

Specific Characteristics of Scirrhou Hepatocellular Carcinoma

Takaaki Sugiki¹, Masakazu Yamamoto¹, Ken Taka¹, Masayuki Nakano²

¹Department of Gastroenterological Surgery, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawada-cho Shinjuku-ku, 162-8666 Tokyo, Japan

²Division of Clinical Pathology, National Hospital Organization Chiba Medical Center, 4-1-2 Tsubakimori Chuo-ku, Chiba, Japan

Corresponding Author: Takaaki Sugiki, MD. Department of Gastroenterological Surgery, Tokyo Women's Medical University,

8-1 Kawada-cho Shinjuku-ku, 162-8666 Tokyo, Japan

Tel: +81-3-3353-8111/ 25214, Fax: +81-3-5269-7435, E-mail: sugiki@ige.twmu.ac.jp, doctor-s@bc4.so-net.ne.jp

ABSTRACT

Background/Aims: Scirrhou hepatocellular carcinoma has been defined within general hepatocellular carcinoma. To define scirrhou hepatocellular carcinoma, the present study identified the specific characteristics as compared with general hepatocellular carcinoma.

Methodology: The scirrhou hepatocellular carcinoma was defined when almost all areas of the tumor were occupied with scirrhou structures. It was identified 14 patients with scirrhou hepatocellular carcinoma and 300 patients with general hepatocellular carcinoma (control), all underwent hepatectomy from 1988 to 1994. It was compared the clinical background of the patients, prognosis, and pathological features, which included immunohistological staining using Hepatocyte Paraffin 1.

Results: All scirrhou hepatocellular carcinoma showed whitish, hard forms resembling intrahe-

patic cholangiocarcinoma. The rates of average ICGR15, positive hepatitis C virus antibody, and microscopic invasion to the bile duct were 12%, 33%, and 20%, respectively, each significantly different than general hepatocellular carcinoma. The cumulative 10-year survival rate of scirrhou hepatocellular carcinoma and general hepatocellular carcinoma were 70% and 31%, respectively. With immunohistological staining, 43% of scirrhou hepatocellular carcinoma showed negative staining for Hepatocyte Paraffin 1.

Conclusions: The scirrhou hepatocellular carcinoma has specific characteristics such as lower rates of hepatitis C virus infection, better prognosis, and different histological findings; therefore, scirrhou hepatocellular carcinoma should be strictly classified under a new category.

INTRODUCTION

According to the Histological Typing of Tumors of the Liver (WHO International Histological Classification of Tumors) (1), scirrhou hepatocellular carcinoma (HCC) is described as "areas with abundant fibrosis stroma separating cords of tumor cells". "Scirrhou" is defined as a histological type of HCC indicating a specific area of a tumor, not defining the whole area of HCC (1). The structure of a scirrhou carcinoma could be detected partially in a HCC, mixed with other structures. Scirrhou HCC generally shows a macroscopic finding resembling mass-forming type of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) (2-4). However, accumulated studies of scirrhou HCC are not sufficient because of its rare occurrence and vague definition. To strictly define scirrhou HCC, the present study attempted to identify specific characteristics of scirrhou HCC and compared its clinicopathological features with general HCC (2).

METHODOLOGY

In the present study, scirrhou HCC was defined as a carcinoma with almost all areas of the tumor

occupied with scirrhou structures, characterized by abundant fibrosis stroma separating cords of tumor cells. The pathological diagnosis was confirmed by reviewing the available hematoxylin and eosin (H&E) stained slides by a pathologist. As for the general HCC which served as the control, the nonscirrhou, simple nodular type HCC was macroscopically selected. The simple nodular HCC was defined as a macroscopic type of HCC in the General Rules for the Clinical and Pathological Study of Primary Liver Cancer (Liver Cancer Study Group of Japan) (2). The present study compared the clinical background, the pathological findings, and the prognosis between the scirrhou HCC and general HCC. It was performed immunohistological staining in scirrhou HCC using hepatic differentiation marker Hepatocyte Paraffin 1 (Hep), biliary differentiation marker Cytokeratin 19 (CK 19), MUC 1 glycoprotein (MUC 1), and epithelial membrane antigen (EMA).

Samples sections were fixed in formalin. Paraffin embedded cell block tissues were deparaffinized and hydrated in a series of xylene, graded alcohols, and water. To improve the staining methods for an-

tigen retrieval, we microwave heated the samples in 10mM citrate buffer at pH 6.0. The endogenous peroxidase was blocked by immersing the samples in 3% hydrogen peroxide. The sections were then washed in a phosphate-buffered saline (PBS) solution. The primary antibody was applied before an overnight incubation at 4°C. The mouse monoclonal antibody was applied before an overnight incubation at 4°C. The mouse monoclonal antibody Hep (clone OCH1E5.2.10; DAKO, Carpinteria, CA) was used at a dilution of 1:50. The mouse monoclonal antibody CK 19 (clone RCK108; DAKO) was used at a dilution of 1:200. The monoclonal antibody Muc 1 (clone Ma695; DAKO) was used at a dilution of 1:1000. The mouse monoclonal antibody EMA (clone E29; DAKO) was used at a dilution of 1:300. After another wash with PBS, biotinylated goat antimouse secondary antibody (DAKO) was applied at room temperature for 40 minutes. The sections were washed again and treated for 40 minutes with streptavidin conjugated to horseradish peroxidase (DAKO). The colorizing agent diaminobenzidine was used subsequently. The sections were counterstained with hematoxylin. PBS, instead of the primary antibody, was used as a negative control.

Normal hepatocytes around tumor cells were strongly stained for Hep with cytoplasmic, diffuse, and granular patterns. When more than 50% of the total tumor showed positive staining for Hep, the staining was graded as 2+. When 5 to 50% of the tumor showed positive staining for Hep, the staining was graded as 1+. When almost all (>95%) of the tumor showed negative staining for Hep, the staining was graded as -. CK 19, MUC 1, EMA staining patterns were graded similarly. Because Hep is a very useful marker for diagnosing HCC in that HCC shows more than 90% positive staining for Hep (5-9), the immunostaining for Hep in the 300 general HCC cases was not performed.

The present study was a retrospective study by which we examined the data of the patients from the database. Informed consents were not obtained from the patients at the time of study; however, all of our patients gave written consents at the time of treatment, stating that anonymous clinical data of the patients could be used for research purposes at a later date.

Statistical Analysis

Chi-square test and Student's t test were applied to compare for differences between groups. The survival curves were analyzed by Kaplan-Meier method and then were compared by log-rank test. For all tests, a p-value of less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Clinical background

From 1988 to 1994, 589 HCC were curatively resected in our hospital. Out of these HCC, 300 were general HCC, 14 (2.4%) were scirrhus HCC. Among

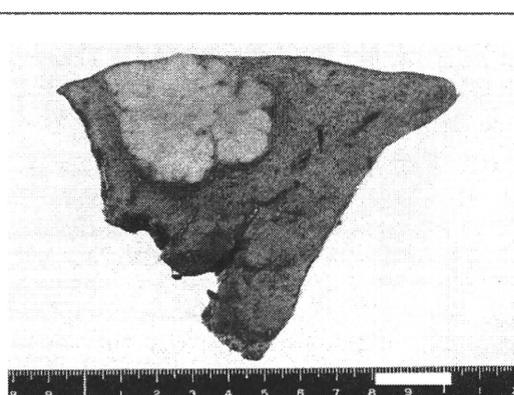


FIGURE 1
Typical macroscopic finding of scirrhus HCC

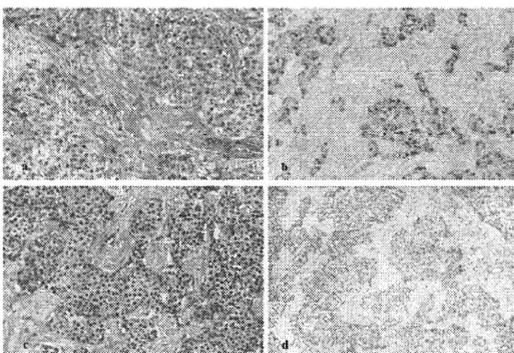


FIGURE 2
Immunohistological finding of scirrhus HCC with Hep positive staining (a, H&E staining; b, Hep staining) and Hep negative staining (c, H&E staining; d, Hep staining)

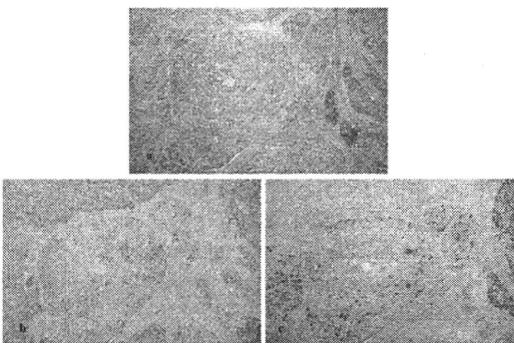


FIGURE 3
Immunohistological finding of scirrhus HCC with both Hep and CK 19 positive staining (a, H&E staining; b, Hep staining 2+; c, CK 19 staining 1+)

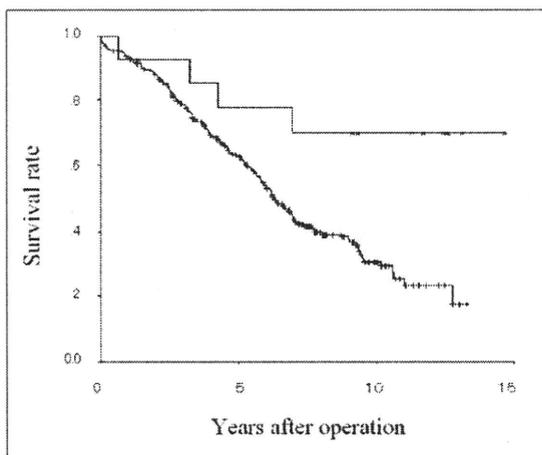


FIGURE 4
The survival curve of scirrhus HCC (xx; n=14) and general HCC (++; n=300). 10-year survival of general HCC=31%; 10-year survival of scirrhus HCC=70% (p=0.0095)

TABLE 1 Clinicopathological Characteristics of General HCC (n=300) and Scirrhou HCC (n=14)

	General HCC	Scirrhou HCC	p - value
Male (n)	230 (77%)	11 (79%)	NS
Age (yr; mean±SD)	61.3±7.8	60.2±9.0	NS
ICG _{R15} (%; mean±SD)	18.8±10.2	12.3±6.5	<0.001
HBsAg (+) (n)	60 (20%)	2 (14%)	NS
HCV (+) (n)	216 (72%)	5 (33%)	<0.01
LC (n)	171 (57%)	5 (33%)	NS
Size (cm; mean±SD)	3.4±2.4	3.2±1.9	NS
Vp (n)	46 (15%)	3 (20%)	NS
Vv (n)	7 (2.3%)	0 (0%)	NS
B (n)	7 (2.3%)	3 (20%)	<0.01
IM (n)	40 (13%)	4 (27%)	NS
N (n)	4 (1.3%)	0 (0%)	NS
Log10(AFP) (mean±SD)	1.69±0.96	1.83±0.91	NS

ICG_{R15}: indocyanine green retention at 15 minutes; LC: liver cirrhosis; Vp: portal vein invasion; Vv: hepatic vein invasion; B: bile duct invasion; IM: intrahepatic metastasis; N: lymph node metastasis; AFP: alpha-fetoprotein

the scirrhou HCC, the mean rate of ICG_{R15} was 12%, 2 (14%) were hepatitis B surface antigen (HBsAg) positive, 5 (33%) were hepatitis C virus antibody (anti-HCV) positive, and 5 (33%) showed liver cirrhosis. Of the total scirrhou HCC, 7 (50%) had single HCC, and the other 7 (50%) had synchronous multiple HCC, of which one was scirrhou HCC and the rest were nonscirrhou HCC. 2 samples (14%) showed previous transcatheter arterial embolization (TAE), but the other 12 samples (86%) were primary HCC showing no previous treatment. No patients showed hypercalcemia in the blood examination.

