予後因子と考えられたため術後化学療法には肝動注化学療法を選択した。左上腕動脈より血管造影下に皮下埋込み式肝動脈リザーバーを設置し (Fig. 5)、その 2 日後からリザーバーを介してシスプラチンと 5-FU を用いた LFP を開始した。

Fig. 6 に本症例の初診時からの経過と AFP の変化を示す。入院中に計 15 回 (4 週間) の LFP を施行し、AFP が 10,878 ng/ml から 1,749 ng/ml に低下したため、引き続き外来通院で LFP を 2 週に 1 回のペースで施行した。

治療経過は良好であったが、2004年2月に肝動

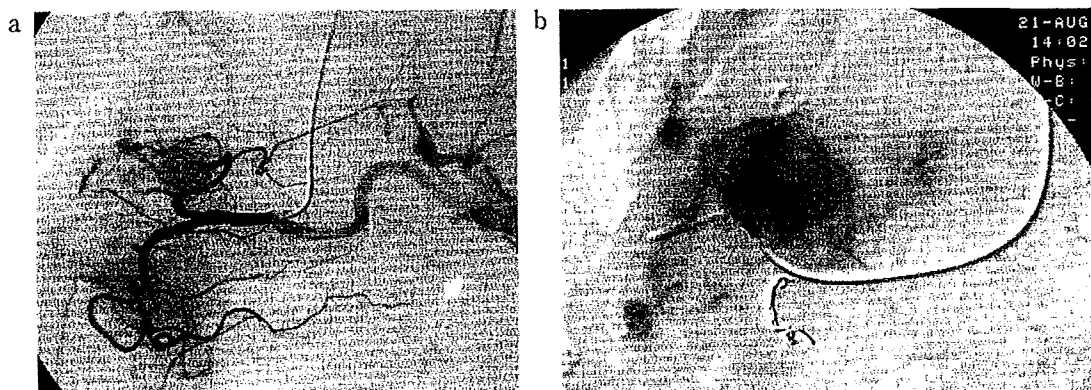


Fig. 5 a : DSA from common hepatic artery shows tumor stains in the liver.  
b : DSA via the reservoir system.

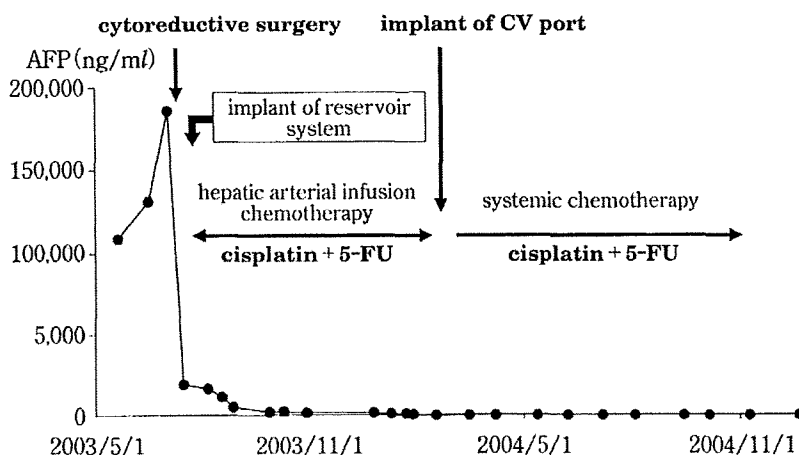


Fig. 6 Clinical course.

脈閉塞を認め肝動注は続行不能となった。この時点で AFP は 170 ng/ml とさらに低下していたが、依然陽性であった。

肝動注の良好な経過から本症例の HCC が LFP に強い感受性を有すると考えられたため、3月に肝動脈リザーバーを抜去すると同時に中心静脈リザーバーを左鎖骨下静脈から設置し、シスプラチンと 5-FU を組み合わせた全身化学療法を開始した。シスプラチン 20 mg/60分→ 5-FU 1,250 mg/72 時間(携帯用ポンプ使用)を中心静脈リザーバーから 2週に 1 回投与するという内容で化学療法を継続した。2004 年 11 月には AFP が 12.7 ng/ml まで低下し、画像上も完全緩解と判断されたため治療終了とした。

2005 年 7 月(治療終了 8 か月後)の CT を示す。

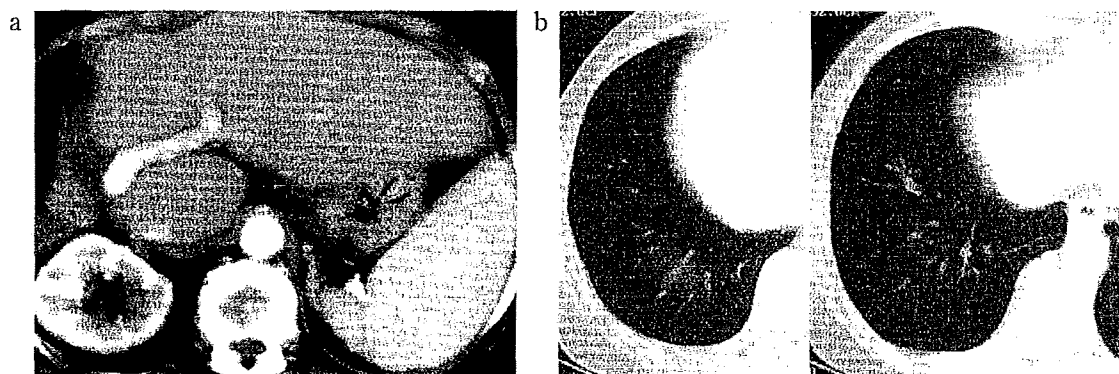
Fig. 7a は腹部 CT の後期相, Fig. 7b は胸部単純 CT であるが、ともに再発を認めず完全緩解を維持していた。

2007 年 2 月に血小板数の増加を目的とした脾臓摘出を行い、2008 年 1 月より C 型肝炎治療目的のインターフェロン(interferon : IFN) 治療を開始した。初診より 5 年 9 か月経過した 2009 年 1 月現在も外来通院中である。

## II. 考 察

われわれが 1997 年以降用いている LFP はインターフェロン + 5-FU 療法<sup>5)</sup>と並び、わが国の進行 HCC に対する肝動注の代表的レジメンであるが、巨大 HCC の症例には奏効性が得られていない。われわれが 2005 年に報告した切除不能 HCC に対す





**Fig. 7** a : Late phase enhanced abdominal CT scan.  
 b : Chest CT scan.  
 Both CT scans, 8 months after the end of chemotherapy, showed disappearance of tumors.

るLFPの検討によると<sup>4)</sup>, 362例の奏効率は58.6%, 平均生存期間は22.3か月であったが, 腫瘍占拠率が30%を超える131症例では奏効率42.7%, 平均生存期間10.4か月であり, さらに最大腫瘍径が8cmを超える巨大HCCでは初期治療効果が1/13(奏効率7.7%)と不良であった。

この結果から, リザーバー肝動注は複数の肝内転移巣が両葉に広がる多結節性HCCや門脈腫瘍栓が主体となった浸潤型HCCには第一選択の有効な治療であるが, 巨大結節の場合には肝動注と併用もしくは先行した主腫瘍減量が必要と考えてきた。

本症例のような径10cm超の巨大結節を示すStage IVのHCCに標準治療はなく, 主腫瘍の減量方法についても一定のエビデンスは存在しない。しかし, あえて腫瘍減量法をあげるとすれば, 血管造影手技を用いた肝動脈化学塞栓術(transcatheter arterial chemoembolization: TACE), 放射線治療(特に粒子線照射), そして本症例のような姑息的肝切除が考えられる。いずれの方法を選択した場合にも, 長期予後を得るためには遺残癌結節に対する化学療法を早期に導入する必要があるため, 腫瘍減量法の選択は患者の全身状態や肝予備能の維持を念頭におかなくてはならない。

数回のTACEで巨大結節の腫瘍減量を行う場合は, TACE後に生じる発熱や骨髄抑制, 反応性の臓器障害などの合併症が問題点である。われわれは大動脈留置型特殊リザーバー(System-I)<sup>6,7)</sup>を用い, 2000年以降10例の巨大HCC(径10cm以上)に対

して頻回分割TACEを行ったが, 主腫瘍が縮小し肝動注を導入し得たのは6例であった。頻回分割TACEとは小範囲の選択的TACEを可能なかぎり繰り返し, 安全に巨大結節を縮小させることを目的とした手技であるが<sup>8)</sup>, 4例は反復するTACE後の発熱でPSが低下し, 肝動注まで持ち込むことができなかった。

