

肝細胞癌診断における PIVKA-II
ならびに各種腫瘍マーカー測定の臨床的意義と
その糖鎖変異に関する研究

新潟大学医学部第三内科

小 黒 仁

Clinical Evaluation of Plasma Concentrations of Protein Induced by
Vitamin K Absence or Antagonist-II (PIVKA-II),
and its Altered Glycosylation in Patients
with Hepatocellular Carcinoma (HCC).

Makoto OGURO

The Third Division

*Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine*

The plasma concentrations of PIVKA-II in samples from 155 patients with HCC and 298 with other liver diseases were determined. The serum concentrations and fucosylation index of alpha-fetoprotein (AFP), sialyl stage-specific embryonic antigen-1 (SLX), CA-50, and Dupan-2 were also determined in 60 patients with HCC, 70 with nonneoplastic liver diseases and 25 with carcinoma metastatic to the liver. In 16 HCC patients with positive reactions of both PIVKA-II and AFP longitudinal series of their plasma concentrations were measured in evaluating the effect of the treatment to HCC. Next, the reactivity of PIVKA-II, AFP, prothrombin, transferrin and alpha-1-antitrypsin with concanavalin A and *Lens culinaris* agglutinin was studied in 11 patients with HCC by crossed immunoaffino-electrophoresis and affinity column chromatography. The results are as follow: 1. The plasma concentrations of PIVKA-II in patients with HCC were higher than those with other liver diseases with statistical significance, and the sensitivity, specificity and total accuracy of the present analysis were 54, 98 and 85%, respectively. 2. The determinations of serum concentrations and fucosylation index of AFP and SLX were also useful for diagnosing HCC, and 88% of HCC was able to be diagnosed by the measurement of these

Reprint request to: Makoto OGURO,
The Third Division, Department of
Internal Medicine, 1-757, Asahi-
machi-dori, Niigata City, 951,
JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町757
新潟大学医学部第三内科学教室

小 黒 仁

markers together with PIVKA-II serologically. 3. Simultaneous determinations of PIVKA-II and AFP were recommended in the follow-up of patients with HCC since 5 HCC patients with the dissociation of the concentrations of PIVKA-II and AFP were observed. 4. Concanavalin A-nonreactive fraction of PLVKA-II was detected in serum from patient with HCC, suggesting an altered glycosylation of PIVKA-II.

Key words: hepatocellular carcinoma, protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II), altered glycosylation
肝細胞癌, 異常プロトロンビン (PIVKA-II), 糖鎖変異

はじめに

肝細胞癌 (HCC) の血清学的診断を目的としてアルファフェトプロテイン (AFP) 値の定量は、広く臨床応用されている。しかしながら、AFP 非産生ならびに低産生 HCC では、その存在診断に苦慮する症例があり、癌化に伴う血清蛋白の糖鎖変異の検討^{2) 8) -13) 20) -24)}、および AFP 以外の腫瘍マーカーの計測が行われてきた。1984年 Lieberman³⁾によって報告された異常プロトロンビンは、HCC 患者血漿中に高率に検出され、その臨床的意義が注目されている。一般にビタミンK依存性凝固因子は、post-translational processing として、グルタミン酸残基の γ 位のカルボキシル化を受けて、 γ -カルボキシルグルタミン酸 (Gla) となって完成され、はじめて凝固活性を持つようになる。この γ -カルボキシル化の過程において、ビタミンKを必要とするが、異常プロトロンビンは Gla 化不全によって生ずる為、des- γ -carboxy prothrombin または、Protein induced by vitamin K absence or antagonist (PIVKA)-II (II 因子すなわちプロトロンビン) と称される。(本稿では PIVKA-II と略す。)

今回著者は、1) PIVKA-II の HCC における診断能と HCC 治療効果判定における意義、2) PIVKA-II、AFP と他の腫瘍マーカーすなわち I 型、II 型糖鎖抗原である CA-50、シアルル Le^x-i (SLX) などの同時測定の有用性、3) PIVKA-II ならびに血清蛋白の糖鎖変異の有無とその相互関係について、比較検討したので報告する。