Macroscopic finding (Figure 1)

All scirrhou HCC showed a whitish, hard form with slightly lobulated margin, which were obviously different than the general HCC. They rather resembled the mass-forming type of ICC (2). 6 cases (43%) also showed a macroscopic central scar, which resembled the finding of focal nodular hyperplasia (FNH) or fibrolamellar HCC.

Microscopic finding

For scirrhou HCC, the rate of bile duct invasion was 21% (3/14). The formation of a capsule was detected in 6 cases (43%), and all 6 cases showed infiltration to the capsule. The differentiation was determined as moderate in 13 cases (93%) and poor in 1 case (7%); none of the samples showed well differentiated cells.

Comparison between scirrhou HCC and general HCC (Table 1)

In the present study was compared the clinical and pathological findings of scirrhou HCC and general HCC. We found the rate of mean ICG_{R15} and the rate of anti-HCV positive significantly lower in the scirrhou HCC, whereas the rate of microscopic

invasion to the bile duct was significantly higher in the scirrhou HCC ($p < 0.01$).

Immunohistological finding (Figure 2, 3)

In the immunohistological staining for Hep, scirrhou HCC showed predominantly positive (2+) in 57% (8/14), predominantly negative (1+) in 29% (4/14), and completely negative (-) in 14% (2/14) of the cases. 21% (3/14) of the cases also showed partial positive staining for the biliary marker CK 19 (2 cases of Hep 2+/CK 19 1+, 1 case of Hep -/CK 19 2+), and 14% (2/14) cases showed partial positive staining 1+ for MUC1 and EMA.

Postoperative prognosis (Figure 4)

For scirrhou HCC, the 5-year survival rate and no recurrent survival rate were 71% (10/14) and 43% (6/14), and the 10-year survival rate and no recurrent survival rate were 50% (7/14) and 21% (3/14), respectively. The recurrent patterns were all intrahepatic recurrence with no distant metastasis. The intrahepatic recurrent rate within 5 years of scirrhou HCC was 50% (7/14). For the general HCC, the 5-year survival rate and no recurrent survival rate were 20% (59/300) and 2% (6/300), and the 10-year survival rate and no recurrent survival rate were 0.7% (2/300) and 0% (0/300), respectively. The intrahepatic recurrent rate within 5 years was 77% (232/300). The postoperative 5-year and 10-year survival rates and the intrahepatic recurrent rate of scirrhou HCC were all better than that of general HCC. With the Kaplan-Mayer method, we found the cumulative 5-year survival rate of scirrhou HCC and general HCC 77% and 63%, respectively, and the cumulative 10-year survival rate were 70% and 31%, respectively (Log Rank test, $p < 0.01$).

DISCUSSION

According to the Liver Cancer Study Group of Japan, the frequency of scirrhou HCC is comparatively rare, namely 1.3% in all surgical resected cases and 1.1% in autopsies (10). Other reports on scirrhou HCC have shown a lower rate of liver cirrhosis and comparatively good prognosis (3,11). However, there has been no definite agreement in other clinical characteristics of scirrhou HCC, such as the rate of HBs antigen positive, AFP, and hypercalcemia (3,11). In the clinical data, scirrhou type HCC showed significantly lower rate of HCV infection, liver cirrhosis, and lower data of ICG_{R15} compared with general HCC ($p < 0.01$). The relatively good prognosis of scirrhou HCC is probably caused by the less liver damage from lower HCV infection rate and the lower intrahepatic multicentric occurrence rate after a hepatectomy. Therefore, there was a gradual widening gap in the 5 to 10 years survival curves between the two groups. Iha *et al.* (4) reported a significant lower rate of recurrence in 12 resected cases of scirrhou HCC compared with 307 cases of non-scirrhou HCC. In the Histological Typing of Tumors of the Liver (WHO International Histological Classification of Tumors), scirrhou HCC

is described as the most common tumor found after radiation therapy, chemotherapy, or infarction (1), but our result showed that scirrhous HCC could occur predominantly without previous treatments of TAE or radiation. Almost all (86%) patients in the present study had no previous treatment.

The pathological results showed interesting features of scirrhous HCC, which should be distinguished from general HCC. These features include 1) the macroscopic characteristics resembling ICC, 2) higher rate of microscopic invasion to the bile duct, 3) higher rate in the loss of positive staining for Hep, and 4) partial positive staining for CK 19, MUC1, EMA. These features suggest some similarities between scirrhous HCC and ICC. The similarity in their macroscopic form was probably because of the common abundant fibrous components. Also, in terms of microscopic invasion to the bile duct, there was a great difference between scirrhous HCC and resected ICC (21% vs 52%) (10). The high frequency of lymph node metastasis and the poor prognosis of ICC also clearly segregate itself from scirrhous HCC (10). Yamamoto *et al.* (12) reported HCC with a central scar and a scalloped tumor margin resembling focal nodular hyperplasia in macroscopic appearance. These scalloped HCC showed a good surgical outcome. A definite difference between the scalloped HCC and our scirrhous HCC was that the scalloped HCC was defined on a macroscopic finding, and our scirrhous HCC was defined on a microscopic finding. However, because both HCC showed similar macroscopic finding, there might be some

overlapping characteristics between scalloped HCC and scirrhous HCC (12). In general, Hep is recognized as a very useful immunostaining antibody for HCC, where HCC showed more than 90% positive staining for Hep (5-9). Microscopic examination revealed that the antigen of Hep might be the mitochondria in the hepatocytes (5), and reduced differentiation of HCC showed lower rate of positive staining for Hep (13,14). Therefore, the high frequency of Hep negative staining in our study might suggest the loss of hepatic antigen and reduced differentiation in scirrhous HCC. In the immunostaining for the biliary markers (CK 19, EMA, MUC 1), 21% of scirrhous HCC showed partial positive staining suggesting partial existence of biliary differentiation in scirrhous HCC. Matsuura *et al.* (15) also reported a significantly higher expression of cytokeratin 7 and a lower expression of Hep in scirrhous HCC than the "ordinary" HCC, which by definition is a similar carcinoma as the general HCC. Based on the less damaged liver, the loss of hepatic differentiation, the existence of partial biliary differentiation, and the tendency of the microscopic invasion to the bile duct, we suggest that scirrhous HCC could be placed in a special pathological position between general HCC and ICC. In the various histological changes of HCC, the mechanisms in the formation of abundant fibrous stroma and occurrence of scirrhous HCC are not clear. These factors need to be examined further from many aspects to further clarify the origin and the position of scirrhous HCC.

REFERENCES

- Ishak K, Anthony P, Sobin L: Histological typing of tumours of the liver. 2nd ed. WHO. New York: Springer-Verlag, 1994 (WHO International Histological Classification of Tumours).
- Liver Cancer Study Group of Japan: General rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer. Second English Edition, Tokyo: Kanehara Press Co., 2003.
- Omata M, Peters RL, Tatter D: Sclerosing hepatic carcinoma: relationship to hypercalcemia. *Liver* 1981; 1:33-49.
- Iha H: Clinicopathological study on scirrhous hepatocellular carcinoma -A study of 12 resected cases. *Acta Hepatologica Japonica* 1994; 35:855-863.
- Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB: Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol* 1993; 143:1050-1054.
- Yamashita F, Iwao T, Torimura T: Sclerosing hepatocellular carcinoma with hypercalcemia. A Case Report. *Kurume Med J* 1992; 39:113-116.
- Leong AS, Sormunen RT, Tsui WM, et al: Hep Par 1 and selected antibodies in the immunohistological distinction of hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma, combined tumors and metastatic carcinoma. *Histopathology* 1998; 33:318-324.
- Minevini MI, Demetris AJ, Lee RG, et al: Utilization of hepatocyte-specific antibody in the immunocytochemical evaluation of liver tumors. *Mod Pathol* 1997; 10:686-692.
- Siddiqui MT, Saboorian MH, Gokaslan ST, et al: Diagnostic utility of the HepPar1 antibody to differentiate hepatocellular carcinoma from metastatic carcinoma in fine-needle aspiration samples. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2002; 96:49-52.
- Liver Cancer Study Group of Japan: Survey and follow-up study of primary liver cancer in Japan. Report 15. Kyoto: Liver Cancer Study Group of Japan, 2002.
- Peiguo GC, Ishizawa S, Emerald W, et al: Hepatocyte antigen as a marker of hepatocellular carcinoma: an immunohistological comparison to carcinoembryonic antigen, CD10, and alpha-fetoprotein. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(8):978-988.
- Yamamoto M, Ariizumi S, Yoshitoshi K, et al: Hepatocellular Carcinoma with a central scar and a scalloped tumor margin resembling focal nodular hyperplasia in macroscopic appearance. *J. Surg. Oncol.* 2006; 94(7):587-591.
- Sugiki T, Yamamoto M, Aruga A, et al: Immunohistological evaluation of single small hepatocellular carcinoma with negative staining of monoclonal antibody Hepatocyte Paraffin 1. *J. Surg. Oncol.* 2004; 88(2):104-107.
- Kumagai I, Masuda T, Sato S, et al: Immunoreactivity to monoclonal antibody, Hep Par 1, in human hepatocellular carcinomas according to histopathological grade and histological pattern. *Hepatology Research* 2001; 20:312-319.
- Matsuura S, Aishima S, Taguchi K, et al: Scirrhous type hepatocellular carcinomas: a special reference to expression of cytokeratin 7 and hepatocyte paraffin 1. *Histopathology.* 2005; 47:382-390.