TACEは径5cmまでのHCCであれば, 区域動脈より末梢にカテーテルを挿入する選択的TACEで16~26%の5年生存率が得られると報告されているが<sup>8,9)</sup>, 巨大結節の腫瘍減量については患者の全身状態や背景肝機能を十分考慮する必要がある。

放射線治療については, 近年限局性肝癌に対する陽子線や炭素線を用いた粒子線治療の報告が散見されるようになった<sup>10)</sup>。2005年に報告された千葉大学の炭素イオン線を用いたHCCに対する臨床試験では<sup>11)</sup>, 47病変(平均腫瘍径3.9cm, 1.2~7.5cm)で5年制御率は96%であり, 巨大結節の腫瘍減量に有望な結果であった。しかし, 現時点ではわが国で粒子線治療が可能な施設はまだ5施設であり, 高額な自費負担が必要であるため, 今のところ一般的治療とはいえない。

腫瘍減量を目的とした姑息的な主腫瘍切除は, 遺残癌に対する化学療法が奏効しなければ予後の改善は期待できない。佐々木らは径10cm以上の巨大HCCの切除を行った場合, 姑息的切除は根治的切除に比べ有意に予後不良であると述べた<sup>12)</sup>。しかし, 奏効率が60%に近いLFPの導入を前提と

するのであれば、主腫瘍切除による cytoreduction は効果的と思われる。

緒方らは、明らかな肝内転移を有する主腫瘍径 30 mm 以上の肝癌症例に、主腫瘍切除のみを施行した後 LFP を導入した 17 例で奏効率 64.7%、5 年生存率 34.8% と良好であったと報告している<sup>13)</sup>。巨大 HCC に肝動注が有効でない理由は腫瘍量が多いことばかりではなく、脱分化により数種類の癌細胞が主結節内に存在することもあげられるが、巨大な主結節を切除し得た場合、遺残癌は肝内転移の場合が多く、均一な性質をもつと思われるため LFP のよい適応となる。肝内での腫瘍の局在や脈管侵襲の程度および患者背景が主腫瘍切除の適応であれば、自験例のような LFP 導入を前提とした腫瘍減量術は巨大 HCC を長期生存に導く有効な治療選択の一つと考える。

自験例のような肺転移を合併した Stage IVB の HCC 症例に肝動注を用いた点であるが、LFP で用いられるシスプラチンは肝動注による肝吸着性が極端に低い抗癌剤であり、そのほとんどが末梢血中に spill over されることはわれわれの以前の研究で明らかである<sup>2)</sup>。肝動注のみの LFP で肺転移巣が消失した Stage IVB の HCC は現在までに自験例を含め 6 例であるが、これは spill over したシスプラチンが肺転移巣に有効であったと考えている。これらの経験からわれわれは Stage IVB であっても、肝病巣が予後因子と考えられる場合には肝動脈リザーバーからの LFP を first-line としている。ただし本症例は second-line で導入されたシスプラチン + 5-FU の全身性投与で完全緩解となっており、全身投与を first-line としても有効であったと考えられる。

#### おわりに

今回われわれは肺転移と肝内転移を伴い、最大腫瘍径が 13 cm に及んだ HCC に対し腫瘍減量を目的とした姑息的肝切除術を施行、術後にシスプラチンと 5-FU による肝動注化学療法および全身性化学療法を用いて完全緩解を得ることができた 1 例を経験したので報告した。

#### 文 献

- 1) 板野 哲, 佐田通夫: 持続的動注化学療法. 消化器外科 **24**: 721-727, 2001.
- 2) 永松洋明, 板野 哲, 佐田通夫: Low dose FP(5FU + CDDP) 肝動注化学療法. 日本臨床 **59**(6): 619-623, 2001.
- 3) 板野 哲, 佐田通夫: 進行肝細胞癌における肝動注化学療法のレジメン別検討. 消化器科 **42**: 362-369, 2006.
- 4) 板野 哲, 佐田通夫: Low dose FP 肝動注化学療法を導入治療とした進行肝細胞癌 362 例についての検討. 肝臓 **46**(Suppl. 3): A499, 2005.
- 5) Sakon M, Nagano H, Dono K, et al: Combined intraarterial 5-fluorouracil and subcutaneous interferon-alpha therapy for advanced hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the major portal branches. *Cancer* **94**(2): 435-442, 2002.
- 6) 板野 哲, 久富順次郎, 永松洋明・他: System-I を用いた肝細胞癌の治療. *Radiol. Front.* **10**: 83-87, 2006.
- 7) 吉田道弘, 奥村文浩, 板野 哲・他: 大動脈留置型特殊リザーバー(System-I)を用いた肝動注化学療法が有用であった転位右肝動脈を有する進行肝細胞癌の 1 例. 肝臓 **49**(11): 512-519, 2008.
- 8) Hatanaka Y, Yamashita Y, Takahashi M, et al: Unresectable hepatocellular carcinoma: analysis of prognostic factors in transcatheter management. *Radiology* **195**: 747-752, 1995.
- 9) Takayasu K, Arii S, Ikai I, et al: Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. *Gastroenterology* **131**: 461-469, 2006.
- 10) Bush DA, Hillebrand DJ, Slater JM, et al: High-dose proton beam radiotherapy of hepatocellular carcinoma: preliminary results of a phase II trial. *Gastroenterology* **127**: S189-S193, 2004.
- 11) Kawashima M, Furuse J, Nishio T, et al: Phase II study of radiotherapy employing proton beam for hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **23**: 1839-1846, 2005.
- 12) 佐々木洋, 山田晃正, 後藤邦仁・他: 進行肝細胞癌の外科治療. 肝胆臓 **53**(5): 819-829, 2006.
- 13) 緒方俊郎, 奥田康司, 田中秀一郎・他: 進行肝細胞癌減量手術における補助療法としての Cisplatin, 5-fluorouracil 少量持続肝動注の有用性. 癌と化学療法 **24**(12): 1661-1664, 1997.

## [質疑応答]

## — 病理コメント —

姑息的に切除されたHCCは肝細胞索の肥厚、偽腺管構造をとる典型的な中分化型HCCであった。標本上は viable な腫瘍組織が多く、しかも satellite lesion や門脈内腫瘍栓を伴っていた。切除検体で径13cmと著明な大きさの腫瘍であったが、切除と化学療法の複合的な治療により、6年間にわたり生存が得られているのは驚異的でさえある。病理学的に本腫瘍はHCCとしては典型的な組織像であるが、切除標本の検索で化学療法が有効であるか否かを予測することは現段階では不明である。

(福島 純一)

## [質疑応答]

草野(昭和大学)：大変すばらしい成績です。

われわれ外科医はこういう reduction surgery はやるべきだと考えていますが、オンコロジカルにはこの考え方はなかなか受け入れられません。演者に質問ですが、一つ目は肺転移があっても手術を行うのかということ、二つ目は転移性肝癌でもこういった reduction surgery の経験があるのかどうか、教えて下さい。

演者(板野)：まず一つ目については、これは肺転移があっても手術を行っています。実は家族に話して手術の予定を決めた時には肺転移があることはわかっていませんでした。手術直前のCTで肺転移が見つかり、腫瘍の大きさから考えて予後因子はやはり肝臓でしょうから、腫瘍減量を先行させることに対して、この時異論はできませんでした。

ただ、私は過去にも何例か報告していますが、low-dose FP 療法というのは初回導入時には肺転移が併存した Stage IVB の症例でも、実は40% ぐらいは肺転移がPR以下になります。それは私が以前調べたのですが、肝動注を行っても、シスプラチンはほとんど末梢血に spill over されますので、シスプラチンが著効する癌は肺転移もほぼ同時に効果がでると考えています。そういう意味でも肝動注を行ったわけです。

この症例は非常に感受性が高かったので、手術後の化学療法に全身化学療法を選択してもよかったのかもしれない。

二つ目の転移性肝癌については、metastasis で巨大結節を手術して化学療法に持ち込んだ症例は2例ほどあります。metastasis のほうが背景肝の状況がよいので手術も行いやすいです。

ただ、metastasis のほうが成績はよくなく、その2例はあまりよくありませんでした。他の肺転移や肋骨転移までできて、両方とも1年ぐらいで亡くなったような記憶があります。