対象および方法

HCC 155 例、臨床経過ならびに血管造影をはじめとする各種画像診断で HCC を否定し得た良性肝疾患 268 例 (肝硬変 124 例、慢性肝炎 105 例、急性肝炎 10 例、良性肝腫瘍 12 例、原発性胆汁性肝硬変 8 例、胆石症 9 例)、

ワーファリン投与中の狭心症 8 例、および転移性肝癌 30 例の計 461 例を対象として、以下の検討を行った。

1) PIVKA-II の HCC 診断における意義

PIVKA-II は、エーザイ社エイトモノ P-II EIA キットを用いて測定し、カットオフ値を 0.1 Arbitrary Unit (AU)/ml として、各疾患群の陽性率を求めた。また HCC においては腫瘍最大径を 2 cm 以下、2.1 cm 以上 3.0 cm 以下、3.1 cm 以上 5 cm 以下、5.1 cm 以上の 4 群に分け、腫瘍径と PIVKA-II 値の関係を解析した。

2) AFP ならびに AFP フコシル化率の HCC 診断における意義と PIVKA-II の関係

AFP はダイナボット社 AFP キットで測定し、さらにレンズマメレクチン (*Lens culinaris* agglutinin, LCA) 存在下の crossed-immuno-affino-electrophoresis にて結合性、非結合性画分に分画した。泳動条件は、一次元目に 0.02 M ベロナール緩衝液 pH 8.6 にて LCA (0.5 mg/ml)、Con A (2.0 mg/ml) を含む 1% アガロース平板を作成し、これに血清を添加した後、定電圧 100 V で 3~5 時間泳動した。二次元目は、抗血清を含む 1% アガロースを用い、定電圧 50 V で 16 時間泳動し沈降線を得た。LCA 結合性分画は著者らの報告¹⁰⁾ にてフコシル化二分枝型糖鎖を有する事が確認されているため、総 AFP の LCA 結合性分画の割合をフコシル化率 (Fucosylation index) として算定し、次に PIVKA-II 値と AFP 値、AFP フコシル化率の関係につき検討した。AFP のカットオフ値は、20 ng/ml とした。

3) HCC における PIVKA-II と他の各種腫瘍マーカーの診断能の比較検討

前記対象中、HCC 60 例、良性肝疾患 70 例 (肝硬変 30 例、慢性肝炎 30 例、急性肝炎 3 例、良性肝腫瘍 7 例)、および転移性肝癌 25 例の計 155 例を対象として、SLX、CA-50、Dupan-2 を同時測定した。

SLX は大塚アッセイ社 SLX キット、CA-50 は三

井社 CA-50 キット, Dupan-2 は協和メディックス社 Dupan-2 キットを用い, それぞれのキット指定の標準的測定条件で測定した. SLX, CA-50, Dupan-2 のカットオフ値は, それぞれ 38 u/ml, 40 u/ml, 150 u/ml とした.

4) HCC 治療効果判定における AFP, PIVKA-II の同時測定の有用性ならびに両マーカーの解離例における検討

HCC 155 症例中, AFP, PIVKA-II いずれかが陽性で, 治療効果判定が可能であった16例を対象とした. そのうちわけは手術4例, エタノール注入 (percutaneous ethanol injection therapy, PEIT) 2例, 肝動脈塞栓療法 (Transcatheter arterial embolization, TAE) 10例で, 腫瘍の縮小率とマーカーの低下度を比較検討した. 縮小率は, 固形癌治療効果判定基準に準じ CR, complete response (病変の消失); PR, partial response (腫瘍縮小率50%以上); NR, no response (縮小率50%未満); PD, progressive disease (25%以上の増大) の4群に分類し, さらに NR 群において, 2方向評価可能病変が25~50%の縮小を示した症例は, MR, minor response とした. 各マーカーの低下度は, 前値を100%として治療4週後の低下率を求め比較した. 低下度はA群 (陰性化), B群 (10%以下に低下), C群 (50%以下に低下), D群 (前値より上昇), E群 (その他) とした.