肝腫瘍診断および治療支援における造影超音波の基礎 ～投与法，装置条件，時相～

田中弘数^{*,**} 飯島尋子^{*,**}

索引用語：造影超音波，ソナゾイド，検査法，装置条件，時相

1 はじめに

Sonazoidは、2007年に発売され、この2年間で用途により使用法はさまざまに工夫されてきた。つまり、肝腫瘍診断では多くは低音圧イメージであるが血流診断の目的に使用する場合には中音圧で造影する方が効率的である場合もある。しかし転移などの診断には長時間中音圧でスキャンすると肝表面のバブルが壊されたりする不都合が生じる。すなわち目的に応じSonazoidを使いわけることが重要である。それには肝臓における振る舞いの特徴を理解する必要がある。Sonazoidは血管から内皮細胞を通過することはない。すなわち間質へ流出せず血管内腔にあるマクロファージによって貪食を受ける^{1,2)}。造影剤の投与後1循環目では肝動脈や門脈の血中濃度がピークを示し、その際肝静脈にも多くの造影剤が流出する。2循環目以降では、肝静

脈内の信号強度は肝動脈や門脈のそれに比べきわめて低い。これは、Sonazoidが肝動脈・門脈から肝静脈に至る1回の循環で、肝類洞に高率にトラップされることを意味する¹⁻³⁾。

本稿では、肝腫瘍診断においてSonazoidを使用する際、肝腫瘍の血流診断、肝癌治療支援および悪性度診断に必要な手法、またKupfferイメージングを得るための至適検査時間などを中心に概説する。

2 Sonazoidの投与

1. Sonazoidの調整

Sonazoidは凍結乾燥末であり、2 mlの注射用水で溶解して調整する。バイアル内の気体はperflubutaneであり、溶解調製したあとも気泡内のガスは外側の気体とガス交換される。そのため、フタを開放したままの放置や、溶解調製後に溶液上部の気体が上部の空気と交換するような状態は避けるべきであ

Hironori TANAKA et al : Basic knowledge of the contrast enhanced ultrasonography for diagnosis of the hepatic tumor and for support of the therapy. : Imaging techniques, Equipment operating condition, Time phase

*兵庫医科大学超音波センター [〒663-8501 兵庫県西宮市武庫川町1-1]

**同 内科肝胆膵科

表1 Sonazoidの投与量・投与法

投与量	0.0075 ml/kg (推奨使用量の半量)。但し最少量は0.5 ml。 投与量は毎回記録し、前回の肝実質造影が不十分な症例には 0.1～0.2 ml追加考慮。
投与法	翼状針と三方活栓付き延長チューブ使用し静注
注入速度	1 ml/sec程度

る。Sonazoidは調製後、約2時間程度安定しているが、この溶液は調整後も数分ですぐに分離し2層化してしまうため、使用直前に再度良く混和し、白濁させてから投与することが重要である。

2. Sonazoidの投与量

推奨投与量は、0.015 ml/kg体重である。したがって、体重60 kgの成人の推奨投与量は0.9 mlとなる。しかし感度の良いハーモニック映像法を用いる場合には、その半量程度0.0075 ml/kgの投与量で良好な造影効果が得られる。しかし、体型や脂肪肝、肝機能などにより肝実質染色は変化する。特に転移性肝癌の検出や肝細胞癌のsatellite noduleなどの検出や手術時の腫瘍の存在範囲の同定には確実にKupffer相の評価を行うことが重要である。私たちが通常使用している投与量は推奨容量の半量であるが最少量は0.5 mlとしている。多量の投与は造影時の超音波のシグナルを飽和させ診断を困難にすることがある。投与量は毎回記録し、前回肝実質造影が不十分な症例(高度肝機能障害症例、高度脂肪肝症例など)には0.1～0.2 ml追加を考慮している。

3. Sonazoidの投与法(表1)

投与法は21 Gの翼状針を使用し、三方活栓を用いて留置し、通常ボラス静注で投与する。点滴静注による持続投与による診断法も試みられているが、日常診療ではワンショット静注が簡便である。静注されるSon-

azoid溶液の量は1 ml以下と少ないので、造影剤の必要量注入後、生理食塩水5 ml程度の後押し注入をしている。生理食塩水でフラッシュすることにより、濃度のピークを高くすることができる。注意点は、延長チューブ内のSonazoid溶液に強い圧を加えるとチューブ内の気泡は一瞬にして消失するため、注入速度は1 ml/秒程度が望ましい。また三方活栓を用いることによるdead spaceについても検討したが、約0.03 mlと臨床的には無視できる量であった。肝癌治療効果判定や肝癌治療支援、術中造影超音波検査においてはあらかじめ30分以上前にSonazoidを静注し再循環がない時間帯にKupffer imageを得ることが確実な診断に繋がる。また腫瘍血管の形態診断や腫瘍血流の診断に有用なMicro Flow Imaging (MFI)、Capture modeなどのMaximum Intensity Projection (MIP)画像を撮像する際は、適宜再度造影剤の注入が必要である。また後述の撮像方法も工夫が必要である。

3 撮像条件

1. 音圧(MI値)設定とその使用方法

音圧設定は、その用途により可変させるとより造影超音波診断は有用となる。Sonazoidは中低音圧造影剤といわれ、音圧(Mechanical Index: MI) 0.2～0.3程度で撮像することが多い。また超音波造影剤は気泡径の粒度分布があるが、Sonazoidはこの粒度分布が他

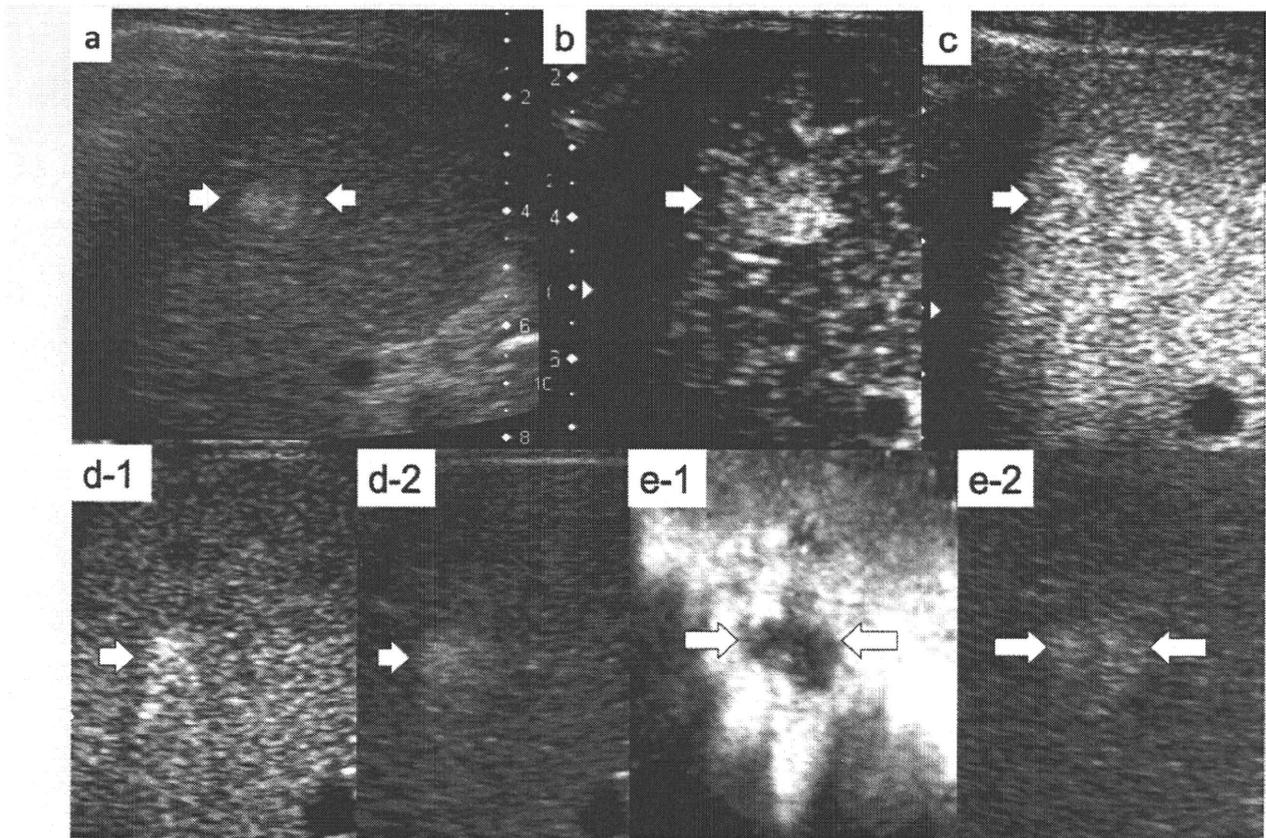


図1 高音圧を用いたKupffer相の評価

B-mode (a), 動脈優位相(b), 門脈優位相: 60秒(c), Kupffer相(d-1)とその参照画像(d-2), 高音圧撮像: 30分(e-1)とその参照画像(e-2)

の超音波造影剤に比べ均一性が高いとされる。一般的に気泡径が小さいほど、振るわせたり壊したりするために必要な音圧は高くなる。生体内に気泡がある場合、音圧を次第にあげていくと、振るえも壊れもしない音圧から、壊れず振るえる音圧の帯域があり、さらにあげていくと壊れる音圧になる。Sonazoidは通常MI値が0.3を超えると気泡は崩壊し始める。しかし、腫瘍診断の目的が肝癌の再発診断などで血流の多寡に重点を置きたい場合には、MI値で0.7~1.2で撮像する場合もある⁴⁾。転移巣の検出など肝実質診断に重点を置く場合には、血管相でMI0.3以上の音圧でスキャンすると肝表に近い部位の造影剤が崩壊され、診断に支障をきたす。用途に応じた音圧で適切に使用する必要がある。

2. 肝実質相(Kupffer相)を得るために

Sonazoidの気泡は、静注後は流血中にあるが、時間の経過とともに、自然に崩壊するもの以外は全身のマクロファージに貪食される。培養したKupffer細胞にSonazoid気泡を貪食させその過程を観察すると、細胞表面から細胞質内に取り込まれ、核の方へ移動してゆく。それに要する時間は数分から20分ほどである。細胞内にある気泡は、流血中にある気泡に比べ振るわせにくく、壊しにくい。これは細胞質の粘度が血液より高く細胞質内では膜に覆われているためである。したがって、理論的にはKupfferイメージを得るためには、流血中にある気泡から得られるVascularイメージより、より高い音圧が必要となると考えられる。