鶴崎(国立がんセンター中央病院)：今の発言に関連して、演者はlow-dose FPの動注全身化学療法の経験が最も多いと思いますが、肺転移がある場合に動注をされた場合肺転移が小さくなる率は40%といわれましたね。ということは、その40%を狙って、最初は動注を導入されるのがほとんどのケースですか。当然、肺の病変と肝臓の病変の大きさの問題もあると思いますが、いかがでしょうか。

演者：そうです。肝臓つまり原発巣と肺転移の状況の比較で、しかしほとんどの場合予後因子は肝臓でしょうから、動注を導入するケースがほとんどです。

鶴崎：ほとんどの場合は肝臓が大きく、肺は小さいので予後に関係ないという感じです。結局それは全身化学療法でlow-dose FPでも、動注でlow-dose FPでも、肺転移に関しては奏効率はそれほど変わらないということですか。

演者：肝臓にStage III以上の進行癌があって、肺転移が併存している症例がすべて対象になります。しかし、そういう症例にシスプラチン+5-FUの全身化学療法から導入した経験がありませんので、実は何ともいえません。

動注を行ってもものすごく効いて、肺転移も消えたという症例は、本当はシステミックでやっても消え

たのかもわかりません。

鶴崎：システミックで肝腫瘍が消えた経験がないので、やはり動注を最初にもってくるのがよいのかなという感じはしますが、いかがでしょうか。

演者：やはり vascularity の問題と成長の速度の問題から、肝臓のなかの原発や IM は動注でないといけないと思います。肺転移はシステミックでも消えるかもしれません。

峯(東海大学)：非常に効果があった症例だと思います。臨床的には sensitivity が高いということは証明されていると思いますが、細胞レベルで sensitivity はみられたのですか。

演者：みておりません。

峯：こういう症例は非常に意義のある症例だと思います。組織もありますし、ぜひともいろいろな症例において細胞の薬剤感受性をみられたらよいと思います。シスプラチンもそうですし、5-FU もそうだと思います。どちらがメインに効いているかなど、そういう点をぜひとも検討していただきたいと思います。

上坂(静岡県立静岡がんセンター)：この症例はたいへん sensitivity がよくて、先に reduction を行って、後で CR になったということですが、こういう大きな mass があって IM があるという場合、初めから reduction surgery でいくのか、あらかじめ少しシステミックなり動注なりをしてからいくのか、この症例はたまたま先に surgery がいったのですが、その辺りの振り分けは実際に先生のなかではどういうふうにされていますか。

演者：それは腫瘍占拠率と主結節の大きさと分けています。

私と同じ施設の永松先生が、2002年にそれまでの200例近くの low-dose FP 療法をすべてみましたが、主結節が8cm以上の Stage III, Stage IVはほとんど low-dose FP 療法は効きませんでした。主結節が何センチからこう、というふうにはまだ明確にはしておりません。その経験から、これはもう動注は駄目だなという症例は主結節の大きさからということではよいのではないのでしょうか。

上坂：この症例からは少し本題がはずれてしまっていますが、VPの時にも悩みますね。VPがあつて、対側にばらばらとIMがというような時は、どういうふうを考えられますか。

演者：必ず動注です。

上坂：動注が先行しますか。

演者：しかしこの研究会に参加すると、VPもあけて引き抜く先生がたくさんおられるのでびっくりしています。九州ではそういうことはあまりしなかったと思います。VPは必ず動注を先行させるというふうにしておりますし、今でもそうです。

岡田(山梨大学)：抄録に右副腎転移があると書いてありますが、これも動注で消えたのでしょうか。

演者：はい。動注で消えました。

#### 講 評

HCC 治療のゴールは腫瘍の制御と背景にある肝炎の治癒である。その点では肝内転移や肺転移を伴う高度進行 HCC 症例をインターフェロンによる肝炎の治療をするまでにできたことは賞賛に値する。これには著者らの豊富な動注化学療法の実験や大きな腫瘍を安全に肝切除すること、機能が亢進した脾臓を安全に切除する外科医の技術の利用があつてのことと思われる。

著者らは肺転移など肝外転移に対しても、low-dose FP 療法が有効であると述べている。自験例ではインターフェロン+5-FU 動注療法で肝病変、肺転移が消失した症例を経験している。肝外転移への効果がシスプラチンの末梢血への spill over のみですべてが説明できるのであろうか。たとえば肝病変の消退に伴って、何らかの免疫学的な効果が働いていないかなど想像すると非常に興味あるところである。

(大場 範行)

この論文は第38回肝癌症例検討会(2008年11月8日)で発表された

## ② ソナゾイド造影超音波による RFA 治療支援

田中正俊  
佐田通夫

久留米大学医療センター消化器内科  
久留米大学医学部消化器内科部門

腫瘍径 3 cm 以下の結節型肝細胞がん (HCC) に対する局所治療、ことにラジオ波焼灼療法 (radio frequency ablation : RFA) の直接治療効果と治療後の長期予後は良好で、肝切除に匹敵する予後が報告<sup>1), 2)</sup>されている。これに伴い、わが国においても多数例が経皮的 RFA で治療されるようになった。しかし、RFA は決して安全な治療ではなく、ひとたび合併症が起これば、死亡に至る例も報告されている<sup>3)</sup>。そこで合併症を恐れて、治療の適応を絞り込み安全性を重視すれば、合併症は減少しても症例数が増加しない。これでは優れた RFA の治療効果を多数例の肝がん症例に享受させることができない。すなわち、多くの症例を安全に治療するには、RFA の手技をどれだけ簡単に施行できるようにするかの工夫が必要となってくる。筆者は、この目的を達成するためのファーストステップとしては、治療対象となる肝がん結節の治療前、治療中における正確な評価と治療担当医の手技の習熟 (一般的な技術だけでなく、症例ごとの予習) が重要だと考えている。

### 当院での肝がんのスクリーニングと RFA 治療支援

図 1 に、当院における肝がんのスクリーニングの手順とソナゾイド造影超音波検査<sup>4)</sup>を使用する場面を示した。何よりも大切な点は、肝がんあるいは肝がん再発が診断された後は、患者ごとに治療を担当する医師が決まり、各担当医師が治療計画立案のために、すべての超音波検査を責任制で施行するようにしていることである。

まず、治療前にソナゾイド造影超音波検査を用いて肝がんの性状を診断する。この時点で、治療支援に①ソナゾイド造影超音波検査を用いるか、②肝動脈塞

栓術 (TACE) を併用するかどうか決定する。最終的な TACE の併用は、血管造影の施行時の腫瘍濃染の強さと腫瘍径 (通常は 2.5 cm 以上) で決定するが、TACE を目的とした血管造影検査施行の有無は、造影 CT 検査と造影超音波検査における腫瘍濃染の程度によって決定している。

### ソナゾイド造影超音波による肝がん結節の治療前診断と治療支援の実際

#### 1. 肝がんの肉眼型診断と治療範囲の決定

ソナゾイド造影超音波検査が RFA 治療支援に有用と考えられる場合を表 1 に

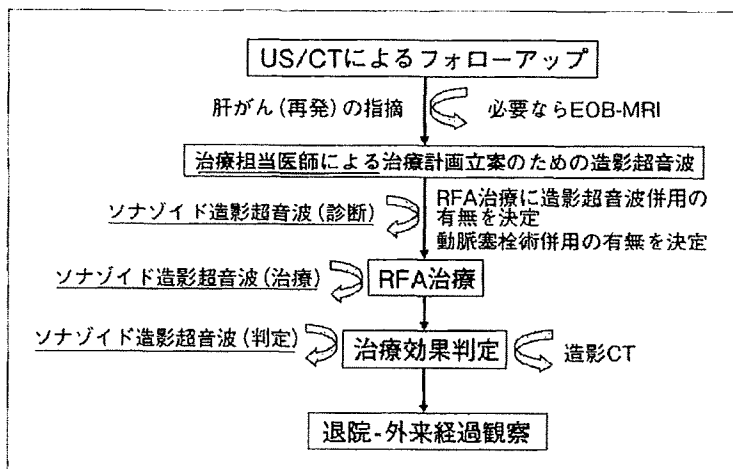


図 1 当院での肝がんのスクリーニングと RFA 治療までの手順

表1 ソナゾイド造影超音波検査が  
RFA治療支援に有用な場合

- ・肝がんの肉眼型診断と治療範囲の決定
- ・小さな病変の認識率の向上
  - 特に小さな肝内転移の同定 (TACE後)
- ・小さな局所再発部位の同定
- ・TACE後の遺残部位の同定と治療

