

series モデル動物利用マニュアル

生物機能モデルと 新しいリソース・ リサーチツール

● 編集委員 ●

小幡裕一／城石俊彦／芹川忠夫／田中啓二／米川博通

LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER

第1節 マウス
第2項 ヒト型マウス

(3) ヒト肝臓置換ヒト型マウス

1. はじめに

人間が健康的な生活を維持するためには疾病の治療・克服が必要であり、現代においても既知疾患や新規感染症に対して、より効果的でより安全な新薬の開発が途切れることなく続けられている。このような新薬の開発には、ヒトでの有効性や安全性を推測するための実験データが必要であり、多くの場合には実験動物を利用して得られた結果より外挿されている。しかし、実験動物から得られた結果には、種の違いから生じる様々な“差”が含まれており、この差が原因となって新薬開発に遅延が生じるケースは数多く、新薬を待望する人々にとっての障害となっている。このような新薬開発の遅延を防ぐためには、可能な限り早い時点でヒトまたはヒトに限りなく近い環境での実験データを得ることが必要と考えられる。㈱フェニックスバイオ(広島県東広島市)が生産するヒト肝細胞キメラマウスは、ヒト肝細胞がマウス肝臓内で持続的かつ機能的に存在している点で、肝臓に関して限りなくヒトに近い環境を提供するモデル動物である。

このヒト肝細胞キメラマウスの作製には、現在までに少なくとも8つの研究団体が成功している。Dandri¹⁾らドイツのグループおよびMercer²⁾らカナダのグループ(2001年)、我々のグループ³⁾(2004年)、Meuleman⁴⁾らベルギーのグループ(2005年)、Morosan⁵⁾らフランスのグループ(2006年)、Azuma⁶⁾ら米国のグループ(2007年)およびSuemizu⁷⁾ら日本のグループ(2008年)である。これらの団体が生産するヒト肝細胞キメラマウスに

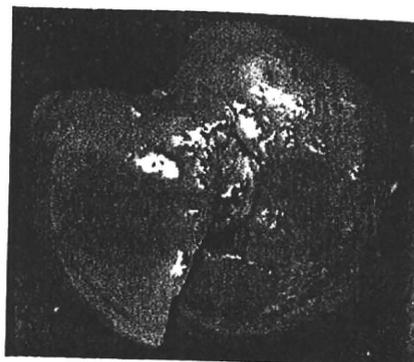


図1 PXBマウス肝臓(13週齢)

70%以上のマウス肝細胞がヒト肝細胞に置換されている。

は、肝障害と免疫不全の形質を併せ持つホストマウスを用いている点とヒト肝細胞を注入移植している点が共通している。我々は、2004年よりヒト肝細胞キメラマウスの生産を開始している。

我々が生産するヒト肝細胞キメラマウスの特徴は、ヒト肝細胞によるマウス肝細胞の置換率が70%以上という基準を満たしている点である(図1)。この基準を満たしたヒト肝細胞キメラマウスを、フェニックスバイオではPXBマウス[®]と称し、ヒト肝細胞に関連する様々な研究を目的とした受託試験に利用可能なリソースとして生産する体制を築いてきた。現在では、1ヵ月あたりのPXBマウスの生産数が150~200匹、総移植動物数に占めるPXBマウスの歩留りがおよそ60%であり、同一のヒト肝細胞ロットによるPXBマウスの供給期間は1年以上という体制が整っている。

本稿では、ヒト肝細胞に関連する研究分野におけるPXBマウスの有用性についてまとめる。

2. PXB マウスの生産

PXB マウスの生産には、ヒト肝細胞とホストマウスが必要となる。我々が PXB マウスの生産に利用しているヒト肝細胞は、インフォームドコンセントに基づいてドナーから提供された米国からの輸入凍結ヒト肝細胞である。

我々が PXB マウスの生産用に用いているホストマウスは、urokinase-type plasminogen activator (uPA) の過剰発現に由来する肝障害の形質を持つマウス (B6SJL-TgN (Alb1Plau) 144Bri, 遺伝子型: $uPA^{+/+}$) と、機能的な T および B リンパ球欠失に由来する重症複合免疫不全の形質を持つマウス (Fox Chase SCID C.B-17/1cr-scid/scid Jcl, 遺伝子型: SCID) の 2 つの系統を交配させることによって得られたマウスであり、遺伝子型は $uPA^{+/+}$ /SCID である。

$uPA^{+/+}$ マウスは、Heckel⁹⁾ らによって作製されたトランスジェニックマウスであり、導入遺伝子には、直列に並んだ 5 つの mouse uPA 遺伝子と albumin enhancer/promoter, さらに human growth hormone (hGH) の配列の一部が含まれている。uPA は生体内において、セリンプロテアーゼ活性によりプラスミノゲンをプラスミンに変換し、フィブリンを溶解する役割を担っている。通常、野生型マウス体内での血漿中 uPA 濃度は 0.5 ng/mL 以下 (ELISA を用いた uPA 濃度測定による) であるが、 $uPA^{+/+}$ マウスでは、胎仔肝細胞でアルブミン産生が開始されると同時に albumin enhancer/promoter によって肝細胞特異的に uPA の産生が誘導されて細胞外に分泌されるため、出生時には uPA が高発現した状態にある。血漿中 uPA 濃度は、出生後にピーク値 5.0 ng/mL と野生型マウスの 10 倍高値を示した後に少しずつ低下する推移を示す⁹⁾。このような胎仔期～新生仔期の uPA 過剰生産によって、 $uPA^{+/+}$ マウスの肝臓は、肉眼的に白色 (図 2) を呈しており、組織学的には肝細胞の細胞

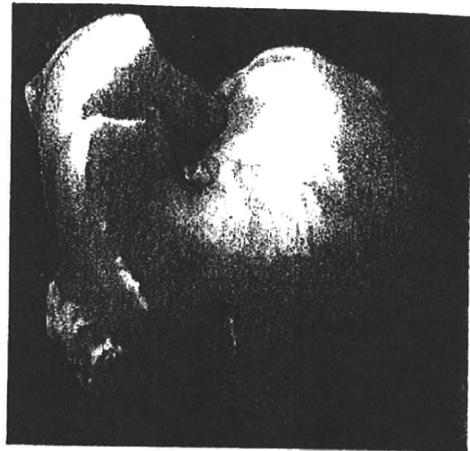


図 2 ホストマウス肝臓(4週齢)
ヒト肝細胞移植前

質に微細な顆粒に取り囲まれた小胞が蓄積している像が確認される⁹⁾。肝機能の指標となる ALT は高値を示しており⁹⁾、肝障害の形質が発現していることが確認できる。また、細胞の有糸分裂機能は正常であるものの、細胞内で発現する uPA によって細胞増殖が抑制され、細胞増殖頻度が低下している⁹⁾。これらの現象が、移植されたヒト肝細胞の増殖に適した生体内環境を提供していると考えられている。一方、 $uPA^{+/+}$ マウスでは、少ない頻度ながらも細胞増殖が成立する過程において、uPA 遺伝子の欠失が起ることが報告されている⁹⁾。本来、直列に 5 つ導入された uPA 遺伝子うちのいくつかは欠失すると、肝細胞内での uPA 発現量が低下し、マウス肝細胞は本来の性状を取り戻して活発な増殖を開始して肉眼的に正常な肝細胞の色調 (小豆色または赤色) を呈する斑状の領域を形成する。この uPA 遺伝子欠失領域は、 $uPA^{+/+}$ マウスにおいて 10 週齢以降に発生することが報告されており⁹⁾、当所におけるホストマウスにおいても同様に確認されている。

ホストマウスに必要な免疫不全の形質を持つ SCID マウスは、Bosma らによって発見された点突然変異体であり、その変異は、DNA 依存性タン

パク質リン酸化酵素のサブユニット P350 に発生している¹⁰⁾。SCID マウスは、機能的な T および B リンパ球を欠くことで重度の免疫不全状態を示し、多くの異種動物間移植実験において利用されている。PXB マウスの生産においても、SCID の形質はヒト肝細胞を寛容するため必須の役割を果たしている。

ヒト肝細胞とホストマウスを利用する移植作業と移植後のモニタリングの内容は、次の通りである。ヒト肝細胞は、移植当日に融解し、浮遊した状態に調製した後に移植に利用する。また、ホストマウスには、週齢 2~4 かつ体重 6~8 g の仔動物を選択している。ホストマウスに麻酔を施した状態で右横臥位に保定し、左側腹部を開腹した後脾臓を露出させる。その後、ヒト肝細胞をマウス 1 匹あたりおよそ $0.2 \sim 1.0 \times 10^6$ cells の細胞数で脾臓内に注入移植し、切開部を縫合する。

脾臓内に注入移植されたヒト肝細胞は、門脈を経由して肝臓に達した後に類洞からディッセ腔へと移動し、その後生着した部位で増殖・分化のサイクルを繰り返すと考えられている。ヒト肝細胞が、ディッセ腔へと到達する詳細なメカニズムは明らかになっていないが、我々は、セリンプロテアーゼ活性を持つ uPA による影響ではないかと考えている。