表2 各種機器の検査条件

使用装置	東芝 AplioXG	Siemens Acuson Sequoia	Siemens Acuson 2000	Philips iU22
造影モード	PS low	CPS (contrast pulse sequencing)	CPS (contrast pulse sequencing)	PMPI (power modulation pulse inversion)
使用探触子	PVT-375BT	4CI	4CI	C5-1
基本周波数	送信 1.75 MHz 受信 3.5 MHz	送信 2.5 MHz 受信 2.5/5.0 MHz	送信 2.5 MHz 受信 2.5/5.0 MHz	C Gen 送信 2.0 MHz 受信 4.0 MHz
MI値	0.2～0.3	0.3～0.4	0.15～0.25	0.2～0.3
フォーカスポイント	関心部位下縁	2点目が最下段になるよう設定	関心部位下縁	関心部位下縁
フレームレート (fps)	15～25	10～15	15～20	3～13
ダイナミックレンジ (dB)	40～50	65 ± 5	65 ± 5	40～45
ゲイン	70前後 MFI : 60～63	0前後 Capture : -5 ～ -10	0前後 Capture : -5 ～ -10	60～70

図1に、Levovistで使用していた高音圧での撮像が診断に有用であった症例を提示する。症例は73歳の女性で、C型肝硬変のサーベイランスの際に、腹部超音波検査で肝S5に13 mmの高エコー結節を認めた。造影超音波検査の動脈優位相(17 sec)では、周囲と比較してやや高輝度であったが、門脈優位相(60 sec)では等輝度となった。Kupffer相を低音圧で観察すると30分後でも等輝度であり、結節の診断が困難であった。しかし高音圧撮像では、一部にdefectを伴う低エコーであった。すなわち腫瘍自体が高エコーであったため低音圧では腫瘍のバックグラウンドが染影の程度に影響され、あたかも腫瘍周囲と同等な染影をしているように描出されたと考えられた。

3. 肝腫瘍診断のためのフレーム数

リアルタイムの造影像がSonazoid造影の

特徴であるが、同じ音圧でも単位時間のフレーム数(frame rate, fps)によって撮像に違いがでる。すなわちフレーム数が多くなると比較的音圧の高いフォーカス領域やビームが送信ごとに重なる近距離では気泡が壊れて他の領域より信号が少なく暗くなる。リアルタイム性を維持しながら、最小限のフレーム数で造影する必要がある。通常15フレーム/秒(fps)程度が推奨される。

4. 肝腫瘍診断のためのフォーカス設定

肝腫瘍の血流診断は腫瘍の下縁にフォーカスし診断する。しかし転移など肝全体の病変の検出には肝の下縁にフォーカスし肝全体をくまなくスキャンする。MIP画像など腫瘍血管の描出には、機種により若干の相違もあるが腫瘍の中央から下縁にフォーカスすると効率的に良好な画像を得ることができる。フォーカス領域では音圧が高いため、その領

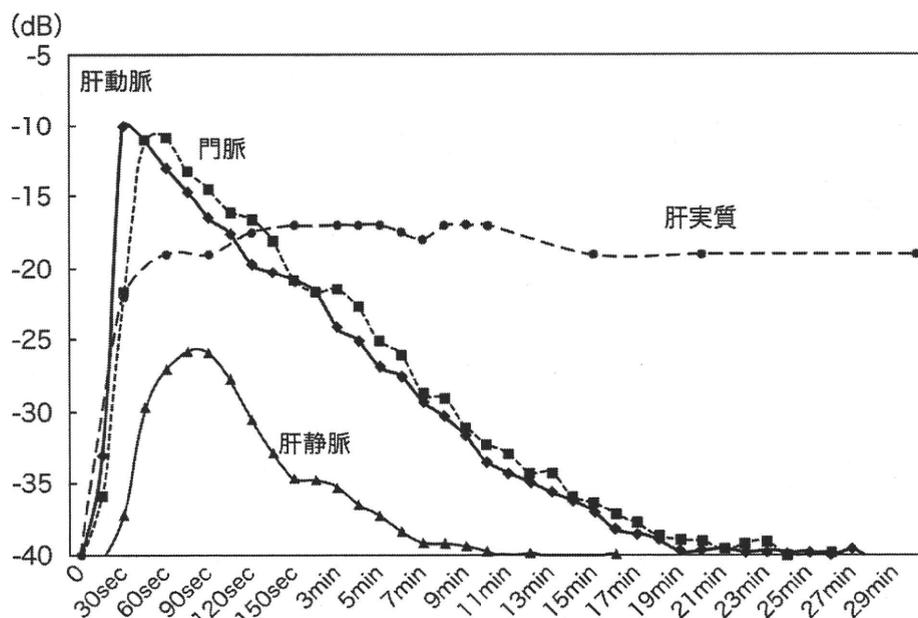


図2 時間輝度曲線

域の気泡だけ振るえたり、壊されたりして肝臓の染影が不均一になることがある。これを避けるために多段フォーカスや深さに依存しないビームフォーカシングが用いられる。シングルフォーカスを使う場合にはこの特性を理解したうえで検査する必要がある。

5. Sensitivity time control (STC)

STCは肝臓の浅部から深部まで均一な輝度になるように調節する。低音圧に設定するとバックグラウンドがみえなくなりゲインやSTCをあげてしまいがちであるが、高エコー病変などの場合には、背景の腫瘍の輝度が邪魔になり診断を困難にすることがある。この設定は機種により大きく画像のプリセットのイメージが異なるため使用機種の性質を十分認識して使用しなければならない。

6. 周波数

体表より10 cm以上の深部病変を撮影する際には、十分な染影効果が通常の周波数では得られないことが多い。そのような際には周波数をより低いものにするすることで、より深部まで十分な染影効果を得ることが可能とな

る。逆に肝表面の観察は高周波プローブを使用すると描出しやすい。

7. 当センターのSonazoid造影の設定(表2)

Sonazoid造影の装置条件は中低音圧であるMI値0.2～0.3, 15フレーム/秒, ダイナミックレンジ40前後である。その他MIPを得るための手法では微細血管を明瞭に描出する必要がある。Aplio XGのMFI (Micro flow imaging)では、ゲインは60 dB前後で観察している。Siemens社は、造影前は0 dB前後の設定であるが、Capture modeでは10 dB前後自動的に低下する。設定は機種により若干の相違があるため、それぞれの装置の特性を生かして使用することが重要である。

4 時相

健常ボランティア12名にSonazoid 0.0075 ml/kgを1 ml/secで急速静注した時のデータを図2に示す。投与後30分まで肝動脈、門脈、肝静脈および肝実質の輝度を測定し時間輝度曲線を解析したところ、45秒までは動脈血流優位であるが、ほぼ同時に門脈血流も

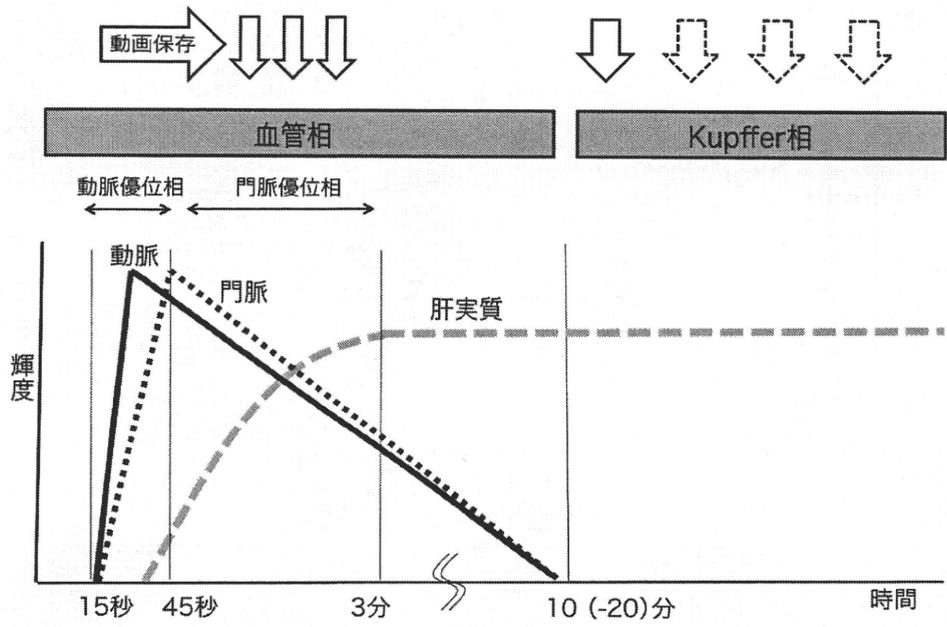


図3 撮像のタイミング

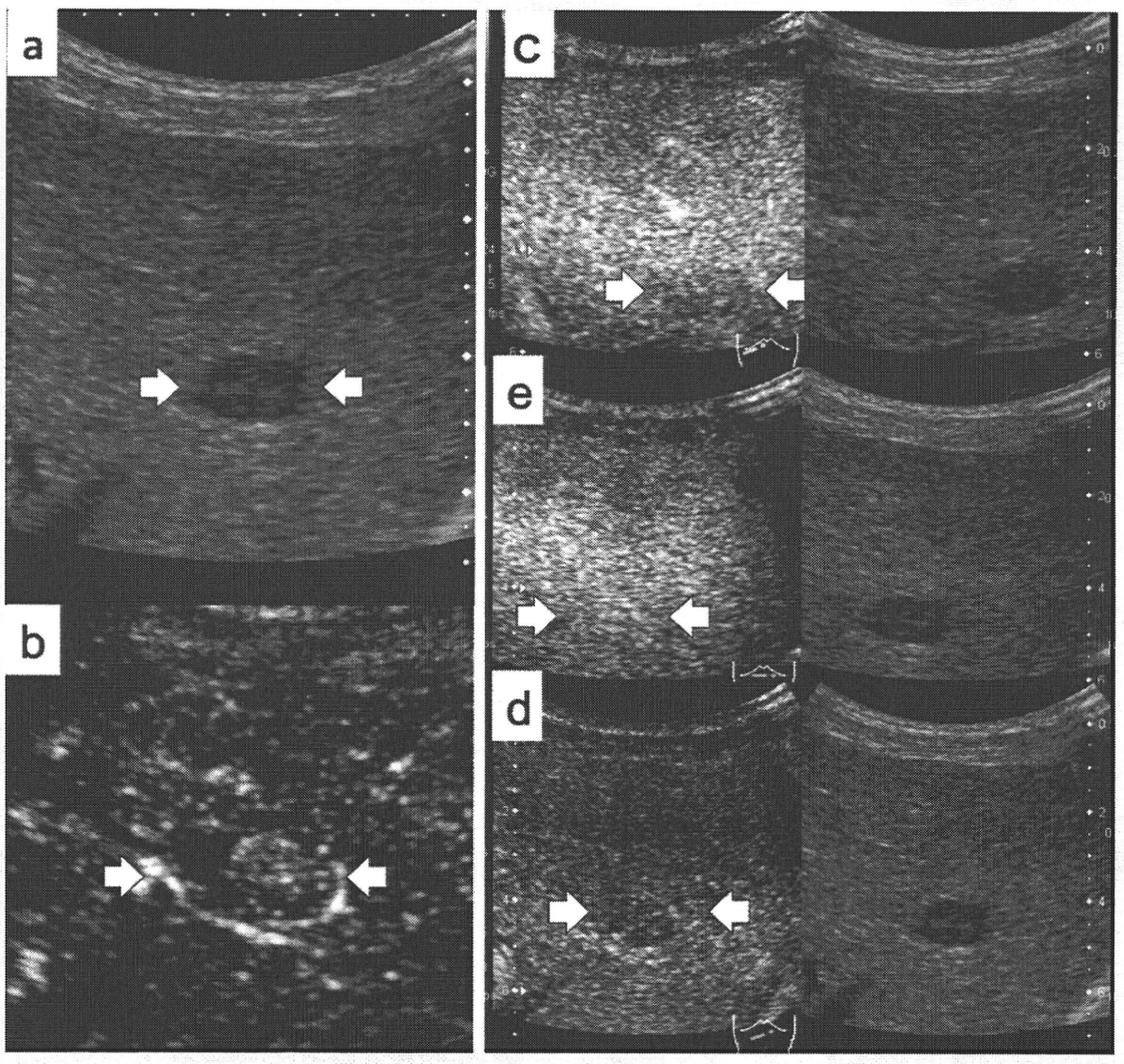


図4 肝癌の門脈血流評価

B-mode (a), 造影超音波検査 造影剤注入17秒後(b), 2分後(c), 3分後(d), 30分後(e)