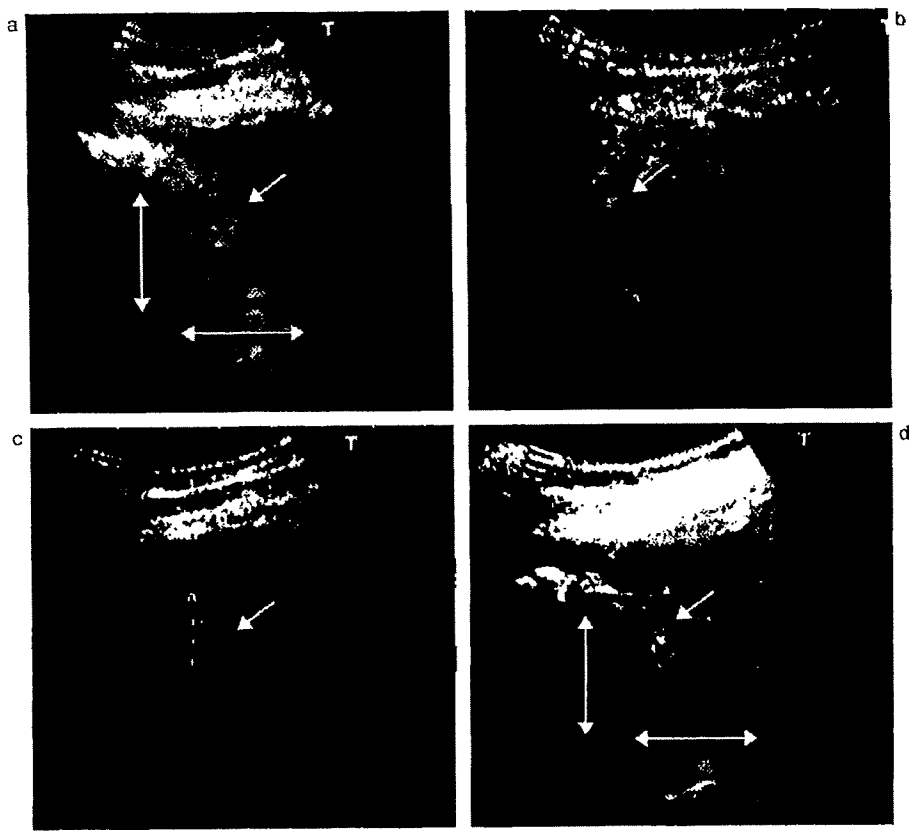


図2 ソナゾイド造影超音波と通常の超音波検査の組み合わせが肝がんの性状診断に有用だった症例

- a: 通常の超音波検査 (3.5MHz) では、肝 S<sub>6</sub> に腫瘍径 2cm の肝がん結節を認めた。結節内結節 (←) が高エコーで全体低エコーであった。
- b: ソナゾイド造影超音波検査の vascular phase では、結節内結節の高エコー結節に動脈血流を認めた。
- c: ソナゾイド造影超音波検査の Kupffer phase (11分後) では、動脈血流を認めた高エコー結節が造影欠損として認められ、その周囲の低エコー結節は等エコーで造影欠損はなかった。
- d: Kupffer phase で低MI値から高MI値に変更することで、再度、肝がんの全体像が明確に認識できる。

示す。第1には、肝がんの肉眼型診断と治療範囲の決定に有用だと考えている。図2, 3に、実際に治療前検査として有用であった症例を提示する。

図2は、造影超音波検査と通常の超音波検査の組み合わせが、肝がんの性状診断に有用であった症例である。図2 aは通常の超音波像であるが、全体は低エコー、類円形で腫瘍径2cm、内部の11時方向に7mm径の高エコー結節を伴う病変である。図2 bのソナゾイド造影超音波検査のvascular phaseでは、高エコー部分に一致する造影像を認め、図2 cのKupffer phaseで、同部は陰性の造影(門脈欠損像)として認識できる。

しかし、腫瘍全体は欠損像として認められなかった。そこで、この高エコー結節が門脈欠損部分であることを確認し、腫瘍全体像を把握する目的で、高MI値に変更して撮像した(図2 d)。高MI値に変更すると、肝内にとどまっている造影剤が破壊され、欠損像を示していた高エコー部分が再び高エコーとして認識されるようになり、さらに、周囲の低エコーの部分が明瞭に描出されるようになり、腫瘍全体像が明確に把握できた。また、造影剤を破壊した後の超音波像の方が、低エコー腫瘍の辺縁が明瞭になっているように思われる。造影CT検査では肝S<sub>6</sub>に、高エコー部分に一致する6mm大

の腫瘍濃染像を認めたが、同部の門脈欠損は認めなかった。

以上の検査から、この肝がん結節は、全体には腫瘍濃染を示さず、門脈欠損像が明らかでない高分化型肝細胞癌、あるいは前がん病変で、内部の高エコー結節の部分はすでに脱分化が始まっているはっきりとした肝がん結節と診断できる。そこで、この結節は腫瘍全体をRFA治療することに決定し、また、治療支援にソナゾイド造影超音波は必要ないと判断した。

図3は、高周波プローブによる造影超音波検査が、肝がんの肉眼型診断と治療方針の決定に有用であった症例である。

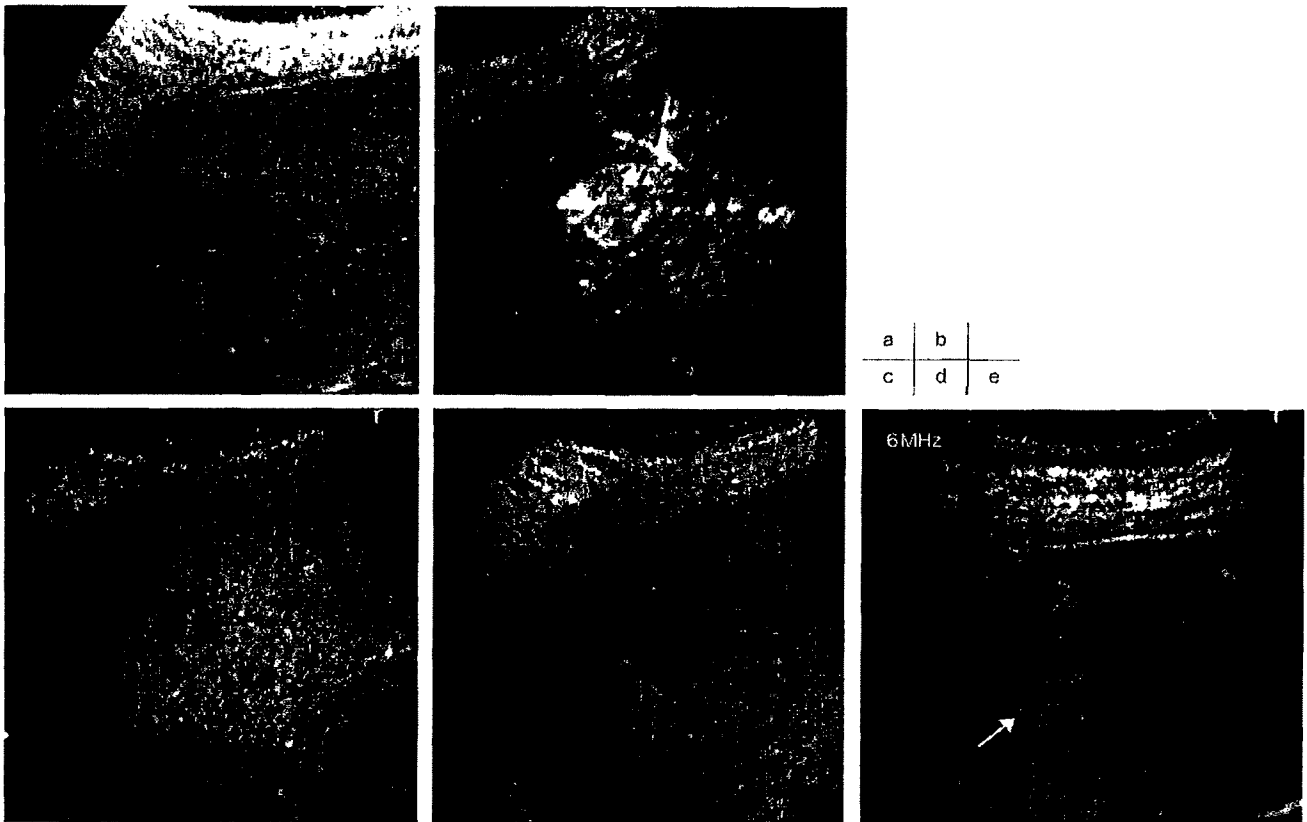


図3 高周波プローブ(6MHz)によるソナゾイド造影超音波検査が肝がんの性状診断に有用であった症例

- a: 通常の超音波検査(3.5MHz)で、肝S<sub>8</sub>に腫瘍径2.2cmの低エコー肝がん結節を認める。結節内部に中隔のある単純結節型肝がんに見える。
- b: ソナゾイド造影超音波検査(3.5MHz)のvascular phaseでは結節全体が染色されている。
- c: Kupffer phase(10分後)では、薄い染色欠損像を認めた(dはこの画像のモニター画面)。
- e: 高周波プローブ(6MHz)を用いて低MI値でソナゾイド造影超音波(Kupffer phase)を施行すると、肝がん結節周囲に白い縁取りが認められ、さらに結節周囲の外側に増大する結節(→)を認めて、肝がん結節の肉眼型は単純結節周囲増殖型であることがわかる。