ディッセ腔に生着・増殖・分化したヒト肝細胞では機能的な細胞活動が営まれるため、主要な遺伝子の発現やタンパク質合成・分泌が観察される。我々は、マウス肝臓組織内に占めるヒト肝細胞の割合の増加に伴って、マウス血液中に分泌されるヒト肝細胞由来タンパク質の濃度が増加することを利用してヒト肝細胞による置換率を予想している。予想に利用しているタンパク質は、ヒトアルブミン (h-Alb) であり、移植後 3 週間以降、血液をサンプルとして免疫比濁法により血中 h-Alb 濃度測定を実施している。図 3 には、PXB マウスの規格 (ヒト肝細胞による予想置換率: 70% 以上, 週齢: 10~14, 体重: 12 g 以上) を満たす個体群

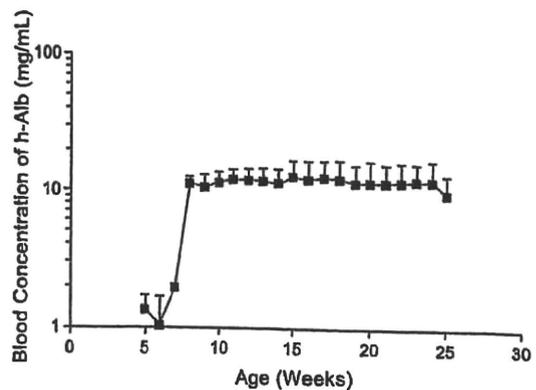


図 3 PXB マウスの血中ヒトアルブミン濃度推移

10 週齢を経過すると血中 h-Alb 濃度は安定して推移する。

での血中 h-Alb 濃度推移を示した。5~9 週齢 (移植後 2~6 週間) にかけて顕著な h-Alb 濃度の上昇が確認される。この時期は PXB マウスの肝臓内でヒト肝細胞が対数増殖期にあると考えている。10 週齢を経過すると、血中 h-Alb 濃度はプラトーに達する。

ヒト肝細胞による置換率の予測は、血中 h-Alb 濃度測定結果とヒト肝細胞置換率測定結果との相関曲線に基づいて実施される。相関曲線を求めるために、ヒト肝細胞に特異的に結合する抗ヒトサイトケラチン 8/18 (hCK8/18) 抗体を用いた免疫組織化学染色によってヒト肝細胞置換率を求めている (図 4)。染色に用いる肝組織片は、1 個体の肝臓につき 7 つの葉から 1 ヶ所ずつ採取しており、各々の試料について hCK8/18 免疫染色を施した後、画像解析によって組織断面積に占めるヒト肝細胞の割合を算出している。図 5 には、5 才、男児、黒人ドナーの肝細胞を用いて作製した PXB マウスの血中 h-Alb 濃度測定結果とヒト肝細胞置換率測定結果との相関曲線を示す。血中 h-Alb 濃度がヒト肝細胞置換率と高い相関関係にあることが明らかであり、その関係が指数関数で示されていることが確認できる。このようなリファレンスデータの収集は、PXB マウス生産用に採用される

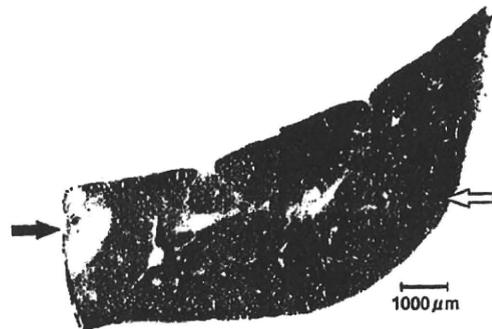


図4 抗ヒトサイトケラチン8/18抗体を用いた免疫組織化学染色

PXB マウスでは70%以上のマウス肝細胞がヒト肝細胞によって置換されている。
黒矢印：マウス肝細胞領域、白矢印：ヒト肝細胞領域

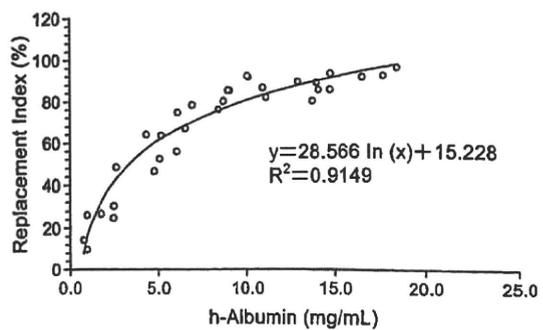


図5 PXBマウスの血中ヒトアルブミン濃度測定結果とヒト肝細胞置換率測定結果との相関曲線

血中ヒトアルブミン濃度とヒト肝細胞置換率が高い相関性を示す。

表1 ホストマウスおよびPXBマウスの飼育条件

仕様	ISO14644-1 清浄度クラス6相当
温度	20～26℃
湿度	42～72%
室圧	ホストマウスコロニーおよびPXBの生産飼育施設では陽圧制御，P2A実験施設では陰圧制御を実施
照明時間	12時間周期(8:00～20:00)
換気	常時換気(HEPAフィルターろ過)
飼育ケージ	ポリカーボネート製マウス用ケージ
床敷	実験動物用床敷ペーパークリーン
飼料	γ線照射滅菌した、げっ歯類用飼料チャールスリバーフォーミュラー(CRF-1)を自由摂取させている。 PXBマウスには特別にビタミンCを添加したCRF-1を与えている。その他、SCIDの形質を持つキメラマウスおよびホストマウスへのカリニ肺炎病原体の感染を防御する目的で、スルフォメトキサゾールおよびトリメトプリム配合した特殊飼料を所定の期間中に給餌している。
飲水	東広島市水道局より供給される水道水をオートクレーブ滅菌した後、次亜塩酸を添加したものをマウス用給水ボトルに容れ、自由摂取させている。

全ての凍結ヒト肝細胞ロットについて個別に実施されている。

3. PXBマウスの飼育

以上に紹介した方法で生産したPXBマウスの飼育は、ホストマウスと共に微生物学的清浄度が

維持されたクリーンルームで行われている(表1)。これは、SCIDの形質を保有する動物を微生物感染から保護することを目的とした対応である。適切な飼育環境を与えることで、PXBマウスは10週間以上安定した体重推移(図6)と血中h-Alb濃度推移(図3)を維持することができる。ただし、死亡率は無処置の飼育期間中であっても1週間におよそ1.5%という数値を示している。

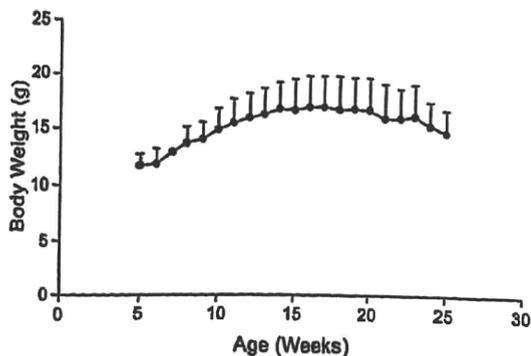


図6 PXB マウスの体重推移

10週齢を経過すると、15g以上の体重を維持する。

4. PXB マウスの実験への利用

PXB マウスには、野生型のマウスに準じて多様な実験処置を施すことが可能である。当所で行っている試験操作の中から、被験物質の投与と生体試料の採取方法について具体例を挙げる。被験物質の投与については、投与経路として経口、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内など一般的な経路の他に、麻酔下動物の静脈内への持続的な投与や肝臓への直接投与などの特殊な経路も選択できる。一般的な投与経路については、1日あたり複数回(3回を上限として設定)の投与や、反復投与(2週間の実施が最も多い)も実施可能である。採取可能な生体試料の項目は、経時/連続採取可能なものとして、血液、胆汁、尿および糞、解剖時には各種組織および器官の採取が可能である。このうち、血液は10 μ L/g BW/1 week、胆汁は5 μ L/h、尿は1.0 mL/24 h、糞は1.5 g/24 hが採取量の目安となっている。これらの操作は、一般状態観察および体重測定によって個体の健康状態を把握しながら実施されている。また、肝炎ウイルスなど感染性微生物を感染させたPXBマウスについては、作業者への感染リスクが大きくなることを事前に判断した上で各種の処置や生体試料の採取を

実施している。なお、当所では、これらPXBマウスの利用方法の詳細について、所内に設けた倫理委員会で審査・承認を行っている。

以降には、PXBマウスの実用例の一部として、特に医薬品開発に関連する薬物代謝、肝毒性および肝炎ウイルスについての研究成果を紹介する。

薬物代謝は、医薬品開発の過程においてヒトでの薬効と毒性を正しく理解するために重要な研究分野である。この分野においてPXBマウスに期待される点は、PXBマウス肝臓内のヒト肝細胞がヒト生体と同様の薬物代謝機能を有していることである。

現在までに当所において生産されたPXBマウスのうち、3ロットの異なるドナー肝細胞を用いて生産されたPXBマウスの肝臓について、DNAアレイ(Affymetrix GeneChip[®] Human Genome U133 plus 2.0 Array, 38,500遺伝子を解析可能)を用いた遺伝子発現解析を実施したところ、PXBマウス肝臓内のヒト肝細胞では、当該アレイに搭載されたヒト遺伝子のうち、70%にあたる遺伝子の発現が確認され、このうち98%に相当する遺伝子については3ロット間の発現量に大きな差(2倍未満または1/2より大きい)は認められなかった。