表3 撮像方法のまとめ

Step 1	Sonazoid注入後, 約10秒~約1分まで動画保存
Step 2	1~3分後で動門脈相および門脈優位相を観察
Step 3	10分後以降にKupffer相を評価 (Hypointense でなければ20分後まで10分ごとに観察)
Step 4	20分後でも iso intense の結節に関してはhigh MIでの評価を追加
Step 5	最後に再静注し, MIP (Maximum Intensity Projection) を使用し微細血管構築を撮像

表4 描出改善の工夫

体位	十分な側臥位(可能な限り 浅い位置での描出を試みる)
探触子	肋間などではマイクロコンベックスを適宜使用
周波数	深部病変で描出不良時には低い周波数に切り替える
Acoustic Power	MIが0.4以上にならないように適宜あげる
STC (Sensitivity time control)	最も良好な位置を調整
モニターモード (side by side, dual mode など)	小病変や境界不明瞭な病変など, 造影中みのがす可能性が高い場合使用

認め、数秒で門脈血流が優位となる。いずれも10分前後でほぼ再循環する血流は認めなくなる。一方、肝実質輝度は約3分で平衡となり、以後1時間までの輝度の減弱はわずかであった(10% 造影輝度が低下する時間は平均40分)。以上より10~20分以降が肝実質の評価に適すと考えた。時相の呼称については、現在日本超音波医学会で検討中であり、諸家により後述のとおり若干呼称が違うが意味するところは同である。

血管相(vascular phase)

1) 動脈優位相(early vascular phase)

投与後約15秒から45秒。動脈の造影後、門脈が最高輝度を呈するまで。

2) 門脈優位相(late vascular phase)

門脈の最高輝度後、肝実質輝度が平衡となる約3分程度まで。

3) Kupffer相(post vascular phase)

投与後20分程度が望ましい。肝機能低下により延長することがある。Kupffer相の名称は、異論もあるが、Sonazoidは98%がKupffer細胞に貪食する報告と臨床的理解を容易にすることからKupffer相と呼称している¹⁻³⁾。

また造影超音波検査では純粋な門脈血流は得ることができない。特に静注後2~3分以降は血流の再循環と肝類洞にも造影剤がトラップされ始めるため、実際は動脈血流や門脈血流が若干低下しているにも関わらず腫瘍と腫瘍周囲の造影の輝度が同じように見え判断を困難にすることがある。実際の症例を図3に提示する。症例は76歳の男性、肝癌治療後のサーベイランスで肝S8に15mmの低エコー結節を認めた。造影超音波の動脈優位相では腫瘍左側に血流豊富な部位を認めた。この病変は、2分後はやや低輝度となったが、約3分後には等輝度、30分後は再度低輝度と

変化した。以上のように軽度の門脈血流低下の診断には、1～3分の門脈優位相を連続的に評価することが重要である。

5 撮像方法 (撮像のタイミング)

撮像の実際を図4に示す。肝臓内に造影剤が流入し始めてから、約1分までを動画保存し、門脈優位相は最長3分まで観察する。Kupffer相は、約10分で腫瘍部が腫瘍周囲より明らかなhypointensityであれば終了する。20分後にhypointensityでなければhigh MI (high MI mode)でバブルを消去し腫瘍部と非腫瘍部の染影の程度を検討している。MFIなどのMIP画像は、血流の豊富な0秒～2分が適する。一般的な撮像のコツを表3に示す。

6 描出改善の工夫 (表4)

描出困難な症例は、体位が重要である。十分な左側臥位(うつ伏せに近い)や坐位をなど工夫し浅い位置での描出を心がける。ラジオ波治療時など肋間での描出困難例は、画質の低下は否めないがマイクロコンベックスが有効な場合もある。

7 まとめ

Sonazoidは、リアルタイムに血流診断ができCTなどでは固定された時間しか診断で

きなかったことを遙かに凌駕した。さらにKupffer imageを得られることは肝腫瘍診療において画期的なことである。

肝腫瘍の造影条件・方法を具体的事例を交え概説した。造影条件については、血管相を重視するかKupffer相を重視するかによっても、また造影剤の投与量や音圧を変えることも重要である。肝腫瘍診断におけるSonazoidの基礎を十分理解し、CTやMRIと相補的に使用することにより診断精度をあげることが重要である。

文献

- 1) Watanabe R, Matsumura M, Suematsu M et al : Mechanism of hepatic parenchyma-specific contrast of microbubble-based contrast agent for ultrasonography: microscopic studies in rat liver. Invest Radiol 42 : 643-651, 2007
- 2) Yanagisawa K, Moriyasu F, Iijima H et al : Phagocytosis of ultrasound contrast agent microbubbles by Kupffer cells. Ultrasound Med Biol 33 : 318-325, 2007
- 3) 飯島尋子 : 肝疾患の造影超音波診断—その変遷と新しい展開—. 肝臓 50 : 105-121, 2009
- 4) Luo W, Numata K, Tanaka K et al : Sonazoid-enhanced ultrasonography for evaluation of the enhancement patterns of focal liver tumors in the late phase by intermittent imaging with a high mechanical index. J Ultrasound Med 28 : 439-448, 2009

* * *

特集II 早期肝細胞癌の診断ストラテジー

早期肝細胞癌における造影超音波検査の位置づけ*

田中弘教****
飯島尋子****

Key Words : early hepatocellular carcinoma, contrast enhanced ultrasonography, Sonazoid, Kupffer image

はじめに

肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma : HCC) の画像診断は、病理学的対比により多くのことが解明され、境界病変より早期肝癌への移行時期には動脈血流や門脈血流、Kupffer機能などに密接な関連があることが報告されてきた^{1)~4)}。超音波領域においても、2007年からペルフルブタンマイクロバブルを用いた第2世代超音波造影剤 Sonazoid® (第一三共) が保険適用となった。これにより Levovist 造影検査では困難であったリアルタイムで詳細な血流動態の観察が可能となり、後期血管相 (Kupffer相) では繰り返し病変の評価をすることができるようになった。さらに悪性度が進行したHCCではKupffer細胞数が減少するので⁴⁾、Kupffer相の所見と腫瘍の微細血管構築を組み合わせることで、悪性度評価にも期待が持たれる⁵⁾。

以上のように超音波検査はCTやMRIと比較して空間分解能が高いのみでなく、時間分解能にも優れる。死角など観察困難な部位が存在することは事実であるが、専門医は的確に他画像と組み合わせ低侵襲に腫瘍診断を行うことが望ま

れる。

本稿では早期肝細胞癌における造影超音波検査の位置づけについて概説する。

早期肝癌の典型的造影超音波所見

早期肝細胞癌でもより早期の癌の動脈優位相は乏血性であるが、高分化に近づくにつれて多血性に変化してゆく。門脈優位相では動脈多血になると低下する。これらはCT during hepatic arteriography (CTHA) などによる詳細な報告のとおりである^{1)~3)}。Kupffer相では、dysplastic nodule (DN) に近い早期肝癌や境界病変では等輝度であり、これらの鑑別は困難であるが、中分化になるにつれ、腫瘍内のKupffer細胞数の低下とともにKupffer相も低輝度となる (図1)。

このように一口に高分化型肝癌といってもその程度はさまざまであり、たとえば動脈血流に

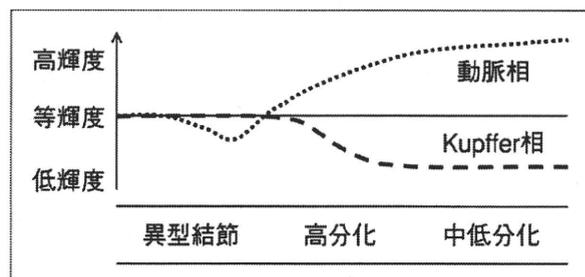


図1 肝細胞癌分化度の進展と造影超音波検査のパターン推移

* Significance of the Sonazoid contrast enhanced ultrasonography for early hepatocellular carcinoma.

** Hironori TANAKA, M.D., Ph.D. & Hiroko IJIMA, M.D., Ph.D.: 兵庫医科大学超音波センター〔〒663-8501 西宮市武庫川町1-1〕; Ultrasound Imaging Center, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663-8501, JAPAN

*** 兵庫医科大学内科学肝胆臓科

においても多血から乏血まで幅広い。しかし早期肝癌では多血であっても、その程度は強くないため、B-modeが高エコーである場合、背景肝の影響で微細な血流の変化が埋もれてしまう可能性がある。

各種画像検査による肝細胞癌の動脈血流評価の比較

中分化肝癌の動脈相は通常、多血性となるため、CTやMRIでの評価は容易である。しかし前述のとおり、早期肝癌の動脈血流の評価は微妙な判定を要することが多く、各種画像検査によって血流評価の判定が異なることもある。そこで各検査法による違いを明らかとするため、組織学的あるいは総合画像診断により肝細胞癌と診断された結節のうち、EOB-MRI (Philips Intera 1.5T), Dynamic CT (Siemens SOMATOM Sensation), Sonazoid CEUS (Toshiba Aplio XG) あるいはSiemens Acuson Sequoia)のすべての画像検査が可能であった55症例59結節(男性38例, 女性17例, 平均年齢68.9±8.4歳, 平均腫瘍径18.8±9.1mm)の画像所見を検討した。

今回の対象病変では早期肝癌が多く含まれており、多血病変の割合が相対的に少なかったが、動脈相が多血性と診断できたものはMRI64% (38結節), CT73% (43結節), contrast-enhanced ul-