症例は肝S<sub>8</sub>に腫瘍径2.2cmの低エコー腫瘍を認める(図3 a)。通常の超音波検査では、一見中隔のある単純結節型HCCに見える。さらに、ソナゾイド造影超音波検査のvascular phaseでは腫瘍濃染像を認め(図3 b)、Kupffer phaseでは、同部が薄い染色欠損像として認められる(図3 c, d: 図3 dは図3 cのモニター画面)。

以上より、腫瘍は一見、定型的な単純結節型HCCのように見えるが、これを6MHzの高周波プローブの低MI値でさらに観察したところ、中隔と見えた部分は、実際は結節外への増大で、さらにプローブに近接する側にも同様に増大する部分が認められ、腫瘍肉眼型は、単純結節型ではなく単純結節周囲増殖型であることが明らかになった。この症例も、直接のRFA治療にソナゾイド造影超音波を用いる必要はないと判断したが、

この検査によって、十分な治療マージン(少なくとも5mm程度)が必要な症例であると判断することができ、造影超音波が有用であると考えられた。

## 2. 小病変の認識率向上と治療後遺残部位の同定および追加治療支援

第2に、小さな病変の認識率の向上(特に肝内転移や治療後の局所再発)と、TACE後の治療後遺残部位の同定および追加治療に有用である。この事実はソナゾイド造影超音波が導入されてから、すでによく認識されている。図4, 5に、実際に治療後有用であった症例を提示する。

図4は、小さな肝内転移の同定に造影超音波検査が有用であった症例である。図4 aの造影CT動脈相で、前回治療部(TACE併用RFA)のすぐそばに5mm大の腫瘍濃染(再発、おそらく肝内転移)

が認められる。しかし、通常の超音波検査(図4 b)でその再発部位を同定することは困難であった。そこで、ソナゾイド造影超音波検査を施行したところ、再発部位はKupffer phaseで明瞭な染色欠損部として認識できた(図4 c)。そこで、この症例は再発であったので追加TACEの後にソナゾイド造影超音波による治療支援のもとRFAを施行した。治療後のCT(図4 d)で、十分な焼灼が得られていることがわかる。

次の症例(図5)は、ソナゾイド造影超音波による治療支援が最も単純明快に有用な場合、すなわち、TACE後の治療後遺残部位の同定と治療支援である。図5 aに、本症例の血管造影像と造影CT動脈相を示す。肝S<sub>8</sub>に腫瘍径3.6cmの典型的な結節型肝がんが認められる。これに対し、形のごとくTACEを施行した。

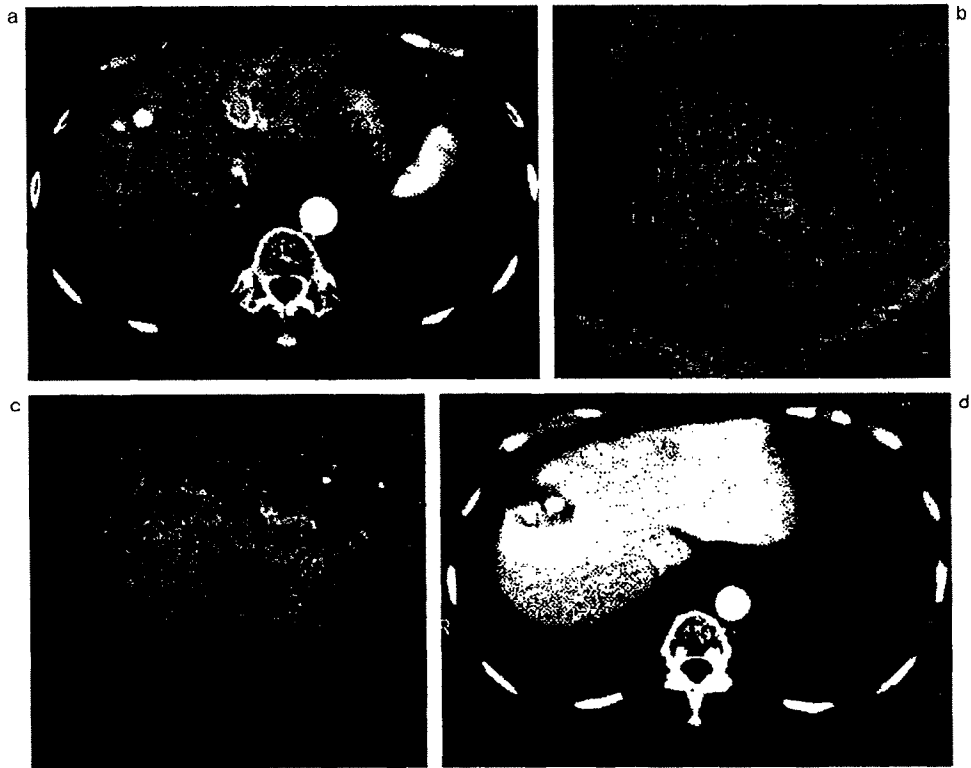


図4 小さな肝内転移再発の同定にソナゾイド造影超音波検査が有用であった症例

- a: 肝S<sub>6</sub>の肝がんに対して、TACE併用RFAで治療後1年で小さな転移再発を造影CTが描出した。
- b: 通常の超音波検査では再発部位の同定は困難だった。
- c: 肝S<sub>6</sub>に対してTACE後に施行したソナゾイド造影超音波検査のKupffer phaseで、同部の小さな再発(5mm)は明瞭に同定することができた。
- d: 追加RFA後の造影CT像で、転移巣は十分に焼灼されているのが確認できた。

TACE施行後の血管造影像とリピオドールCT像を図5 bに示す。TACE後の血管造影像では一部にまだ血流が残っているが、リピオドールCT像でのリピオドール集積は良好であった。しかし、これ以上の無理なTACEを追加せずに、ソナゾイド造影超音波検査で治療遺残部位の同定を試みたところ、結節の9～12時方向に血流の遺残が認められた(図5 c)ので、直ちに追加RFAをソナゾイド造影超音波検査支援のもとに施行した。RFA治療終了後のソナゾイド造影超音波では、認められた遺残血流が完全に消失しているのがわかる(図5 d)。この症例は、治療後1年半の現在も無再発で外来観察中である。

## 治療後の効果判定と 外来経過観察(図1)

治療前のソナゾイド造影超音波により、

治療支援にソナゾイド造影超音波による支援を用いるかどうか、TACEの併用を施行するかどうかを決定した後に治療し、治療後の効果判定には、通常は造影CTを2～4日後に施行して退院を決定している。しかし、標的病変が小さく(2cm以下)、十分な評価のできる部位に存在する場合には、ソナゾイド造影超音波による評価のみで退院させることもある。これは放射線検査の頻度を少なくするだけでなく、CT検査に用いられるヨード系造影剤の使用頻度もできるだけ少ない方が望ましいという観点からも、ソナゾイド造影超音波検査を多用している。

一方、外来経過観察になったら、定期的な観察は通常の超音波検査と、造影CT検査あるいはGd-EOB-DTPA造影MRI検査が基本である。外来でソナゾイド造影超音波検査を使用する場合は、再発病変を指摘されたときの確認と治療計画立案のために、治療担当医によっ

て実施している。もちろん、肝がんが診断されたときの鑑別診断(特に消化器がんの肝転移)には、外来でソナゾイド造影超音波検査を多用するが、肝がんに関しては治療支援のためにソナゾイド造影超音波検査を使用する頻度が高い。