ヒト肝細胞に発現している多数の分子のうち、薬物代謝酵素に注目すると、第I相反応を担うチトクロームP450(CYP)に含まれる主要な分子種であるCYP1A1, 1A2, 2A6, 3A4, 3A5, 2C9, 2C8, 2C19, および2D6の発現が確認されており^{9), 11)-13)}また、アルデヒドオキシダーゼについても発現が確認されている¹⁴⁾。このうち、CYP2A6, 3A4, 2C8, 2C9, 2C19 および2D6については、PXBマウスの置換率上昇に伴って酵素活性が上昇を示すことが報告されており¹¹⁾、また、CYP2A6, 2C19 および2D6については、ドナーの遺伝子多型由来と考えられる酵素活性の差が確認されている^{11), 15)}。第II相反応を担う酵素については、グルクロン酸抱合酵素(UGT)、硫酸抱合酵素(SULT, CST およびTPST)、アセチル抱合酵素(NAT)、グルタチ

オン抱合酵素(GSTおよびMGST), メチル抱合酵素(COMT, PNMT, TPMT, GAMT, PEMTおよびASMT)に含まれる主要な分子種の発現が確認されている^{12), 16)}。これらの酵素に含まれる分子種のうち, UGT2B7, SULT1A1, SULT1E1およびNAT2については, PXBマウスの置換率上昇に伴って酵素活性が高値を示すことも報告されており¹⁶⁾, NAT2の酵素活性についてはドナー肝細胞の遺伝子多型に由来すると考えられるドナー間差が確認されている¹⁶⁾。化学物質を肝細胞内外に輸送する機能を持つトランスポーターについても, ABCトランスポーター(ABCA), Solute carrierファミリー22(SLC22), 有機アニオントランスポーター(OATP)についてmRNAの発現が確認されている¹²⁾。

このように, PXBマウス肝臓内のヒト肝細胞では, 多数のヒト遺伝子およびタンパク質が発現して機能していることが確認されており, 肝細胞を介する薬物代謝分野の研究において非常に有効なリソースであると考えられる。実際に, ヒトで利用されている医薬品に関連する研究として, Cefmetazole¹⁷⁾ や Warfarin^{18), 19)} の体内動態(吸収, 代謝, 分布および排泄を含む)が, ヒト肝細胞の機能を反映していることが確認されている。また, ヒト臨床で薬物相互作用の1つとして問題となっている酵素誘導については, PXBマウスにRifampicinまたはRifabutinを反復投与した後にCYP3A4のmRNA発現量, タンパク質発現量およびタンパク質活性が増加することが確認されている^{3), 20)-22)}。これらの研究報告は, PXBマウスがヒト臨床での薬物相互作用の解析・研究において有用であることを示すデータと考えられる。

肝毒性研究分野では, 医薬品や臨床試験段階にある化合物によって発生する肝障害が, ヒトの健康や製薬企業の医薬品開発に重大な影響を与えるため, PXBマウスを含む新しいリソースの登場によって, ヒトでの肝毒性発生を精度よく予測できることが期待されている。しかし, ヒト肝細胞キメラマウスには, 肝毒性評価にあたって考慮すべ

き課題が3点挙げられる。1点目は, PXBマウスではuPA発現によってマウス肝細胞に障害が発生しているため, 無処置でも血漿中ASTやALT測定値が高値を示し, またマウス肝細胞由来のASTとALTはヒト肝細胞に由来するこれら逸脱酵素と区別することが困難な点である(表2)。PXBマウスを利用してヒト肝細胞への毒性を検討する際には, これらマウス肝細胞由来の逸脱酵素の測定値のペースが高いことを踏まえ, 被験物質の投与前後で同一個体での逸脱酵素の推移を確認することや組織観察によって肝障害の局在を確認することが必要と考えられる。2点目は, PXBマウスが免疫不全の形質を持つために, 免疫系が関

表2 PXBマウスの血液生化学データ

項目	単位	平均 ± 標準偏差
GOT/AST	(U/l)	437.2 ± 504.8
GPT/ALT	(U/l)	280.3 ± 280.2
GGT	(U/l)	52.2 ± 24.0
CPK	(U/l)	275.4 ± 134.8
LDH	(U/l)	1165.9 ± 799.7
ALP	(U/l)	874.0 ± 421.1
LAP	(U/l)	86.6 ± 28.6
CHE	(U/l)	417.3 ± 82.4
AMYL	(U/l)	977.3 ± 363.3
BUN	(mg/dL)	35.6 ± 21.4
TCHO	(mg/dL)	135.3 ± 50.0
HDL-C	(mg/dL)	31.3 ± 15.2
TG	(mg/dL)	96.9 ± 37.3
TBIL	(mg/dL)	0.7 ± 0.4
DBIL	(mg/dL)	0.1 ± 0.0
GLU	(mg/dL)	118.3 ± 36.9
UA	(mg/dL)	3.5 ± 1.9
ALB	(g/dL)	2.7 ± 1.3
TP	(g/dL)	4.9 ± 0.4
CRE	(mg/dL)	255.6 ± 260.3
Ca	(mg/dL)	10.1 ± 1.2
IP	(mg/dL)	9.5 ± 1.6
Mg	(mg/dL)	2.6 ± 0.9

与する毒性の再現が困難な点、また3点目はPXBマウスの肝臓でヒト由来の成分は肝細胞のみであり、間質細胞はマウスに由来する点である。現在では、肝毒性発生の過程に免疫系や間質細胞が複雑に関与している可能性が示唆されているが、PXBマウスを用いてこのような肝毒性の全ての過程を再現することは困難である。現在、我々は業務提携先である積水メディカル㈱と共同して、PXBマウスを用いてヒト肝細胞を対象としたトキシコゲノミクスの構築を進めている。ヒト肝細胞での遺伝子発現の変化を基に、肝毒性発生を予想できるシステムとなることを期待したい。

肝炎ウイルス研究分野での利用は、PXBマウスの有効性が最も発揮されている例である。ヒト肝細胞キメラマウスが登場するまでは、チンパンジー以外に実用的なモデル動物が存在しなかった状況であったため、C型肝炎ウイルス(HCV)およびB型肝炎ウイルス(HBV)の2種類のウイルスに持続感染することが可能であり、またヒト臨床で使用されている代表的な治療薬の薬効が再現される点がPXBマウスの最大のアドバンテージとなっている。

HCV ジェノタイプ 1b を感染させて作製した HCV 感染 PXB マウスモデルを利用して、HCV 治療薬である Peg-IFN α -2a による応答性を確認した試験の例を図 7 に示す。この試験では、HCV 感染 PXB マウスに、30 μ g/kg の Peg-IFN α -2a を 1 週間に 2 回の頻度で 2 週間反復皮下投与した後に 2 週間の休薬期間を設けた。その結果、Peg-IFN α -2a の投与によって血清中の HCV RNA 濃度は速やかに減少し、投与終了後には血清中 HCV RNA 濃度の回復が確認された。HCV 感染 PXB マウスモデルを用いた HCV 治療薬の評価に関しては、当社での検討の他に Myriocin (Serine palmitoyltransferase inhibitor)²³⁾、17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (HSP90 inhibitor)²⁴⁾、DEBIO-025 (Cyclophilin inhibitor)²⁵⁾ を検討した結果についても報告されている。

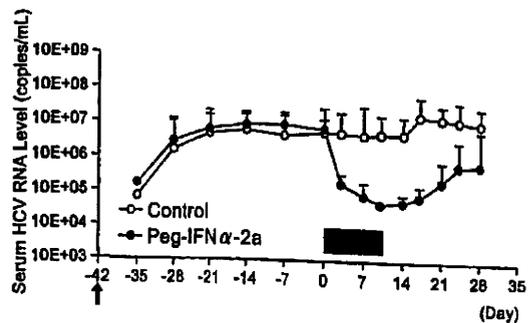


図 7 HCV 感染 PXB マウスモデルでの Peg-IFN α -2a 応答性

Peg-IFN α -2a により血清中 HCV RNA 濃度が減少する。
矢印：HCV 接種、灰色：Peg-IFN α -2a 投与期間。

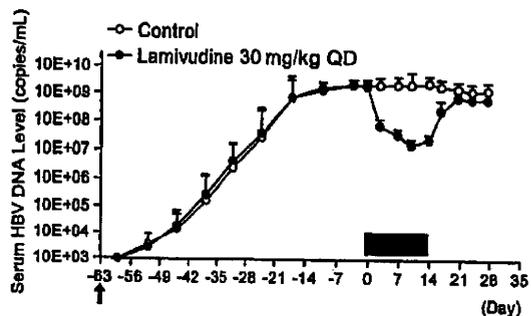


図 8 HBV 感染 PXB マウスモデルでの Lamivudine 応答性

Lamivudine により血清中 HBV DNA 濃度が減少する。
矢印：HBV 接種、灰色：Lamivudine 投与期間

HBV ジェノタイプ C を感染させて作製した HBV 感染 PXB マウスモデルを利用して、HBV 治療薬である Lamivudine への応答性を確認した試験の例を図 8 に示す。この試験では、Lamivudine の 30 mg/kg を 1 日 1 回の頻度で 2 週間反復経口投与した後に 2 週間の休薬期間を設けた。その結果、Lamivudine 投与によって血清中の HBV DNA 濃度は緩やかに減少し、投与終了後は血清中 HBV DNA 濃度が速やかに回復した。HBV 感染 PXB マウスモデルに対する Lamivudine の薬効に関しては、当社での検討の他に、Lamivudine 耐性 HBV を感染させた PXB マウスでは Lamivudine の抗 HBV 効果が減弱することが確認されている²⁶⁾。