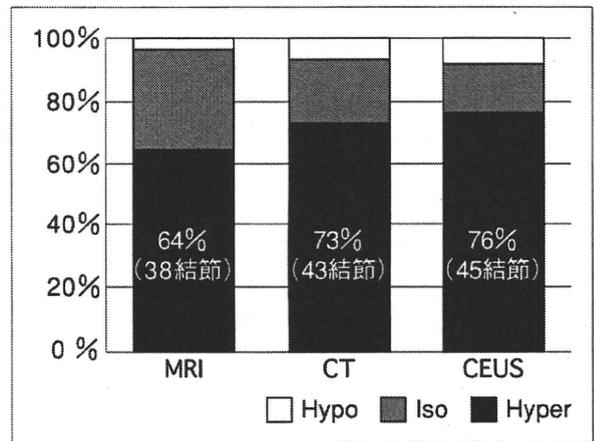


図2 動脈血流感度(検査方法別)

trasound (CEUS) 76% (45結節)とCEUSの感度が最も良好であった(図2)。この原因は、CTやMRIではあらかじめ決められた時点の評価するのに対し、CEUSは約1分程度までの血流変化をリアルタイムに評価するため、わずかな血流の差を鋭敏にとらえやすいことによると考えられる。一方でCEUSは深部病変やS8横隔膜直下で十分超音波が照射できない部位など、評価困難な部位が存在する。そのため、造影超音波検査で乏血性と診断された14結節においても、CTでは28.6% (4結節), MRIでは14.3% (2結節)が多血性と診断できていた(図3)。

同様にMRIで乏血性と診断された21結節のう

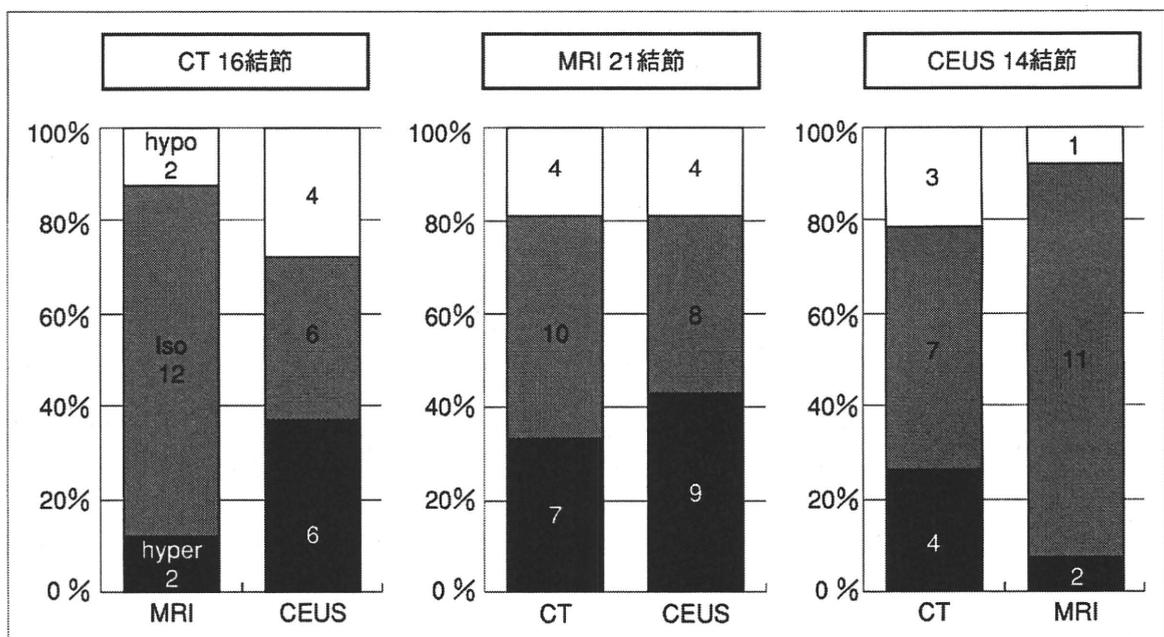


図3 検査手法別乏血性肝癌の他モダリティーの評価

ち33.3% (7 結節)はCTで、42.9% (9 結節)はCEUSで多血性と診断できた。またCTで乏血性と診断された16結節では、MRIで12.5% (2 結節)、CEUSでは37.5% (6 結節)が多血性と診断できるなど、相補的な画像評価により感度の上昇が期待できた(図3)。

以上のように、早期肝癌の診断は、CTやMRIに加えてCEUSを行うことにより、より正確な診断が可能となる。

Kupffer相の評価と意義

肝細胞癌では、悪性度が進行するとKupffer細胞数が減少することが報告されている⁶⁾。これはsuperparamagnetic iron oxide (SPIO)造影MRIでさらに裏づけされ、SPIOのKupffer細胞への取り込みの低下が、肝細胞癌の多段階発癌の過程で多血化するのとはほぼ同じ時期か、やや遅れて低下するようである⁴⁾⁷⁾。LevovistやSonazoid造影超音波検査も同様である⁸⁾⁹⁾。以上、早期肝細胞癌の時期にはKupffer細胞数の減少はまだ認められないか、あるいは減少を認めたとしてもわずかであり、造影超音波検査の感度が及ばない可能性があり、判定はきわめて困難であるといわざるを得ない。

一方、肝癌スクリーニングに期待されるEOB-MRIの肝細胞造影相では、早期肝癌の前段階であるDNの時期より低輝度となるものが多いことが明らかとなってきた。これはgadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine pentaacetic acid (Gd-EOB-DTPA)の肝細胞への取り込みが低下することによって考えられるが、この機序については、OATP1B3 (OATP8)などのトランスポーターの発現の関与などが報告されてきているものの¹⁰⁾¹¹⁾、いまだ十分な解明には至っていない。EOB-MRIで指摘された病変には、10mm未満の治療時期尚早と考えられるようなものも多い。このような境界病変では小病変が多いため、腫瘍生検を施行してもサンプリングエラーの可能性も高く、また病理診断も困難である。

以上より、Kupffer細胞の低下を鋭敏に評価できるSonazoid CEUSの意義は大きい。すなわち乏血性結節であってもKupffer細胞が減少(もしくはKupffer機能の低下)する時期をとらえることが

できれば、最適な治療時期の診断に有用である。特に20mm程度の乏血性肝癌のradiofrequency ablation (RFA)治療は、手術と同等の成績が期待できる。手技も容易であり、患者に対する負担も少ない。CTのみでフォローし多血化まで経過観察していると、急速に腫瘍が増大することもあり、注意深い観察が必要である。

以上より、Sonazoid CEUSのKupffer相診断の意義はdetectionにとどまらず、さらにEOB-MRIの肝細胞造影相のみで指摘された結節の治療開始時期、肝腫瘍生検時期の決定をするためにも重要である。

Kupffer相の評価方法

Kupffer相で肝細胞癌と診断するためには、腫瘍部の染色の程度が非腫瘍部と比較して低輝度となる必要がある。しかし、Kupffer相での肝実質染色の程度は、腫瘍自体のエコー輝度や肝機能などにより少なからず影響を受けるため、判定にはこれらを考慮する必要がある。評価時間は通常10分以降とされているが、正確に判断するには20分以降が望ましい¹²⁾。特に早期肝細胞癌や高分化型肝細胞癌では、その変化がわずかであるので、10分後では再還流の影響により判定不可能なこともある。

これらの症例に対して、Levovist造影超音波検査の際に使用していたADFモード(TOSHIBA Aplio)やADI(Siemens)で高音圧評価を追加している。高音圧モードはバブルが崩壊した時にでる信号を画像化するため、バブルからの信号だけを検出できるため、背景肝よりの信号の影響を最小限にすることができる。実際に高音圧モードが有効であった肝S7の約20mmの肝細胞癌症例を提示する。この症例では、20分以降のKupffer相を低音圧モードで観察すると等輝度であったが(図4-A)、高音圧モードで観察すると明瞭な低輝度病変であることが診断できた(図4-B)。

このADFを使用したKupffer相評価の有用性を検討するため、Sonazoid造影超音波検査のKupffer相を通常の中低音圧に加えて、ADFモードでの評価もできた80症例99結節(平均年齢69.2歳。男性56人、女性24人)について検討した。B-modeの内訳は高エコー43%、等エコー13%、低エコー

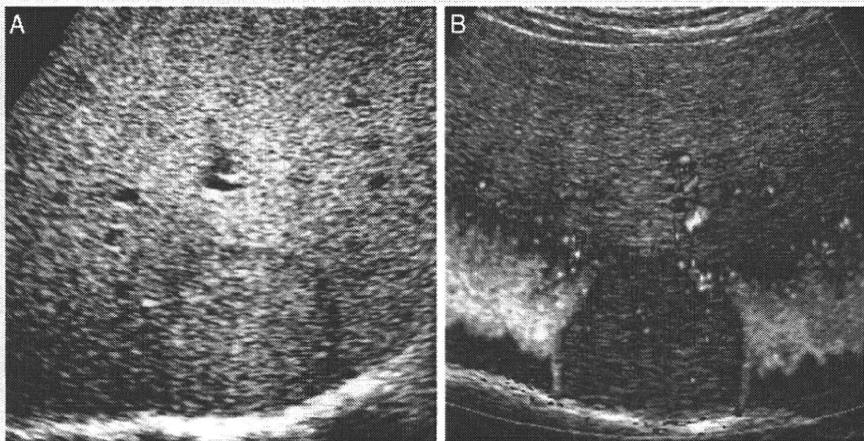


図4 Kupffer相における高音圧法の有効例

29%, モザイク15%であった。低音圧モードによるKupffer相所見が等輝度であった症例はこのうち20結節(20.2%)でみられたが、これらにADFモードを使用することにより、14例が低輝度となり、肝癌の診断感度は80%から94%に改善し有用であった。

Cadence Contrast Pulse Sequencing (Siemens) やCoded phase inversion (GE healthcare) など、組織信号であるB-modeの影響を極力抑える手法もあるが、低音圧での観察で完全にこれらを見逃す機種は、残念ながらない。特に高エコー結節では、B-modeが影響しやすいので、高音圧モードを適宜組み合わせることで評価することが重要である。

低音圧モードと高音圧モード(ADF)でのKupffer相所見乖離例

低音圧モードで低輝度であった79結節のうち、2結節は高音圧モードで等輝度となった。このような乖離がみられる可能性として、肋骨などの影響により十分な音圧の超音波が照射されずバブルの崩壊が得られない場合や、血管相で長時間観察したためバブルが少なくなり高音圧で染色する程度のバブルは腫瘍内に残っているが、低音圧で振るえ画像として描出できる程のバブルの量がないなどが考えられる。

症例は72歳の男性で、S7にCT動脈相で高吸収域(図5-A)、EOB-MRIの肝細胞造影相では低信号の9mmの結節を認めた(図5-B)。この病変はKupffer相の低音圧では低輝度であったが(図