### ◎

肝がんに対するRFA治療は優れた治療効果を示し、小結節肝がんに対しては肝切除に匹敵する治療効果があることは、誰もが認めるようになった。しかし、この治療効果には重篤な合併症が伴うことがあること、さらには、しっかりした技術がないと、その治療効果を十分に提供できないことを認識しておくことが大切である。その目的を達成するには、明確な治療標的病変の評価と認識が大切で、その目的からソナゾイド造影超音波検査は、当院における肝がん治療には欠かせない検査となった(図6)。



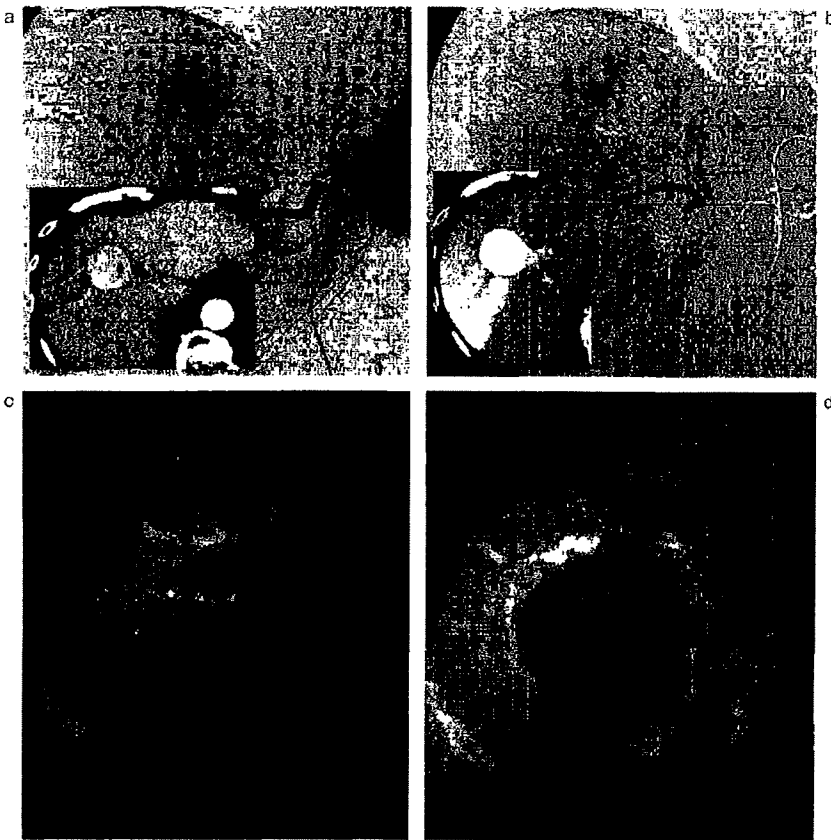


図5 ソナゾイド造影超音波がTACE後の遺残部位の同定と追加RFAに有用であった症例  
 a: 肝S<sub>8</sub>に3.6cmの肝がんを認め、TACEを施行した。  
 b: CT検査ではリビオドールは十分に集積していたが、術後の血管造影では一部に腫瘍血流が遺残した。  
 c: ソナゾイド造影超音波検査のvascular phaseで、血流遺残部位は容易に同定できた。  
 d: 血流遺残部位に追加RFAを施行した後のソナゾイド造影超音波検査(vascular phase: Micro Flow Imaging)で、完全に血流がなくなったことが確認できる。

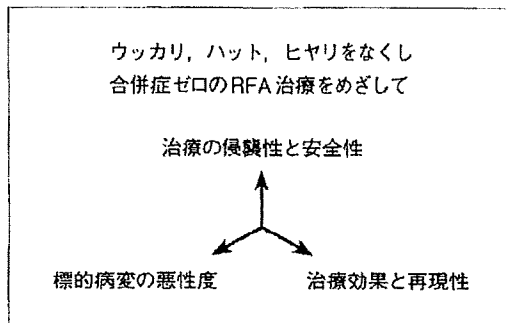


図6 肝がんに対するこれからのRFA治療  
 標的病変の正確な評価と把握に、ソナゾイド造影超音波検査は必須の検査である。

●参考文献

1) Lin, S.M., et al. : Randomised controlled trial comparing percutaneous radiofrequency thermal ablation, percutaneous ethanol injection, and percutaneous acetic acid injection to treat hepatocellular carcinoma of 3 cm or less. *Gut*, 54, 1151 ~ 1156, 2005.

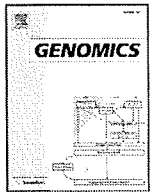
2) Shiina, S., et al. : A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 129, 122 ~ 130, 2005.  
 3) Livrahlgi, T., et al. : Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation ; Complications encountered in a multi-

center study. *Radiology*, 226, 441 ~ 451, 2003.  
 4) Moriyasu, et al. : Efficacy of perflubutane microbubble-enhanced ultrasound in the characterization and detection of focal liver lesion ; Phase 3 multicenter clinical trial. *Am. J. Roentgenol.*, 193, 86 ~ 95, 2009.



Contents lists available at ScienceDirect

Genomics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ygeno](http://www.elsevier.com/locate/ygeno)

## Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma

Yuji Hodo<sup>a</sup>, Shin-ichi Hashimoto<sup>b</sup>, Masao Honda<sup>a</sup>, Taro Yamashita<sup>a</sup>, Yutaka Suzuki<sup>c</sup>, Sumio Sugano<sup>c</sup>,  
Shuichi Kaneko<sup>a,\*</sup>, Kouji Matsushima<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Gastroenterology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science, 13-1 Takara-Machi, Kanazawa, Ishikawa 920-8641, Japan

<sup>b</sup> Department of Molecular Preventive Medicine, School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>c</sup> Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 June 2009

Accepted 14 January 2010

Available online xxx

#### Keywords:

5'-end serial analysis of gene expression

Transcriptional start site

Acyl-coenzyme A oxidase 2

Intron

Hepatocellular carcinoma

### ABSTRACT

To elucidate the molecular feature of human hepatocellular carcinoma (HCC), we performed 5'-end serial analysis of gene expression (5'SAGE), which allows genome-wide identification of transcription start sites in addition to quantification of mRNA transcripts. Three 5'SAGE libraries were generated from normal human liver (NL), non-B, non-C HCC tumor (T), and background non-tumor tissues (NT). We obtained 226,834 tags from these libraries and mapped them to the genomic sequences of a total of 8,410 genes using RefSeq database. We identified several novel transcripts specifically expressed in HCC including those mapped to the intronic regions. Among them, we confirmed the transcripts initiated from the introns of a gene encoding acyl-coenzyme A oxidase 2 (ACOX2). The expression of these transcript variants were up-regulated in HCC and showed a different pattern compared with that of ordinary ACOX2 mRNA. The present results indicate that the transcription initiation of a subset of genes may be distinctively altered in HCC, which may suggest the utility of intronic RNAs as surrogate tumor markers.

© 2010 Published by Elsevier Inc.

### Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common cancer worldwide and the third most common cause of cancer mortality. HCC usually develops in patients with virus-induced (e.g., hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV)) chronic inflammatory liver disease [1]; however, non-B, non-C HCC has been reported in patients negative for both HBV and HCV [2]. HCC development is a multistep process involving changes in host gene expression, some of which are correlated with the appearance and progression of a tumor. Multiple studies linking hepatitis viruses and chemical carcinogens with hepatocarcinogenesis have provided insights into tumorigenesis [1,3]. Nevertheless, the genetic events that lead to HCC development remain unknown, and the molecular pathogenesis of HCC in most patients is still unclear. Therefore, elucidation of the genetic changes specific to the pathogenesis of non-B, non-C HCC may be useful to reveal the molecular features of HCCs irrelevant to viral infection.

Gene expression profiling, either by cDNA microarray [4] or serial analysis of gene expression (SAGE) [5], is a powerful molecular technique that allows analysis of the expression of thousands of

genes. In particular, SAGE enables the rapid, quantitative, and simultaneous monitoring of the expression of tens of thousands of genes in various tissues [6,7]. Although numerous studies using cDNA microarrays and SAGE have been performed to clarify the genomic and molecular alterations associated with HCC [6,8–10], most expression data have been derived from the 3'-end region of mRNA. Recent advances in molecular biology have enabled genome-wide analysis of the 5'-end region of mRNA that revealed the variation in transcriptional start sites [11,12] and the presence of a large number of non-coding RNAs [13]. These approaches might be useful for identifying the unique and undefined genes associated with HCC not identified by the analysis of the 3'-end region of mRNA. SAGE based on the 5'-end (5'SAGE), a recently developed technique, allows for a comprehensive analysis of the transcriptional start site and quantitative gene expression [14]. This article is to elucidate the molecular carcinogenesis of non-B, non-C HCCs, while those heterogeneous entities are supposed not to share the same etiology, by using 5'SAGE.