5. おわりに

ヒト肝細胞研究のための新しいリソースとして、ヒト肝細胞キメラマウスは様々な研究分野で成果を上げている。今後、現状の uPA^{+/+}/SCID マウスが抱えるいくつかの問題点、PXB マウスの用途上の制約を克服すべく研究開発を続けていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Dandri M., Burda M. R., Török E., et al.: Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and *in vivo* infection with hepatitis B virus. *Hepatology*, 33: 981-988, 2001.
- 2) Mercer D. F., Schiller D. E., Elliott J. F., et al.: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.*, 7: 927-933, 2001.
- 3) Tateno C., Yoshizane Y., Saito N., et al.: Near Completely Humanized Liver in Mice Shows Human-Type Metabolic Responses to Drugs. *Am. J. Pathol.*, 165: 901-912, 2004.
- 4) Meuleman P., Libbrecht L., De Vos R., et al.: Morphological and Biochemical Characterization of a Human Liver in a uPA-SCID Mouse Chimera. *Hepatology*, 41: 847-856, 2005.
- 5) Morosan S., Hez-Deroubaix S., Lunel F., et al.: Liver-stage development of *Plasmodium falciparum*, in a humanized mouse model. *J. Infect. Dis.*, 193: 996-1004, 2006.
- 6) Azuma H., Paulk N., Ranade A., et al.: Robust expansion of human hepatocytes in *Fah^{-/-}/Rag2^{-/-}/Il2rg^{-/-}* mice. *Nat. Biotechnol.*, 8: 903-910, 2007.
- 7) Suemizu H., Hasegawa M., Kawai K., et al.: Establishment of a humanized model of liver using NOD/Shi-scid IL2R^{nu} mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377: 248-252, 2008.
- 8) Heckel J. L., Sandgren E. P., Degen J. L., et al.: Neonatal Bleeding in Transgenic Mice Expressing Urokinase-Type Plasminogen Activator. *Cell*, 62: 447-456, 1990.
- 9) Sandgren E. P., Palmiter R. D., Heckel J. L., et al.: Complete Hepatic Regeneration after Somatic Deletion of an Albumin-Plasminogen Activator Transgene. *Cell*, 66: 245-256, 1991.
- 10) Kirchgessner C. U., Patil C. K., Evans J. W., et al.: DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science*, 267: 1178-1183, 1995.
- 11) Kato M., Matsui T., Nakajima M., et al.: Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with human liver. *Drug Metab. Dispos.*, 32: 1402-1410, 2004.
- 12) Nishimura M., Yoshitsugu H., Yokoi T., et al.: Evaluation of mRNA expression of human drug-metabolizing enzymes and transporters in chimeric mouse with humanized liver. *Xenobiotica*, 35: 877-890, 2005.
- 13) Uno S., Endo K., Ishida Y., et al.: CYP1A1 and CYP1A2 expression: comparing 'humanized' mouse lines and wild-type mice; comparing human and mouse hepatoma-derived cell lines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 237: 119-126, 2009.
- 14) Kitamura S., Nitta K., Tayama Y., et al.: Aldehyde oxidase-catalyzed metabolism of N1-methylnicotinamide *in vivo* and *in vitro* in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab. Dispos.*, 36: 1202-1205, 2008.
- 15) Katoh M., Sawada T., Soeno Y., et al.: *In vivo* drug metabolism model for human cytochrome P450 enzyme using chimeric mice with humanized liver. *J. Pharm. Sci.*, 96: 428-437, 2007.
- 16) Katoh M., Matsui T., Okumura H., et al.: Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab. Dispos.*, 33: 1333-1340, 2005.
- 17) Okumura H., Katoh M., Sawada T., et al.: Humanization of excretory pathway in chimeric mice with humanized liver. *Toxicol. Sci.*, 97: 533-538, 2007.
- 18) Inoue T., Nitta K., Sugihara K., et al.: CYP2C9-Catalyzed Metabolism of S-Warfarin to 7-Hydroxywarfarin *in Vivo* and *in Vitro* in Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug Metab. Dispos.*, 36: 2429-2433, 2008.
- 19) Inoue T., Sugihara K., Ohshita H., et al.: Prediction

- of Human Disposition toward S-3H-Warfarin using Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 24 : 153-160, 2009.
- 20) Katoh M., Matsui T., Nakajima M., et al. : *In vivo* induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab. Dispos.*, 33 : 754-763, 2005.
- 21) Katoh M., Watanabe M., Tabata T., et al. : *In vivo* induction of human cytochrome P450 3A4 by rifabutin in chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica*, 35 : 863-875, 2005.
- 22) Emoto C., Yamato Y., Sato Y., et al. : Non-invasive method to detect induction of CYP3A4 in chimeric mice with a humanized liver. *Xenobiotica*, 38 : 239-248, 2008.
- 23) Umehara T., Sudoh M., Yasui F., et al. : Serine palmitoyltransferase inhibitor suppresses HCV replication in a mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 346 : 67-73, 2006.
- 24) Nakagawa S., Umehara T., Matsuda C., et al. : Hsp90 inhibitors suppress HCV replication in replicon cells and humanized liver mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353 : 882-888, 2007.
- 25) Inoue K., Umehara T., Ruegg U. T., et al. : Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice *in vivo*. *Hepatology*, 45 : 921-928, 2007.
- 26) Yatsuji H., Noguchi C., Hiraga N., et al. : Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50 : 3867-3874, 2006.

(加国雅和/立野知世)

Tumor-related factors do not influence the prognosis of solitary hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy

Tsuyoshi Kobayashi · Toshiyuki Itamoto · Hirotaka Tashiro · Hironobu Amano · Akihiko Oshita · Yoshisato Tanimoto · Shintaro Kuroda · Hirofumi Tazawa · Hideki Ohdan

© Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery and Springer 2011

Abstract

Background/purpose Although many factors related to the tumor or the hepatic functional reserve may affect the outcome of partial hepatectomy for hepatocellular carcinoma (HCC), these factors have not yet been intensively investigated in patients with solitary HCC. The purpose of this study is to determine the clinicopathological factors influencing the long-term outcomes of partial hepatectomy for solitary HCC. **Methods** Data on 266 consecutive patients with a solitary HCC who underwent curative hepatectomy between 1997 and 2006 were analyzed with regard to prognosis.

Results Overall survival rates at 3, 5, and 10 years were 89.5, 79.6, and 56.1%, respectively. The significant independent predictors for overall survival included hepatitis C virus infection, liver cirrhosis, and prolonged prothrombin activity. Disease-free survival rates at 3, 5, and 10 years were 51.7, 41.1, and 20.4%, respectively. The significant independent predictors for disease-free survival included elevated levels of aspartate amino transferase, decreased platelet counts, presence of liver cirrhosis, and prolonged prothrombin activity. Tumor-related factors such as tumor size and microscopic vascular invasion were not significant predictors of overall or disease-free survival.

Conclusions The long-term outcomes of patients with a solitary HCC who underwent partial hepatectomy mainly depended on the background liver status but not on tumor-related factors; this suggests that partial hepatectomy is a remarkably effective antitumor therapy. If the hepatic functional reserve is within the permissible range, partial hepatectomy should be considered as the treatment of choice for patients with a solitary HCC.

T. Kobayashi (✉) · T. Itamoto · H. Tashiro · H. Amano · A. Oshita · Y. Tanimoto · S. Kuroda · H. Tazawa · H. Ohdan
Department of Surgery, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Science, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan
e-mail: tsukoba@hiroshima-u.ac.jp

T. Itamoto
e-mail: t-itamoto@hph.pref.hiroshima.jp

H. Tashiro
e-mail: htashiro@hiroshima-u.ac.jp

H. Amano
e-mail: amanojack@star.odn.ne.jp

A. Oshita
e-mail: aoshita@hiroshima-u.ac.jp

Y. Tanimoto
e-mail: tanimoto12671@yahoo.co.jp

S. Kuroda
e-mail: df26@smn.enjoy.ne.jp

H. Tazawa
e-mail: thiroes@trad.ocn.ne.jp

H. Ohdan
e-mail: hohdan@hiroshima-u.ac.jp

Keywords Solitary hepatocellular carcinoma · Partial hepatectomy · Prognostic factor · Hepatic functional reserve · Tumor-related factor

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common malignancy worldwide [1]. Several modalities have been used for treating HCC, including partial hepatectomy, orthotopic liver transplantation, radiofrequency ablation therapy, and transarterial chemoembolization therapy. Partial hepatectomy is the preferred treatment for patients with resectable HCC and offers low mortality and favorable long-

term survival. However, the long-term survival rate remains unsatisfactory, mainly because of the high incidence of recurrence and metastasis after partial hepatectomy [2].

Several prognostic factors that negatively influence the outcomes of patients with HCC who undergo partial hepatectomy have been reported [3, 4]. They include the presence of cirrhosis, hepatitis C virus (HCV) infection, large tumors, bilobar distribution, multiple lesions, vascular invasion, pathological tumor–node–metastasis (pTNM) stage, surgical margin, high alpha-fetoprotein (AFP) level, and tumor differentiation [5, 6]. Although several tumor-related factors such as tumor size and microvascular invasion are recognized as significant adverse prognostic factors, it is still controversial whether these factors independently influence long-term outcomes of curative resection of a solitary HCC [7–9]. The purpose of this study was to determine the clinicopathological factors influencing the long-term outcomes of solitary HCC in patients undergoing curative hepatectomy.