5-C)、高音圧ではこれをとらえることができなかった(図5-D)。これは小結節で肝臓の辺縁に存在していたため、肋骨などの影響により十分な染色が得られなかった可能性がある。

Kupffer相で等輝度の早期肝癌の症例

症例は72歳の男性で、S5に約13mmの典型的なHCCを認め治療となったが(図6-左上)、精査時のEOB-MRIの肝細胞造影相でのみ認められる約10mmの低信号結節をS7に認めた。S7の結節は通常のDynamic CTではどの時相においても指摘できず、CT during arterial portography (CTAP)でも門脈血流低下なく病変を指摘できなかったが、CTHAでのみわずかに低吸収域となる乏血性の結節として指摘できた。この結節は超音波検査のスクリーニングでは指摘できなかったが、その後のB-modeによる精密検査では等エコーないし淡い低エコー結節と確認できた。造影超音波検査を施行したが、低音圧モードでは腫瘍自体を認識できなかった。RFAを施行した際、腫瘍生検を施行し結節の一部に高分化型肝癌を認めた(図6)。

後日RFA治療を施行したが、このように乏血性かつKupffer相でも低輝度とならない結節は、腫瘍のサイズなどを勘案して、腫瘍生検などを含めた検査や治療方針を検討することが望ましい。

まとめ

早期肝細胞癌の造影超音波の意義、検査方法、画像的特徴などについて概説した。肝細胞癌で

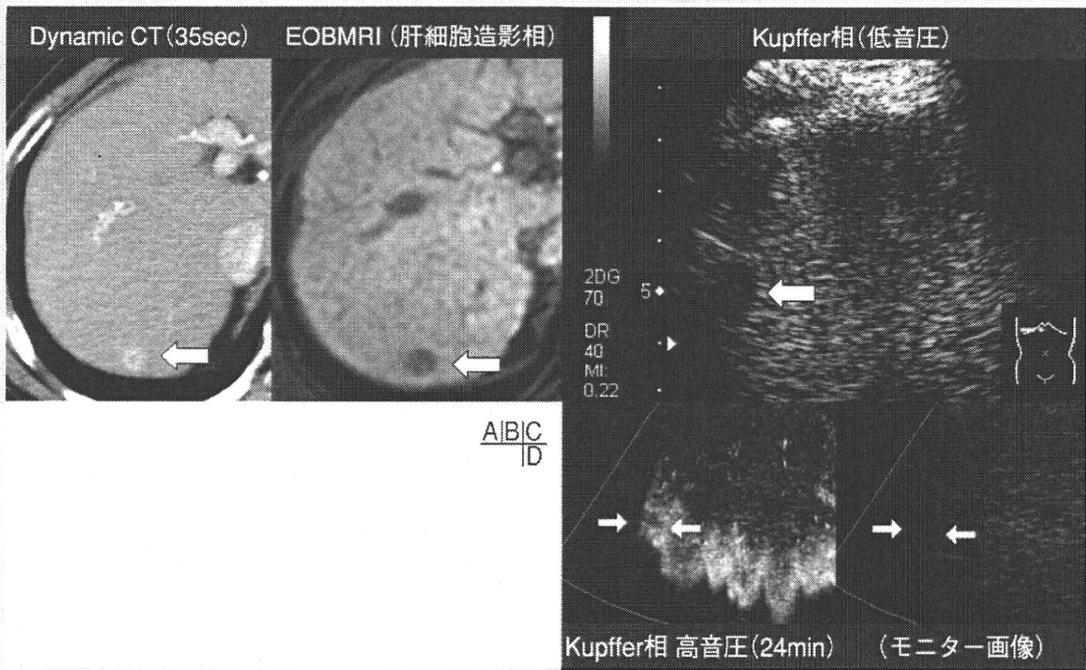


図5 Kupffer相における高音圧モードと低音圧モードの解離例

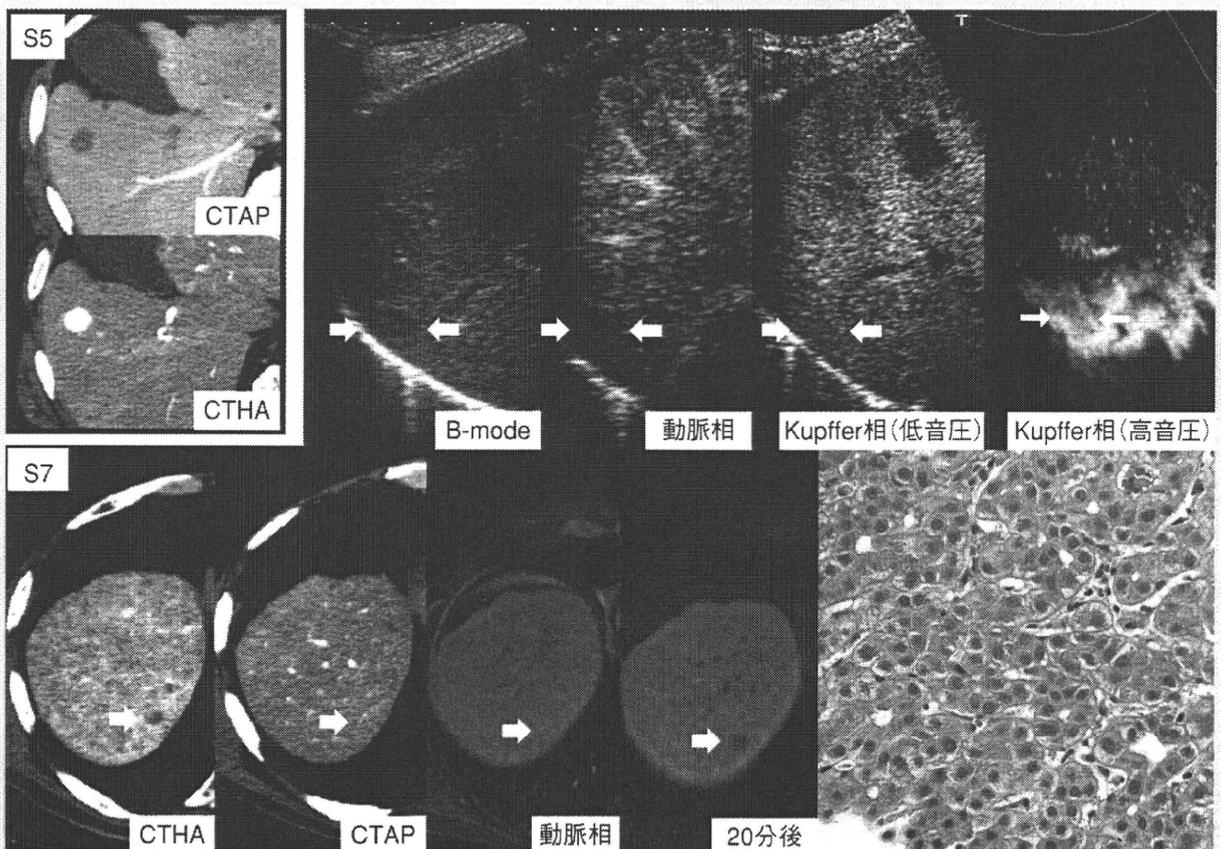


図6 CTHAとEOB-MRIの肝細胞造影相のみで指摘可能だった早期肝癌症例

は境界病変からいわゆる古典的肝癌へと移行してゆく時、動門脈血流が変化するため、検査時期によっても画像所見にも変化を認める。特に

造影超音波検査は肝癌の悪性度を評価する上で重要な血流の多寡を低侵襲で高精度に診断可能であることに加え、Kupffer機能の評価も可能で

あるため、スクリーニングのみならず治療開始時期の決定に十分に活用すべき手法である。

文 献

- 1) Ueda K, Terada T, Nakanuma Y, et al. Vascular supply in adenomatous hyperplasia of the liver and hepatocellular carcinoma : a morphometric study. *Hum Pathol* 1992 ; 23 : 619.
- 2) Ueda K, Matsui O, Kawamori Y, et al. Differentiation of hypervascular hepatic pseudolesions from hepatocellular carcinoma : value of single-level dynamic CT during hepatic arteriography. *J Comput Assist Tomogr* 1998 ; 22 : 703.
- 3) Hayashi M, Matsui O, Ueda K, et al. Progression to hypervascular hepatocellular carcinoma : correlation with intranodular blood supply evaluated with CT during intraarterial injection of contrast material. *Radiology* 2002 ; 225 : 143.
- 4) Imai Y, Murakami T, Yoshida S, et al. Superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance images of hepatocellular carcinoma : correlation with histological grading. *Hepatology* 2000 ; 32 : 205.
- 5) 田中弘教, 飯島尋子, 齋藤正紀, ほか. Sonazoid 造影超音波による新しい肝癌悪性度分類法の試み. *肝臓* 2009 ; 50 : 397.
- 6) Tanaka M, Nakashima O, Wada Y, et al. Pathomorphological study of Kupffer cells in hepatocellular carcinoma and hyperplastic nodular lesions in the liver. *Hepatology* 1996 ; 24 : 807.
- 7) 今井康陽, 村上卓道, 堀 雅敏, ほか. SPIO造影MRIからみた早期肝細胞癌および多血性肝細胞癌の診断. *消化器画像* 2006 ; 8 : 35.
- 8) Korenaga K, Korenaga M, Furukawa M, et al. Usefulness of Sonazoid contrast-enhanced ultrasonography for hepatocellular carcinoma : comparison with pathological diagnosis and superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images. *J Gastroenterol* 2009 ; 44 : 733.
- 9) Inoue T, Kudo M, Watai R, et al. Differential diagnosis of nodular lesions in cirrhotic liver by post-vascular phase contrast-enhanced US with Levovist : comparison with superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images. *J Gastroenterol* 2005 ; 40 : 1139.
- 10) Kitao A, Zen Y, Matsui O, et al. Hepatocellular carcinoma : signal intensity at gadoteric acid-enhanced MR imaging—correlation with molecular transporters and histopathologic features. *Radiology* 2010 ; 256 : 817.
- 11) Narita M, Hatano E, Arizono S, et al. Expression of OATP1B3 determines uptake of Gd-EOB-DTPA in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2009 ; 44 : 793.
- 12) 田中弘教, 飯島尋子. 肝腫瘍診断および治療支援における造影超音波の基礎—投与法, 装置条件, 時相—. *肝胆膵* 2010 ; 60 : 355.