### Results

#### Annotation of the 5'SAGE tags to the human genome

We characterized a total of 226,834 tags from three unique 5'SAGE libraries (75,268 tags from the normal liver (NL) library, 75,573 tags from the non-tumor tissue (NT) library, and 75,993 tags from the tumor (T) library) and compared them against the human genome

**Abbreviations:** 5'SAGE, 5'-end serial analysis of gene expression; HCC, hepatocellular carcinoma; ACOX2, acyl-coenzyme A oxidase 2.

\* Corresponding author. Fax: +81 76 234 4250

E-mail address: [skaneko@m-kanazawa.jp](mailto:skaneko@m-kanazawa.jp) (S. Kaneko).

0888-7543/\$ – see front matter © 2010 Published by Elsevier Inc.  
doi:10.1016/j.ygeno.2010.01.004

Please cite this article as: Y. Hodo, et al., Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma, *Genomics* (2010), doi:10.1016/j.ygeno.2010.01.004

sequence. A total of 211,818 tags matched genomic sequences, representing 104,820 different tags in the three libraries (Table 1). About 60–65% of these tags mapped to a single locus in the genome in each library. Then, we mapped these single-matched tags to the well-annotated genes using RefSeq database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/), reference sequence database developed by NCBI). A total of 45,601 tags from the NL library, 39,858 from the NT library, and 41,265 from the T library were successfully mapped to 8410 unique genes (4397 genes detected in the NL library, 5194 genes in the NT library, and 6304 genes in the T library).

#### Gene expression profiling of non-B, non-C HCC

Abundantly expressed transcripts in the NL library and their corresponding expression in the NT and T libraries are shown in Table 2. The most abundant transcript in all three libraries was encoded by the *albumin (ALB)* gene. Transcripts encoding apolipoproteins were also abundantly expressed in each library, suggesting the preservation of hepatocytic gene expression patterns in HCC. Of note, the expression of *haptoglobin (HP)* (NL: 631, NT: 329, T: 57) and *metallothionein 1G (MT1G)* (NL: 392, NT: 169, T: 2) was decreased in the NT library and more in T library compared with NL library. Furthermore, the expression of *metallothionein 2A (MT2A)* (NL: 1027, NT: 872, T: 19), *metallothionein 1X (MT1X)* (NL: 547, NT: 644, T: 11), and *metallothionein 1E (MT1E)* (NL: 275, NT: 340, T: 2) was decreased almost fifty-fold or more in the T library compared with the NL and NT libraries. In contrast, the expression of *ribosomal protein S29 (RPS29)* (NL: 372, NT: 1011, T: 1768) was increased in the NT library and more in T library compared with NL library. Thus, transcripts associated with a certain liver function including xenobiotic metabolism might be suppressed whereas those associated with protein synthesis might be expressed in non-B, non-C HCC, similar to that observed in HCV-HCC [15].

We then investigated the characteristics of gene expression patterns in non-B, non C HCC. Two hundred fifty-four and 172 genes were up- or down-regulated in the T library more than five-fold compared with the NL library (data not shown). The top 10 genes are listed in Table 3a, and we identified several novel genes not yet reported to be differentially expressed in non-B, non-C HCC. Representative novel gene expression changes identified by 5'SAGE were validated by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis (Supplemental Fig. 1). RT-PCR results showed that the expression of *galectin 4 (LGALS4)*, *X antigen family, member 1A (XAGE 1A)*, *retinol dehydrogenase 11 (RDH11)*, *hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14 (HSD17B14)* *transmembrane 14A (TMEM14A)*, *stimulated by retinoic acid 13 homolog (STRA13)*, and *dual specificity phosphatase 23 (DUSP23)* was increased, whereas the expression of *C-type lectin superfamily 4 member G (CLEC4G)* was decreased in HCC tissues compared with the non-tumor tissues.

To further characterize the gene expression patterns of non-B, non-C HCC comprehensively, we compared the Gene Ontology process of three types of HCCs (i.e., non-B, non-C HCC; HBV-HCC;

HCV-HCC) based on our previously described data [16]. The pathway analysis using MetaCore™ software showed that the immune related and cell adhesion related pathways were up-regulated in HCV-HCC with statistically significance, and the insulin signaling and angiogenesis related pathways were up-regulated in HBV-HCC with statistically significance, confirming our previous results [16]. Interestingly, genes associated with progesterone signaling were up-regulated in non-B, non-C HCC, while genes associated with proteolysis in the cell cycle, apoptosis and the ESR1-nuclear pathway were up-regulated in all types of HCC (Supplemental Fig. 2).

#### Dynamic alteration of transcription initiation in HCC

Although various transcriptome analyses have discovered considerable gene expression changes in cancer, it is still unclear if transcription is differentially initiated and/or terminated in HCC compared with the non-cancerous liver. We therefore explored the characteristics of transcription initiation and/or termination in HCC using 5'SAGE and 3'SAGE data. Markedly, we observed relevant differences between 5'SAGE and 3'SAGE data derived from the same HCC sample (Tables 3a and b). For example, a gene encoding *coagulation factor XIII, B polypeptide (F13B)* was 13-fold up-regulated at transcription start sites (5'SAGE) but two-fold down-regulated at transcription termination sites (3'SAGE). On the other hand, a gene encoding *adenylate cyclase 1 (ADCY1)* was 50-fold down-regulated at transcriptional termination sites (3'SAGE) but showed no difference at transcriptional start sites (5'SAGE). These data suggest the dramatic alteration of all process of transcription in HCC, and the transcripts initiated at certain sites might be specifically associated with and involved in HCC pathogenesis, which could be a novel marker for HCC diagnosis.

#### Identification of novel intronic transcripts in HCC

Recent lines of evidence suggest that the majority of sequences of eukaryotic genomes may be transcribed, not only from known transcription start sites but also from intergenic regions and introns [17,18]. Introns are recognized as a significant source of functional non-coding RNAs (ncRNAs) including microRNAs (miRNAs) [18]. Moreover, a recent report implied the role of some large intronic RNAs in the pathogenesis of several types of malignancies [19]. Thus, analysis of transcripts originating from introns might be valuable for elucidating the genetic traits of HCC. We therefore focused on the transcriptional start sites potentially initiated from the intron and deregulated in HCC using 5'SAGE data. We identified that 97% of 5'SAGE tags annotated by the RefSeq database matched the sequences in the exons, while 3% matched those in the introns (1257 in the N library, 1225 in the NT library, and 1261 in the T library) (Table 4a). To identify the possible promoter regions located in the intron, we clustered the different SAGE tags to a certain genomic region if these tags positioned within 500 bp intervals (Supplemental Fig. 3), as described previously [12].

**Table 1**  
Experimental matching of 5'SAGE tags to genome.

	Normal liver	Non-tumor	Tumor	Total
All tags	75,268	75,573	75,993	226,834
Tags mapped to genome (%)				
1 locus/genome	51,076 (71.2)	47,200 (68.0)	48,503 (68.5)	146,779 (69.3)
Multiple loci/genome	20,608 (28.8)	22,142 (32.0)	22,289 (31.5)	65,039 (30.7)
Total tags	71,684 (100)	69,342 (100)	70,792 (100)	211,818 (100)
Unique tags mapped to genome (%)				
1 locus/genome	20,736 (65.5)	20,487 (60.2)	23,753 (60.7)	64,976 (62.0)
Multiple loci/genome	10,914 (34.5)	13,548 (39.8)	15,382 (39.3)	39,844 (38.0)
Total tags	31,650 (100)	34,035 (100)	39,135 (100)	104,820 (100)
Total tags to RefSeq	45,601	39,858	41,265	126,724
Unique gene	4397	5194	6304	8410

5'SAGE indicates 5'-end serial analysis of gene expression.

Please cite this article as: Y. Hodo, et al., Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma, *Genomics* (2010), doi:10.1016/j.ygeno.2010.01.004

**Table 2**

The highly expressed genes in the NL library and corresponding expression in the NT and T libraries (top 50 from NL library).