Materials and methods

Patients

Between January 1997 and December 2006, 496 consecutive patients with primary HCC underwent hepatectomies in our hospital. We defined solitary HCC as a single tumor, without macroscopic vascular invasion and without distant metastasis, based on radiological imaging prior to surgery. Macroscopic vascular invasion was defined as a tumor invasion or a tumor thrombus in the vessels visible on radiological imaging prior to surgery. Microscopic vascular invasion was defined as a tumor invasion or a tumor thrombus in the vessels visible only on microscopy. We excluded 224 patients with multiple tumors, 1 with macroscopic vascular invasion, 3 with distant metastases, and 2 undergoing hepatectomies with intraoperative ablation therapy. Finally, 266 patients with a solitary HCC were enrolled in this retrospective study.

The patients' characteristics are shown in Table 1. A total of 182 patients (68.4%) were positive for HCV infection, 232 (87.2%) had viral hepatitis, and 259 (97.3%) had chronic liver disease.

Clinicopathological variables for age, gender, presence of viral hepatitis B and C, presence of diabetes mellitus, preoperative transarterial chemoembolization, preoperative liver function tests, Child–Pugh class, preoperative AFP and des-gamma-carboxy prothrombin (DCP) levels, types of hepatectomy, tumor characteristics according to the Liver Cancer Study Groups of Japan, and pathological findings of the resected specimen were obtained and analyzed [10]. Liver cirrhosis, microscopic vascular invasion,

Table 1 Patients' characteristics ($n = 266$)

Variables	Number of patients (%)
Age (years) ^a	65.3 ± 9.7 (23–86)
Gender	
Male	186 (69.9)
Female	80 (30.1)
Serology of viral hepatitis	
HBV only	50 (18.8)
HCV only	177 (66.5)
HBV + HCV	5 (1.9)
No infection	34 (12.8)
Child–Pugh classification	
A	236 (88.7)
B	30 (11.3)
Background liver status	
Normal liver	2 (0.8)
Chronic hepatitis or liver fibrosis	148 (55.6)
Liver cirrhosis	111 (41.7)
Unknown	5 (1.9)
Tumor size (mm) ^a	31.3 ± 18.6 (6–125)
Type of hepatectomy	
Limited resection	156 (58.6)
Segmentectomy	68 (25.6)
Sectionectomy	24 (9.0)
Hemihepatectomy	18 (6.8)

^a Mean ± SD (range)

and intrahepatic metastasis were obtained by histological examination of resected specimens. Experimental protocols were approved by the institutional review committee and met the guidelines of responsible governmental agency.

Hepatectomy

The indications for partial hepatectomy have been previously described [11]. The type of hepatectomy was decided on the basis of liver functional reserve and location of the tumor. Liver functional reserve was assessed on the basis of the Child–Pugh classification and the indocyanine green retention rate at 15 min (ICG-R15) [12]. Child–Pugh class C was regarded as a contraindication for partial hepatectomy. Types of hepatectomy were defined as follows: limited resection, a resection of less than 1 segment according to Couinaud's segmentation; segmentectomy, a resection of 1 segment according to Couinaud's segmentation; sectionectomy, a resection of 1 of the 4 sections (lateral, medial, anterior, or posterior) of the liver; and hemihepatectomy, a resection of the right or left hemiliver, according to the Brisbane 2000 terminology [13, 14]. The types of hepatectomy were selected as follows. If liver function permitted, anatomical resection (segmentectomy, sectionectomy, or

hemihepatectomy) was performed. In patients with insufficient hepatic functional reserve, limited resection was performed. For example, right hemihepatectomy could be tolerated if the ICG-R15 value was in the normal range. One-third of the liver parenchyma could be resected for patients with an ICG-R15 value between 10 and 19%. Segmentectomy could be tolerated by patients with an ICG-R15 value between 20 and 29%, and limited resection was indicated for patients with an ICG-R15 value of 30% or more. The types of hepatectomy performed are shown in Table 1.

Follow-up

The follow-up evaluation after surgery consisted of clinical physical examinations, blood chemistry tests, and measurements of the levels of tumor markers, including AFP and DCP, every month for 2 years. After 2 years, the patients were assessed every 3 months. Patients were examined by ultrasonography every 3 months and by computed tomography every 6 months. When recurrence was indicated by any of these examinations, the patients underwent hepatic angiography. If all recurrent tumors could be resected within the hepatic functional reserve, repeat hepatectomy was indicated. If they could not be resected within the hepatic functional reserve, the patients underwent percutaneous radiofrequency ablation or transarterial chemoembolization therapy. The median follow-up period for survivors was 45.2 months (range 1–120 months).

Statistical analysis

Overall survival rates and disease-free survival rates were calculated using the Kaplan–Meier method and were compared using the log-rank test. Disease-free survival rates were calculated by considering any deaths or recurrences as an event. The continuous variables were dichotomized based on the receiver operating characteristic curve analysis [15]. Independent prognostic factors were assessed using the multivariate Cox proportional hazards model among the variables found to be significant by univariate analysis. Statistical significance was defined as a *p* value less than 0.05. All statistical analyses were performed using SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

No patient died within 1 month after partial hepatectomy, although 2 patients died of liver failure during the initial hospital stay (in-hospital mortality rate 0.8%). At the time of the last follow-up examination, 79 of 266 patients had died, and the causes of deaths were cancer progression in 38 patients (14.3%), liver failure in 12 patients (4.5%),

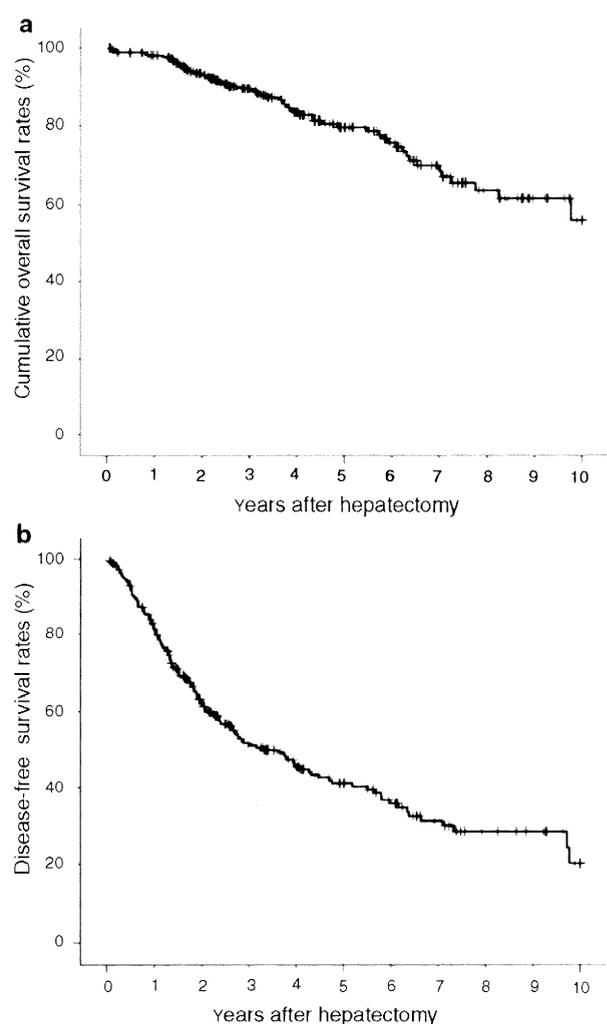


Fig. 1 The overall (a) and disease-free (b) survival curves of 266 patients with a solitary HCC after partial hepatectomy

bleeding from the gastrointestinal tract in 4 patients (1.5%), and other diseases in 25 patients (9.4%). The cumulative overall survival rates at 3, 5, and 10 years after partial hepatectomy were 89.5, 79.6, and 56.1%, respectively. The corresponding disease-free survival rates were 51.7, 41.1, and 20.4%, respectively (Fig. 1).