* * *



RGD–cyclam conjugate: Synthesis and potential application for positron emission tomography

Mathieu Galibert^a, Zhao-Hui Jin^b, Takako Furukawa^b, Toshimitsu Fukumura^b, Tsuneo Saga^b, Yasuhisa Fujibayashi^b, Pascal Dumy^a, Didier Boturyn^{a,*}

^a Département de Chimie Moléculaire, UMR-5250, CNRS–Université Joseph Fourier, Grenoble, France

^b Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2010

Revised 23 July 2010

Accepted 25 July 2010

Available online 3 August 2010

Keywords:

RGD conjugate

Cyclam

DOTA

⁶⁴Cu PET

ABSTRACT

Cyclam and DOTA-containing positron emission tomography radiotracers were prepared by using a modular chemical strategy based on peptide synthesis and chemoselective ligations. These molecules encompass two functional domains, one a tumour 'homing' domain and the other a chelating ligand for copper allowing nuclear imaging of tumours.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In recent years, a series of RGD (Arg–Gly–Asp) peptide conjugates was developed for the non-invasive imaging of tumours through the molecular targeting of $\alpha_v\beta_3$ integrin.¹ Different techniques were used including positron emission tomography (PET),² single photon emission tomography (SPECT),³ magnetic resonance imaging (MRI),⁴ and optical imaging.⁵ Among these methodologies, the most sensitive molecular imaging techniques are the radionuclide-based PET and SPECT imaging modalities.⁶ In particular, PET has emerged as non-invasive imaging technique since the most successful commercial radiopharmaceutical 2-deoxy-2-[¹⁸F]-fluoroglucose is routinely used for clinical evaluation (oncological imaging). At the same time, we and others designed and synthesized multivalent RGD (Arg–Gly–Asp) peptide ligands with enhanced binding affinity for $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins.⁷ We have shown that tetrameric RGD-containing scaffolds exhibit desirable biological properties for tumour imaging⁸ and for targeted drug delivery.⁹ These compounds contain a cluster of four copies of a *cyclo*[-RGDFK-] monomer grafted onto a cyclic decapeptide scaffold (Fig. 1). We recently measured the affinity constant (K_D) of RGD-containing compounds for purified integrins.⁸ K_D values rose from 3.87 nM for tetrameric RGD-containing compound to 41.70 nM for *cyclo*[-RGDFK-].¹⁰ This result agreed well with electronic microscopy study of $\alpha_v\beta_3$ /RGD-peptides. Tetrameric RGD peptide

but not monomeric RGD peptide could form clusters of two integrins.¹⁰ We also hypothesize that the observed multivalent effect could arise from a statistical rebinding of tetrameric-RGD peptide due to the high local concentration of RGD elements.

To further improve the *in vivo* imaging quality by enhancing the signal to noise ratio through the use of tetrameric RGD-containing scaffolds, we herein report the synthesis and applicability for PET imaging. Several reports have focused on the use of ¹⁸F to label RGD-containing probes.¹¹ For instance, molecular imaging using

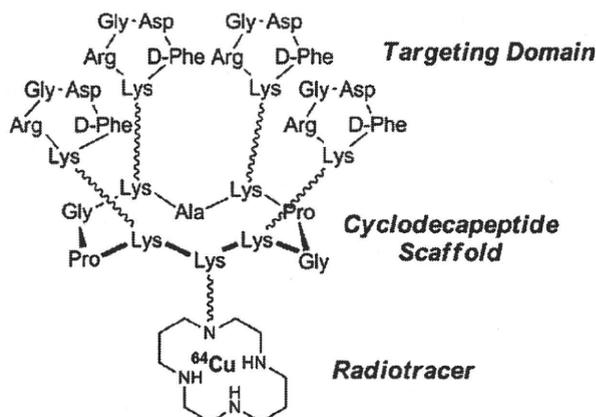
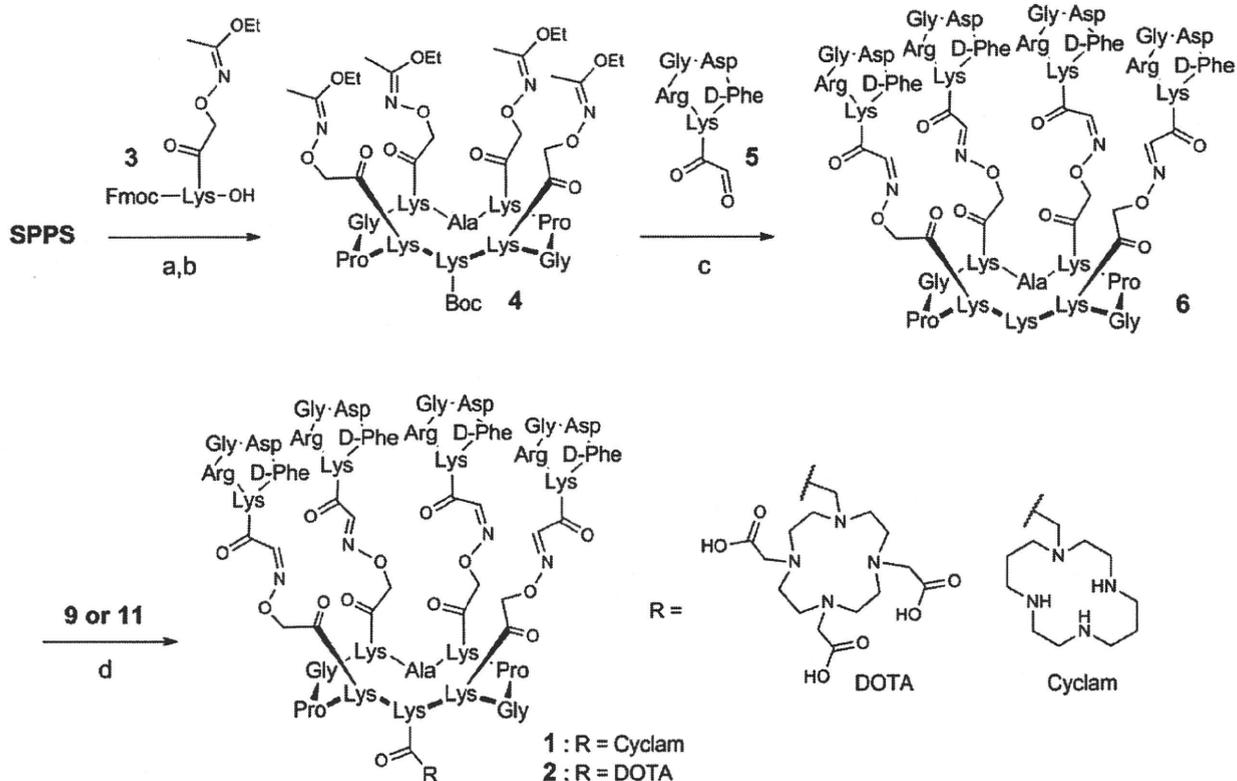


Figure 1. Structure of radiolabelled clustered RGD-containing compound.

* Corresponding author. Address: Département de Chimie Moléculaire, UMR-5250, CNRS–Université Joseph Fourier, 570 rue de la chimie, BP53, 38041 Grenoble cedex 9, France. Tel.: +33 4 56 52 08 32; fax: +33 4 56 52 08 05.

E-mail address: didier.boturyn@ujf-grenoble.fr (D. Boturyn).



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) Standard Fmoc SPPS chemistry; (b) PyBOP, DIPEA, DMF, 30 min; (c) **5** (6 equiv), TFA/H₂O (1:9), 1 h; (d) **9** or **11** (5 equiv), DIPEA (pH 9.0), DMF, 2 h, then TFA/TIS/H₂O (2 vol, 94:3:3), 2 h.

[¹⁸F]-galacto-RGD compound can efficiently show the level of $\alpha_v\beta_3$ expression in man and therefore this radiotracer can be potentially used for planning and controlling $\alpha_v\beta_3$ -targeted therapies.^{11a} Copper-based radiopharmaceuticals are also extensively used for PET. Cu-radionuclides offer a varying range of half-lives and decay forms that make copper an ideal radioisotope for PET imaging and radiotherapy. We decided to use ⁶⁴Cu radiotracer ($t_{1/2} = 12.7$ h), and RGD-containing compounds that exhibit DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) or Cyclam (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) chelate agents were designed (Fig. 1).

Scheme 1 gives an overview of the route to construct RGD conjugates **1–2**. A modular synthesis was adopted: stable oxime bonds were utilized to append aldehyde-bearing RGD motifs to the cyclodecapeptide scaffold prior to grafting copper chelators. All peptides were prepared by means of solid-phase peptide syntheses (SPPS) according to methods already developed by our group.¹² Aminoxy groups were directly incorporated during the SPPS by using the building block **3**. We have previously shown that the 1-ethoxyethylidene protecting group is entirely compatible with the SPPS and prevents the N-overacylation side reaction obtained with Boc protecting group.¹² The following head-to-tail cyclisation was performed in DMF under high dilution with PyBOP reagent as reported^{7d} providing the fully protected cyclodecapeptide **4**. By using a similar synthesis scheme,¹³ RGD compound **5** bearing a glyoxylyl aldehyde group at the lysine side chain was prepared. To append RGD targeting elements to the cyclodecapeptide scaffold, we performed full deprotection of **4** under acidic conditions and its chemoselective ligation with the peptide **5**. RP-HPLC purification afforded the key intermediate **6** in satisfying 70% yield. Compound **6** was characterized by ESI-MS and the observed molecular weight

(3877.0) was found in excellent agreement with the calculated values (3876.9).

In parallel, succinimidyl esters of Cyclam and DOTA were prepared (Scheme 2). Commercially available Cyclam **7** was coupled with ethyl bromoacetate and then treated under alkaline conditions to give the acid **8**. Cyclam **9** was then obtained by using *N*-hydroxysuccinimide and *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide. Starting with acid **10**, we prepared the DOTA compound **11** using the same synthetic strategy. Finally, peptide intermediate **6** was coupled with succinimidyl esters of Cyclam or DOTA under mild condition (pH 8.0) to provide, respectively, the novel RGD-containing compounds **1** and **2** in 70% yields after RP-HPLC. The two conjugates **1** and **2** were characterised without ambiguity by ESI-MS as the deconvoluted masses were in total agreement with the calculated values.

As shown in Figure 2 (right chromatogram), the labelling using the DOTA-containing compound **2** was not complete after 1 h of incubation with ⁶⁴CuCl₂ at 37 °C: a significant amount of free copper remained in the reaction mixture. In contrast, the labelling via cyclam (Fig. 2, left chromatogram) gave no free copper under the same labelling condition. Labelling efficiencies obtained for radiotracers **1** and **2** were approximately 100% and 25%, respectively. Similar results were also revealed from autoradiography of TLC plate (see Supplementary data). Therefore, the use of cyclam as chelating agent for ⁶⁴Cu is far more advantageous than the use of DOTA.

For this reason, we next examined if ⁶⁴Cu radiotracer **1** is applicable for PET. The evaluation was performed on HEK(β_3) or HEK(β_1) ($\alpha_v\beta_3$ -negative control) tumour-bearing mice. The PET image at 5 h post-injection showed a strong tumour uptake in mouse who received a single dose of 3.7 MBq of ⁶⁴Cu radiotracer **1** (Fig. 3). As