Tag count			Ratio		Gene
NL	NT	T	NT/NL	T/NL	
3731	1716	2328	0.460	0.624	Albumin (ALB)
2484	2146	2042	0.864	0.822	Apolipoprotein C-I (APOC1)
1955	1603	1079	0.820	0.552	Apolipoprotein A-II (APOA2)
1653	1050	828	0.635	0.501	Apolipoprotein A-I (APOA1)
1252	1908	1203	1.524	0.961	Transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I) (TTR)
1233	724	220	0.587	0.178	Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1 (SERPINA1)
1027	872	19	0.849	0.019	Metallothionein 2A (MT2A)
755	1144	762	1.515	1.009	Ferritin, light polypeptide (FTL)
713	632	680	0.886	0.954	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (AMBIP)
635	524	1336	0.825	2.104	Apolipoprotein E (APOE)
631	329	57	0.521	0.090	Haptoglobin (HP)
600	228	212	0.380	0.353	Fibrinogen gamma chain (FGG)
549	395	302	0.719	0.550	Apolipoprotein C-III (APOC3)
547	644	11	1.177	0.020	Metallothionein 1X (MT1X)
479	257	290	0.537	0.605	Tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1)
463	217	53	0.469	0.114	Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 3 (SERPINA3)
393	204	206	0.519	0.524	Ribosomal protein L26 (RPL26)
392	169	2	0.431	0.005	Metallothionein 1G (MT1G)
372	1011	1768	2.718	4.753	Ribosomal protein S29 (RPS29)
306	163	223	0.533	0.729	Ribosomal protein S27 (RPS27)
279	135	159	0.484	0.570	Ribosomal protein S16 (RPS16)
275	340	2	1.236	0.007	Metallothionein 1E (MT1E)
269	170	246	0.632	0.914	Ribosomal protein S23 (RPS23)
260	142	92	0.546	0.354	Fibrinogen beta chain (FGB)
260	200	195	0.769	0.750	Aldolase B, fructose-bisphosphate (ALDOB)
255	228	286	0.894	1.122	Ribosomal protein S12 (RPS12)
248	162	198	0.653	0.798	Ribosomal protein S14 (RPS14)
246	175	70	0.711	0.285	Interferon induced transmembrane protein 3 (IFITM3)
239	198	273	0.828	1.142	Ribosomal protein L31 (RPL31)
229	264	0	1.153	0.004	Hepcidin antimicrobial peptide (HAMP)
228	149	156	0.654	0.684	Ribosomal protein S20 (RPS20)
222	191	117	0.860	0.527	Ubiquitin B (UBB)
216	218	352	1.009	1.630	Ribosomal protein L41 (RPL41)
210	150	155	0.714	0.738	Ribosomal protein, large, P1 (RPLP1)
201	110	90	0.547	0.448	Ribosomal protein, large, P2 (RPLP2)
198	102	64	0.515	0.323	Fibrinogen alpha chain (FGA)
196	143	408	0.730	2.082	Ribosomal protein L37 (RPL37)
192	123	56	0.641	0.292	Ribosomal protein L37a (RPL37A)
191	208	346	1.089	1.812	Ribosomal protein L30 (RPL30)
174	109	76	0.626	0.437	Ribosomal protein L35 (RPL35)
169	208	3	1.231	0.018	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1 (CYP2E1)
167	105	300	0.629	1.796	Apolipoprotein H (beta-2-glycoprotein I) (APOH)
162	106	33	0.654	0.204	Serum amyloid A4, constitutive (SAA4)
159	85	157	0.535	0.987	Ribosomal protein L34 (RPL34)
159	113	229	0.711	1.440	Transferrin (TF)
155	84	135	0.542	0.871	Ribosomal protein S11 (RPS11)
152	125	101	0.822	0.664	Ribosomal protein S13 (RPS13)
147	84	1	0.571	0.007	Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)
147	180	35	1.224	0.238	Hemopexin (HPX)
146	89	121	0.610	0.829	Alpha-2-HS-glycoprotein (AHSG)

To avoid division by 0, a tag value of 1 for any tag that was not detectable was used. NL, normal liver; NT, non-tumor; T, tumor.

More than 2 tags were detected in the intronic regions of the 164 genes in the NL, 168 genes in the NT, and 157 genes in the T library, suggesting that these regions might be potential intronic promoter regions (Table 4a). The biological process of these intron-origin transcripts using Human Protein Reference Database (<http://www.hprd.org/>) showed that these were related to basic cellular functions such as signal transduction, transport, and regulation of the nucleobase and nucleotide, suggesting that these intronic transcripts

**Table 3a**

Differently expressed genes in HCC (top 10 from 5'SAGE).

5'SAGE	3'SAGE	5'/3'	Gene
T/NL	T/NL	Ratio	
<i>Up-regulated gene</i>			
19	6	3.17	P antigen family, member 2 (prostate associated) (PAGE2)
18	10	1.8	Lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (LGALS4)
16	3	5.33	Choline phosphotransferase 1 (CHPT1)
14	2	7	X antigen family, member 1A (XAGE1A)
14	2	7	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4 (DHRS4)
14	2	7	Sterol-C5-desaturase-like (SC5DL)
13	0.5	26	Coagulation factor XIII, B polypeptide (F13B)
13	2.33	5.58	Retinol dehydrogenase 11 (all-trans and 9-cis) (RDH11)
13	0.5	26	Transmembrane protein 14A (TMEM14A)
12	1.33	9.02	Dual specificity phosphatase 23 (DUSP23)
<i>Down-regulated gene</i>			
0.00436	0.0137	0.318	Hepcidin antimicrobial peptide (HAMP)
0.0051	ND		Metallothionein 1G (MT1G)
0.0068	0.04	0.17	Nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)
0.00727	ND		Metallothionein 1E (functional) (MT1E)
0.0098	0.0526	0.186	C-reactive protein, pentraxin-related (CRP)
0.0145	ND		Metallothionein 1 M (MT1M)
0.0152	ND		Phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid) (PLA2G2A)
0.0178	0.111	0.16	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1 (CYP2E1)
0.0185	0.192	0.096	Metallothionein 2A (MT2A)
0.0201	ND		Metallothionein 1X (MT1X)

3'SAGE, 3'-end serial analysis of gene expression; 5'SAGE, 5'-end serial analysis of gene expression; HCC, hepatocellular carcinoma; NL, normal liver; T, tumor.

may play a fundamental role in the liver (data not shown). Among these genes, 12 were differentially expressed between the NL and T libraries more than four-fold (Table 4b). Interestingly, intronic transcripts (determined by 5'SAGE) of genes encoding *SAMD3*,

**Table 3b**

Differently expressed genes in HCC (top 10 from 3'SAGE).

5'SAGE	3'SAGE	5'/3'	Gene
T/NL	T/NL	Ratio	
<i>Up-regulated gene</i>			
ND	15		Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 1 (LILRB1)
ND	12		Fibroblast growth factor 5 (FGF5)
1	11	0.909	Adenosine deaminase, tRNA-specific 1 (ADAT1)
5	11	0.454	px19-like protein (PRELID1)
4.4	11	0.4	Anaphase promoting complex subunit 11 (ANAPC11)
ND	10.3		Chromosome 21 open reading frame 77 (C21orf77)
ND	10		von Willebrand factor (VWF)
2.333	10	0.233	ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast) (ATOX1)
18	10	1.8	Lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (LGALS4)
ND	9.5		Solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 (SLC26A2)
<i>Down-regulated gene</i>			
0.5	0.012	41.7	ELL associated factor 1 (EAF1)
0.5	0.0137	36.5	TGF beta-inducible nuclear protein 1 (NSA2)
0.000436	0.0137	0.032	Hepcidin antimicrobial peptide (HAMP)
1	0.0179	55.9	Basic, immunoglobulin-like variable motif containing (BIVM)
ND	0.0182		DNA fragmentation factor, 45 kDa, alpha polypeptide (DFFA)
1	0.0185	54.1	GRIP1 associated protein 1 (GRIPAP1)
ND	0.0189		Nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive (NFAT5)
1	0.0204	49	Adenylate cyclase 1 (ADCY1)
0.333	0.0312	10.7	Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)
0.738	0.0312	23.7	Ribosomal protein, large, P1 (RPLP1)

3'SAGE, 3'-end serial analysis of gene expression; 5'SAGE, 5'-end serial analysis of gene expression; HCC, hepatocellular carcinoma; NL, normal liver; T, tumor.

Please cite this article as: Y. Hodo, et al., Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma, Genomics (2010), doi:10.1016/j.ygeno.2010.01.004