Table 2 shows a summary of the results of the univariate analyses for overall survival rates and disease-free survival rates according to the clinicopathological factors. HCV infection ($p = 0.003$), a platelet count of $<100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p = 0.001$), prothrombin activity of $<80\%$ ($p = 0.001$), an aspartate aminotransferase (AST) level of ≥ 50 IU/l ($p = 0.002$), an albumin level of <3.5 g/dl ($p < 0.001$), an ICG-R15 of $\geq 20\%$ ($p < 0.001$), an AFP level of ≥ 100 ng/ml ($p = 0.004$), a limited resection ($p = 0.011$), and the presence of cirrhosis in the background liver ($p < 0.001$) were significant adverse prognostic factors for overall survival. In

Table 2 Overall and disease-free survival rates according to clinicopathological factors

	Overall survival (%)			Disease-free survival (%)		
	3-year	5-year	<i>p</i> value	3-year	5-year	<i>p</i> value
All cases (<i>n</i> = 266)	89.5	79.6	–	51.7	41.1	–
Age (years)			0.564			0.336
<65 (<i>n</i> = 102)	89.1	82.4		53.4	43.7	
≥65 (<i>n</i> = 164)	89.7	77.7		50.5	39.1	
Gender			0.101			0.647
Male (<i>n</i> = 186)	89.8	83.3		52.9	41.2	
Female (<i>n</i> = 80)	88.8	69.4		49.4	41.6	
HCV infection			0.003			0.034
Negative (<i>n</i> = 84)	92.2	88.2		61.2	47.7	
Positive (<i>n</i> = 182)	88.0	75.3		46.9	37.8	
Diabetes mellitus			0.552			0.627
No (<i>n</i> = 188)	88.3	78.7		53.4	42.9	
Yes (<i>n</i> = 72)	92.0	83.8		48.8	40.2	
Preoperative TACE			0.526			0.417
No (<i>n</i> = 121)	90.4	80.9		50.7	44.1	
Yes (<i>n</i> = 145)	88.5	78.5		52.2	39.2	
Platelet count ($\times 10^3/m^3$)			0.001			<0.001
<100 (<i>n</i> = 95)	85.9	65.8		39.4	27.1	
≥100 (<i>n</i> = 171)	91.4	86.5		58.3	48.4	
Prothrombin activity (%)			0.001			0.004
<80 (<i>n</i> = 99)	81.8	71.2		42.0	31.4	
≥80 (<i>n</i> = 167)	94.7	85.9		57.7	48.1	
Total bilirubin level (mg/dl)			0.555			0.196
<1.0 (<i>n</i> = 182)	88.5	81.6		53.4	43.1	
≥1.0 (<i>n</i> = 84)	91.2	75.6		48.1	36.9	
AST (IU/l)			0.002			<0.001
<50 (<i>n</i> = 181)	89.9	84.3		59.5	49.2	
≥50 (<i>n</i> = 85)	88.6	68.6		33.3	22.6	
ALT (IU/l)			0.077			0.023
<50 (<i>n</i> = 174)	88.5	82.0		57.6	44.9	
≥50 (<i>n</i> = 92)	91.2	75.3		41.0	34.1	
Albumin level (g/dl)			<0.001			0.024
<3.5 (<i>n</i> = 57)	77.2	64.3		39.2	29.1	
≥3.5 (<i>n</i> = 209)	92.8	83.8		55.1	44.4	
ICG-R (%)			<0.001			0.007
<20 (<i>n</i> = 170)	93.1	85.9		57.7	45.2	
≥20 (<i>n</i> = 96)	82.9	68.1		41.0	33.9	
Child–Pugh			0.108			0.233
A (<i>n</i> = 236)	89.9	80.3		53.3	42.9	
B (<i>n</i> = 30)	85.7	74.9		38.2	27.3	
AFP (ng/ml)			0.004			0.426
<100 (<i>n</i> = 185)	92.6	86.8		54.5	41.1	
≥100 (<i>n</i> = 81)	82.9	64.9		45.6	41.5	
DCP (mAU/ml)			0.115			0.054
<100 (<i>n</i> = 166)	88.6	77.2		46.0	36.5	
≥100 (<i>n</i> = 98)	91.0	83.6		60.2	47.6	

Table 2 continued

	Overall survival (%)			Disease-free survival (%)		
	3-year	5-year	<i>p</i> value	3-year	5-year	<i>p</i> value
Type of hepatectomy			0.011			0.044
Limited resection (<i>n</i> = 156)	87.8	76.7		48.3	35.9	
Segmentectomy or more (<i>n</i> = 110)	91.7	83.5		56.4	48.4	
Tumor size (mm)			0.345			0.965
<30 (<i>n</i> = 149)	91.0	82.5		53.4	41.4	
≥30 (<i>n</i> = 117)	87.7	76.2		49.6	40.8	
Tumor size (mm)			0.411			0.068
<50 (<i>n</i> = 230)	89.7	79.7		48.9	39.6	
≥50 (<i>n</i> = 36)	88.5	78.7		62.5	52.8	
Tumor differentiation			0.522			0.202
Well or moderately (<i>n</i> = 215)	89.5	79.0		51.4	41.0	
Poorly (<i>n</i> = 29)	81.5	69.1		41.0	29.3	
Microscopic vascular invasion			0.221			0.714
Negative (<i>n</i> = 200)	91.6	81.2		51.1	40.7	
Positive (<i>n</i> = 66)	83.3	74.4		52.2	41.6	
Intrahepatic metastasis			0.220			0.921
Negative (<i>n</i> = 245)	89.1	80.6		51.9	40.6	
Positive (<i>n</i> = 17)	94.1	70.6		48.9	48.9	
Background liver			<0.001			<0.001
No cirrhosis (<i>n</i> = 150)	97.0	90.3		57.8	50.5	
Cirrhosis (<i>n</i> = 111)	79.7	64.8		43.0	27.6	
Surgical margin (mm)			0.940			0.410
<5 (<i>n</i> = 164)	88.2	80.6		50.0	39.3	
≥5 (<i>n</i> = 102)	91.7	78.2		54.5	44.0	

TACE transcatheter arterial chemoembolization

contrast, DCP, tumor size, tumor differentiation, microscopic vascular invasion, and intrahepatic metastasis did not significantly influence overall survival. Furthermore, HCV infection ($p = 0.034$), a platelet count of $<100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p < 0.001$), prothrombin activity of $<80\%$ ($p = 0.004$), an AST level of ≥ 50 IU/l ($p < 0.001$), an alanine aminotransferase (ALT) level of ≥ 50 IU/l ($p = 0.023$), an albumin level of <3.5 g/dl ($p = 0.024$), an ICG-R15 of $\geq 20\%$ ($p = 0.007$), limited resection ($p = 0.044$), and the presence of cirrhosis in the background liver ($p < 0.001$) were significant adverse prognostic factors for disease-free survival. In contrast, AFP, DCP, tumor size, tumor differentiation, microscopic vascular invasion, and intrahepatic metastasis did not significantly influence disease-free survival. The cut-off value of 3 cm in tumor size was selected based on the receiver operating characteristic curve analysis. Even if the cut-off value of 5 cm had been selected, tumor size did not affect the overall and disease-free survival of the patients with solitary HCC.

Multivariate analysis for overall survival rates after partial hepatectomy revealed that HCV infection

($p = 0.002$), the presence of cirrhosis in the background liver ($p < 0.001$), and a prothrombin activity of $<80\%$ ($p = 0.006$) were independent factors related to poor overall survival rates (Table 3). Figure 2 shows the overall survival curves stratified with a number of adverse prognostic factors for overall survival. The overall survival rates of patients with 3 adverse prognostic factors were significantly lower than those of patients with 2 or fewer of these factors. Furthermore, the overall survival rates of patients with 2 prognostic factors were significantly lower than those of patients with 1 factor.

Multivariate analysis for disease-free survival rates after partial hepatectomy revealed that an AST level of ≥ 50 IU/l ($p = 0.001$), a platelet count of $<100 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($p = 0.041$), the presence of cirrhosis in the background liver ($p = 0.040$), and a prothrombin activity of $<80\%$ ($p = 0.049$) were independent factors related to poor disease-free survival rates (Table 3). Figure 3 shows the disease-free survival curves stratified with the number of adverse prognostic factors for disease-free survival. The disease-free survival rates of patients with 4 adverse

Table 3 Results of multivariate analysis for survival rates after partial hepatectomy

Variables	Beta value	SE	p value	Relative risk	95% confidence interval
Overall survival					
HCV infection	1.242	0.408	0.002	3.462	1.557–7.698
Liver cirrhosis	1.224	0.305	<0.001	3.402	1.871–6.188
Prothrombin activity <80%	0.830	0.300	0.006	2.294	1.275–4.126
Disease-free survival					
AST ≥50 IU/l	0.597	0.177	0.001	1.817	1.285–2.569
Platelet count <100 × 10 ³ /m ³	0.389	0.190	0.041	1.476	1.016–2.142
Liver cirrhosis	0.381	0.186	0.040	1.464	1.017–2.018
Prothrombin activity <80%	0.342	0.174	0.049	1.408	1.002–1.978

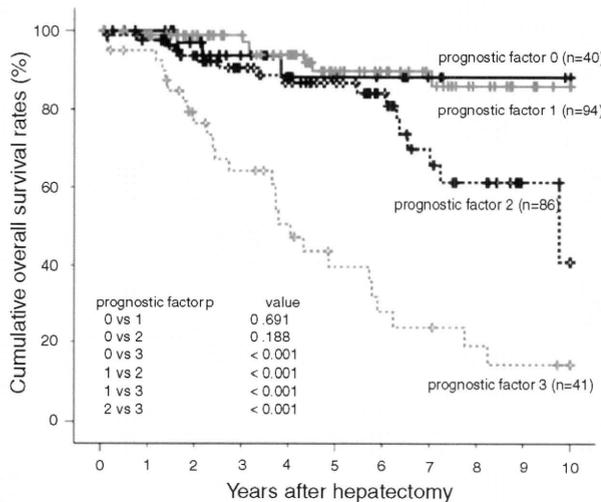


Fig. 2 Comparison of the cumulative overall survival curves stratified with a number of adverse prognostic factors (HCV infection, liver cirrhosis, and prothrombin activity of <80%)

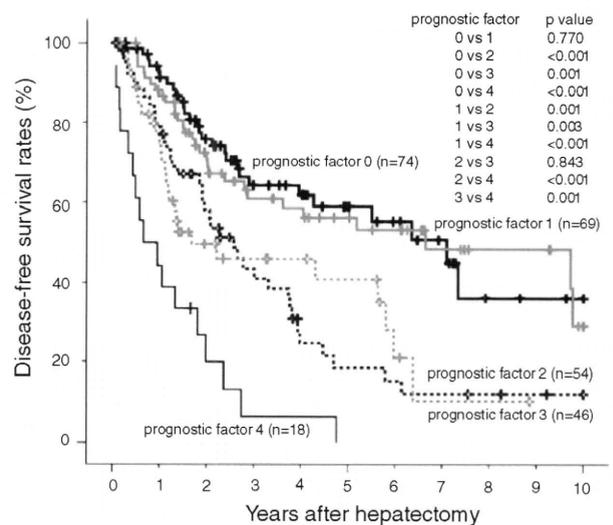


Fig. 3 Comparison of the disease-free survival curves stratified with a number of adverse prognostic factors (AST ≥50 IU/l, platelet count <100 × 10³/m³, liver cirrhosis, and prothrombin activity <80%)

prognostic factors were significantly lower than those of patients with 3 or fewer of these factors. Furthermore, the disease-free survival rates of patients with 2 or 3 prognostic factors were significantly lower than those of patients with none or 1 of these factors.

To evaluate whether the types of hepatectomy were influenced by tumor-related factors, we compared patients with limited resection to those with segmentectomy or more, according to clinicopathological factors (Table 4). By univariate analysis, the patients who underwent segmentectomy or more had lower rates of HCV infection, higher platelet counts, higher prothrombin activity, lower ICG-R15 values, higher rates of Child–Pugh class A, higher AFP levels, higher DCP levels, larger tumors, higher rates of microscopic vascular invasion, and lower rates of liver cirrhosis compared to those who underwent limited resection. By multivariate analysis, the

independent factors affecting the selection of the hepatic resectional procedure were prothrombin activity, ICG-R15 value, AFP level, tumor size, and presence of liver cirrhosis.

We further determined the type of recurrence and the main therapeutic modality for recurrence according to number of adverse prognostic factors, including HCV infection, liver cirrhosis, and prothrombin activity of <80% (Table 5). At the time of the last follow-up, 134 of 266 patients showed tumor recurrence. In patients having more adverse prognostic factors, tumor recurrence occurred more frequently. Among the patients with tumor recurrence, there was no significant difference in the type of recurrence according to the number of adverse prognostic factors ($p = 0.415$). Meanwhile, patients with multiple adverse prognostic factors infrequently underwent repeat hepatectomy for intrahepatic recurrence ($p = 0.022$).

Table 4 Comparison of the types of hepatectomy according to clinicopathological factors

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Limited resection	Segmentectomy or more	<i>p</i> value	Relative risk	95% confidence interval	<i>p</i> value
All cases (<i>n</i> = 266)	156	110	–			
Age (years)			0.523			
<65 (<i>n</i> = 102)	57	45				
≥65 (<i>n</i> = 164)	99	65				
Gender			0.509			
Male (<i>n</i> = 186)	107	79				
Female (<i>n</i> = 80)	49	31				
HCV infection			0.007			
Negative (<i>n</i> = 84)	39	45				
Positive (<i>n</i> = 182)	117	65				
Diabetes mellitus			0.325			
No (<i>n</i> = 188)	106	82				
Yes (<i>n</i> = 72)	46	26				
Preoperative TACE			0.321			
No (<i>n</i> = 121)	75	46				
Yes (<i>n</i> = 145)	81	64				
Platelet count ($\times 10^3/m^3$)			<0.001			
<100 (<i>n</i> = 95)	71	24				
≥100 (<i>n</i> = 171)	85	86				
Prothrombin activity (%)			0.014	1.941	1.019–3.697	0.044
<80 (<i>n</i> = 99)	68	31				
≥80 (<i>n</i> = 167)	88	79				
Total bilirubin level (mg/dl)			0.082			
<1.0 (<i>n</i> = 182)	100	82				
≥1.0 (<i>n</i> = 84)	56	28				
AST (IU/l)			0.062			
<50 (<i>n</i> = 181)	99	82				
≥50 (<i>n</i> = 85)	57	28				
ALT (IU/l)			0.795			
<50 (<i>n</i> = 174)	101	73				
≥50 (<i>n</i> = 92)	55	37				
Albumin level (g/dl)			0.293			
<3.5 (<i>n</i> = 57)	37	20				
≥3.5 (<i>n</i> = 209)	119	90				
ICG-R (%)			<0.001	3.632	1.837–7.183	<0.001
<20 (<i>n</i> = 170)	80	90				
≥20 (<i>n</i> = 96)	76	20				
Child–Pugh			0.017			
A (<i>n</i> = 236)	132	104				
B (<i>n</i> = 30)	24	6				
AFP (ng/ml)			0.015	3.034	1.578–5.832	0.001
<100 (<i>n</i> = 185)	118	67				
≥100 (<i>n</i> = 81)	38	43				
DCP (mAU/ml)			<0.001			
<100 (<i>n</i> = 166)	112	54				
≥100 (<i>n</i> = 98)	43	55				

Table 4 continued

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	Limited resection	Segmentectomy or more	<i>p</i> value	Relative risk	95% confidence interval	<i>p</i> value
Tumor size (mm)			<0.001	3.768	2.087–6.802	<0.001
<30 (<i>n</i> = 149)	106	43				
≥30 (<i>n</i> = 117)	50	67				
Tumor differentiation			0.070			
Well or moderately (<i>n</i> = 215)	130	85				
Poorly (<i>n</i> = 29)	12	17				
Microscopic vascular invasion			0.001			
Negative (<i>n</i> = 200)	129	71				
Positive (<i>n</i> = 66)	27	29				
Intrahepatic metastasis			1.000			
Negative (<i>n</i> = 245)	143	102				
Positive (<i>n</i> = 17)	10	7				
Background liver			<0.001	2.438	1.293–4.598	0.006
No cirrhosis (<i>n</i> = 150)	71	79				
Cirrhosis (<i>n</i> = 111)	84	27				
Surgical margin (mm)			0.898			
<5 (<i>n</i> = 164)	97	67				
≥5 (<i>n</i> = 102)	59	43				

TACE transcatheter arterial chemoembolization

Table 5 The type of recurrence and the main therapeutic modality for recurrence according to the number of adverse prognostic factors

Variables	Number of adverse prognostic factors				<i>p</i> value
	0	1	2	3	
Case	40	94	86	41	
Recurrence	21 (52.5)	34 (36.2)	49 (57.0)	30 (73.2)	<0.001
Type of recurrence					0.415
Intrahepatic solitary	7 (33.3)	20 (58.8)	28 (57.1)	16 (53.3)	
Intrahepatic multiple	9 (42.9)	8 (23.5)	16 (32.6)	8 (26.7)	
Extrahepatic recurrence	5 (23.8)	6 (17.7)	5 (10.2)	6 (20.0)	
Main therapeutic modality					0.022
Repeat hepatectomy	6 (28.6)	18 (52.9)	14 (28.6)	5 (16.7)	
Liver transplantation	0	0	0	2 (6.7)	
Radiofrequency ablation	4 (19.1)	4 (11.8)	17 (34.7)	4 (13.3)	
TACE	8 (38.1)	6 (17.7)	12 (24.5)	11 (36.7)	
Systemic chemotherapy	2 (9.5)	1 (2.9)	1 (2.0)	1 (3.3)	
Others	1 (4.8)	5 (14.7)	5 (10.2)	7 (23.3)	

TACE transcatheter arterial chemoembolization

^a Adverse prognostic factors: HCV infection, liver cirrhosis, prothrombin activity of <80%

Discussion

Although several previous studies have reported the predictive factors affecting surgical outcomes in patients with resectable HCC, few studies have reported the outcomes in

patients with a solitary HCC [7–9]. The present study showed that in patients with a solitary HCC the prognosis after curative hepatectomy depends on the background liver status and is independent of tumor factors. The adverse prognostic factors affecting these patients' overall

survival rates were HCV infection, liver cirrhosis, and prolonged prothrombin activity. Furthermore, the adverse prognostic factors affecting their disease-free survival rates were a high AST level, decreased platelet count, liver cirrhosis, and prolonged prothrombin activity. Patients with more of these adverse prognostic factors had worse overall and disease-free survival rates. In addition, the prognosis of patients with well-preserved liver function after partial hepatectomy of a solitary HCC was extremely good. These findings confirm the importance of hepatic functional reserve and sustained hepatitis activity in the outcomes of patients after partial hepatectomy.

In general, the prognosis of patients with HCC is influenced by factors related to the background liver and the tumor [3]. It is well known that recurrence after the initial treatment of HCC is caused by multicentric occurrence and intrahepatic metastasis [16]. It was reported that multicentric occurrence was more frequently observed in patients with a poor hepatic functional reserve [17]. Bilimoria et al. [18] reported that the presence of moderate to severe fibrosis/cirrhosis was the most important predictor of death, overshadowing all other tumor factors. Wayne et al. [19] reported that the fibrosis score, Edmondson–Steiner grade, and Child–Pugh score were significant predictors of survival after resection in a cohort of patients undergoing resection for small HCCs. In addition, the incidence of multicentric recurrences was greater in HCV-positive patients than in hepatitis B virus-positive patients [20, 21]. Thus, the prognosis of patients with HCC after partial hepatectomy is influenced by poor hepatic functional reserve probably due to fibrosis or cirrhosis, especially in the case of patients with HCV infection. Additionally, the preoperative AST level was identified as an adverse prognostic factor for the disease-free survival rate in this study. There are several reports suggesting that active inflammation in the nontumoral liver is an independent risk factor for intrahepatic recurrence [22]. It has been reported that the elevation of preoperative liver enzymes may be a factor that affects intrahepatic recurrence, which is more likely to originate from metachronous carcinogenesis [23]. Tarao et al. [24] reported a close association between inflammatory necrosis and rapid recurrence in hepatectomized patients with HCC who had HCV-associated cirrhosis. Thus, inflammation of the nontumoral liver may also influence multicentric carcinogenesis. In this study, all of the factors that were identified as adverse prognostic factors for overall and disease-free survival rates reflected the background liver status.

Several tumor-related factors that negatively influence the outcomes of patients with HCC who have undergone partial hepatectomy have been reported. They include tumor size, tumor number, vascular invasion, and pTNM

stage [5, 25]. Although tumor size is recognized as one of the significant adverse prognostic factors, it remains controversial whether larger tumors solely influence the outcome after curative hepatectomy in patients with solitary HCCs. Several reports indicated that a larger tumor resulted in poorer survival rates [26–28]. Yeh et al. [6] reported that significant indicators of adverse prognosis in patients with HCC and cirrhosis included an elevated alkaline phosphatase value, a tumor size of >2 cm, the presence of satellite lesions, and vascular invasion. Pawlik et al. [29] reported that tumor size predicted microvascular invasion and advanced histological grade. Tsai et al. [30] reported that macroscopic and microscopic venous invasion, surgical margin, ICG-R15, and tumor size and number were significant predictors of postresectional survival. They concluded that the larger the size of the tumor, the higher the incidence of venous invasion. However, some authors have reported that tumor size did not influence the postoperative outcome [31–33]. Liao et al. [31] reported that overall and disease-free survival of patients with HCCs that were >10 cm in diameter were similar to those of patients with HCCs of ≤5 cm in diameter. Vauthey et al. [32] proposed a simplified staging for HCCs in which they classified a single HCC without vascular invasion as sT1 because tumor size had no effect on survival in patients with a single HCC and no vascular invasion. More recently, Yang et al. [33] reported a specific subtype of HCC, which is large in size but exhibits a low invasive and metastatic potential and a good outcome after resection. They categorized these tumors as solitary, large HCCs, which grow expansively within an intact capsule or pseudocapsule. The reason for this conflict might be the fact that most reports included larger tumors with macroscopic vascular invasion. In the present study, we demonstrated that tumor-related factors do not influence the prognosis of solitary HCC after curative partial hepatectomy in patients who did not show macroscopic vascular invasion. Thus, tumor-related factors other than macroscopic vascular invasion were not adverse prognostic factors in patients with solitary HCC, although our results might be influenced by the biased study population, i.e. the high proportion of patients infected with HCV in our series.

In the present study, limited resection was one of the significant adverse prognostic factors for overall and disease-free survivals by using univariate analysis. It might suggest that the selection of types of hepatectomy could be influenced by tumor-related factors. To evaluate whether the types of hepatectomy was influenced by tumor-related factors, we compared patients with limited resection to those with segmentectomy or more, according to clinicopathological factors. The independent factors affecting the selection of hepatic resectional procedure were prothrombin activity, ICG-R15 value, AFP level, tumor size, and

presence of liver cirrhosis. In our institution, the types of hepatectomy were determined on the basis of liver functional reserve and location of the tumor. Although tumor-related factors were in theory not considered to determine the hepatic resectional procedure, we could not exclude the possibility that the tumor size and AFP level influenced the types of hepatectomy selected. The patients who underwent segmentectomy or more had more unfavorable tumor-related factors such as a larger tumor or a higher AFP level compared with those who underwent limited resection. Meanwhile, compared with those who underwent limited resection, patients who underwent segmentectomy or more had more favorable liver-related factors, such as higher prothrombin activity, a lower ICG-R15 value, and the absence of liver cirrhosis. Despite unfavorable tumor-related factors, the patients who underwent segmentectomy or more showed higher overall and disease-free survival than those who underwent limited resection. These findings may be attributable to the fact that the patients who underwent segmentectomy or more had more favorable liver-related factors than those who underwent limited resection. Therefore, we concluded that although tumor-related factors might affect the selection of the types of hepatectomy, they do not influence the prognosis of solitary HCC after curative partial hepatectomy. Additionally, as determined by multivariate analysis, the types of hepatectomy were not found to be independent prognostic factors for either overall or disease-free survival.

We also demonstrated that the background liver status is the major factor limiting the long-term outcome after partial hepatectomy of solitary HCC. If recurrence occurred, the patients with adverse liver-related factors tended to undergo nonsurgical therapy for recurrent tumor, such as radiofrequency ablation or transcatheter arterial chemoembolization. This observation may be due to the therapeutic difficulty of the recurrent tumor. If the patients with a solitary HCC have several adverse prognostic factors such as HCV infection, liver cirrhosis, and prolonged prothrombin activity, they may benefit from liver transplantation rather than partial hepatectomy as the treatment for HCC. However, donor organ availability is unfortunately limited in Japan.

In conclusion, the long-term prognosis of patients with a solitary HCC who undergo curative partial hepatectomy mainly depends on the background liver status and not on tumor-related factors; this suggests that hepatectomy provides a significant therapeutic benefit. The postoperative prognosis of patients with a solitary HCC and well-preserved liver function is extremely good, irrespective of the tumor size. Thus, if the hepatic functional reserve is within the permissible range, partial hepatectomy should be considered as the treatment of choice for patients with a solitary HCC.

References

1. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001;2(9):533–43.
2. Song TJ, Ip EW, Fong Y. Hepatocellular carcinoma: current surgical management. *Gastroenterology.* 2004;127(5 Suppl 1):S248–60.
3. Poon RT, Fan ST, Wong J. Risk factors, prevention, and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg.* 2000;232(1):10–24.
4. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2005;42(5):1208–36.
5. Poon RT, Ng IO, Fan ST, Lai EC, Lo CM, Liu CL, Wong J. Clinicopathologic features of long-term survivors and disease-free survivors after resection of hepatocellular carcinoma: a study of a prospective cohort. *J Clin Oncol.* 2001;19(12):3037–44.
6. Yeh CN, Chen MF, Lee WC, Jeng LB. Prognostic factors of resection for hepatocellular carcinoma with cirrhosis: univariate and multivariate analysis. *J Surg Oncol.* 2002;81(4):195–202.
7. Fukuda S, Itamoto T, Nakahara H, Kohashi T, Ohdan H, Hino H, Ochi M, Tashiro H, Asahara T. Clinicopathologic features and prognostic factors of resected solitary small-sized hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2005;52(64):1163–7.
8. Cho YB, Lee KU, Lee HW, Cho EH, Yang SH, Cho JY, Yi NJ, Suh KS. Outcomes of hepatic resection for a single large hepatocellular carcinoma. *World J Surg.* 2007;31(4):795–801.
9. Kondo K, Chijiwa K, Makino I, Kai M, Maehara N, Ohuchida J, Naganuma S. Risk factors for early death after liver resection in patients with solitary hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2005;12(5):399–404.
10. Liver Cancer Study Group of Japan. General rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer. Tokyo: Kanehara, 2003.
11. Itamoto T, Nakahara H, Tashiro H, Ohdan H, Hino H, Ochi M, Asahara T. Indications of partial hepatectomy for transplantable hepatocellular carcinoma with compensated cirrhosis. *Am J Surg.* 2005;189(2):167–72.
12. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973;60(8):646–9.
13. Couinaud C. Lobe et segments hépatiques. *Presse Med.* 1954;62(33):709–12.
14. Strasberg SM. Nomenclature of hepatic anatomy and resections: a review of the Brisbane 2000 system. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2005;12(5):351–5.
15. Noda T, Sasaki Y, Yamada T, Eguchi H, Yano M, Ohigashi H, Ishikawa O, Imaoka S. Usefulness of the CLIP scoring system for prediction of postoperative prognosis of patients with large hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009;16(4):538–45.
16. Matsumoto Y, Fujii H, Matsuda M, Kono H. Multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma: diagnosis and clinical significance. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2001;8(5):435–40.
17. Utsunomiya T, Shimada M, Taguchi KI, Hasegawa H, Yamashita Y, Hamatsu T, Aishima SI, Sugimachi K. Clinicopathologic features and postoperative prognosis of multicentric small hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg.* 2000;190(3):331–5.
18. Bilimoria MM, Lauwers GY, Doherty DA, Nagorney DM, Belghiti J, Do KA, Regimbeau JM, Ellis LM, Curley SA, Ikai I, Yamaoka Y, Vauthey JN. Underlying liver disease, not tumor factors, predicts long-term survival after resection of hepatocellular carcinoma. *Arch Surg.* 2001;136(5):528–35.
19. Wayne JD, Lauwers GY, Ikai I, Doherty DA, Belghiti J, Yamaoka Y, Regimbeau JM, Nagorney DM, Do KA, Ellis LM, Curley