次に, AFP 値と PIVKA-II 値が解離した症例について, 臨床経過および両マーカーの変動につき分析し, 同時測定の有用性について検討した. AFP に関し, 臨床経過および AFP のフコシル化率より, 肝再生による AFP の上昇が考えられる症例, また PIVKA-II においてはビタミンKの利用障害が推定される黄疸例, N-メチルテトラゾールチオール基を有する抗生剤投与例, あるいはビタミンK剤投与例は検討より除外した.

5) PIVKA-II ならびに各種血清蛋白における糖鎖変異に関する検討

HCC 症例11例, 肝硬変症例6例を対象として, PIVKA-II, プロトロンビン (PT), AFP, トランスフェリン (TF), ならびに α_1 -アンチトリプシン (α_1 -AT) のレクチン反応性について検討した. また PIVKA-II および PT に関しては, さらに亜急性肝炎1例, 原発性胆汁性肝硬変2例, ワーファリン投与中の狭心症4例について調べた.

PIVKA-II は, LCA ならびにコンカナバリン A (Con A) セファロース 4B (Pharmacia 社) を用いた親和性クロマトグラフィーにて, 結合性, 非結合性分

画を分離した. すなわち開始緩衝液は 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.15 M NaCl, 1 mM Ca^{2+} , 1 mM Mn^{2+} を使用し, 氷室 (4 °C) にて, 血清 100 μl を LCA, Con A カラム各 8.8 ml, 6.6 ml に添加し非結合分画を得, 次に 0.5 M α -methylglycoside 溶液にて結合分画を溶出した. 各分画の PIVKA-II 活性は EIA キットにて定量した. 本実験においては, 不溶化レクチンカラムの緩衝液中に Ca^{2+} , Mn^{2+} の二価の陽イオンを含有し, フィブリンの析出をおこす可能性があり, さらに予備実験において, 凝固活性を持たない PIVKA-II 値は, 血漿および血清中濃度が良好な相関を示す事を確認出来たので PIVKA-II の試料として血清を用いた.

PT は, Kisiel ら²⁵⁾の方法に従いバリウム吸着および硫酸塩析にて抽出し, PIVKA-II 同様に親和性クロマトグラフィーにて, 各分画を分離し, さらにロケット免疫電気泳動を使用し定量した. すなわち, 20 ml の血漿に 1 M 塩化バリウム 1.6 ml を添加混和後 3600 g にて遠心し, 得られた沈澱を 3 ml の 0.1 M NaCl, 5 mM BaCl_2 , 5 mM benzamidinedihydrochloride に溶解し, 再度本操作を繰り返した. 得られた沈澱を30から65%で硫酸塩析した後, 上清を凍結乾燥して PT 含有分画とした. ロケット免疫電気泳動は, 0.02 M のペロナル緩衝液 pH8.6 を使用し1%アガーローズゲルに DAKO 社製ウサギ免疫抗ヒト PT を添加し, 定電圧 50 V で16時間泳動し沈降線を得た. また TF, α_1 -AT は AFP 同様交差親和性免疫電気泳動を使用し, 各レクチンに対する結合性の有無につき検討した.

なお, 本実験の統計学的処理は, unpaired t-test, chi-square test を用い行った.

成 績

I. 各種マーカーの HCC 診断能

1) PIVKA-II の診断能

各疾患群における PIVKA-II の測定結果を Fig. 1 に示すが, PIVKA-II は 0.1 AU/ml 以上を陽性とする, 良性肝疾患に比し chi-square test にて統計学的に有意な上昇 ($p < 0.001$) を示し, 各疾患群における陽性率はそれぞれ HCC 54.2% (84/155), 良性肝疾患 2.3% (7/300), 転移性肝癌 6.7% (2/30) で, HCC における感度 (sensitivity) は, 54.2% とやや低いものの, 特異性 (specificity) は 97.6% (293/300) と高い値を示し, 正診率 (accuracy) は 82.9% (377/455) であった. また HCC 以外の疾患で陽性を示した症例の検討では, 良性肝疾患において肝硬変2例, 原発性胆

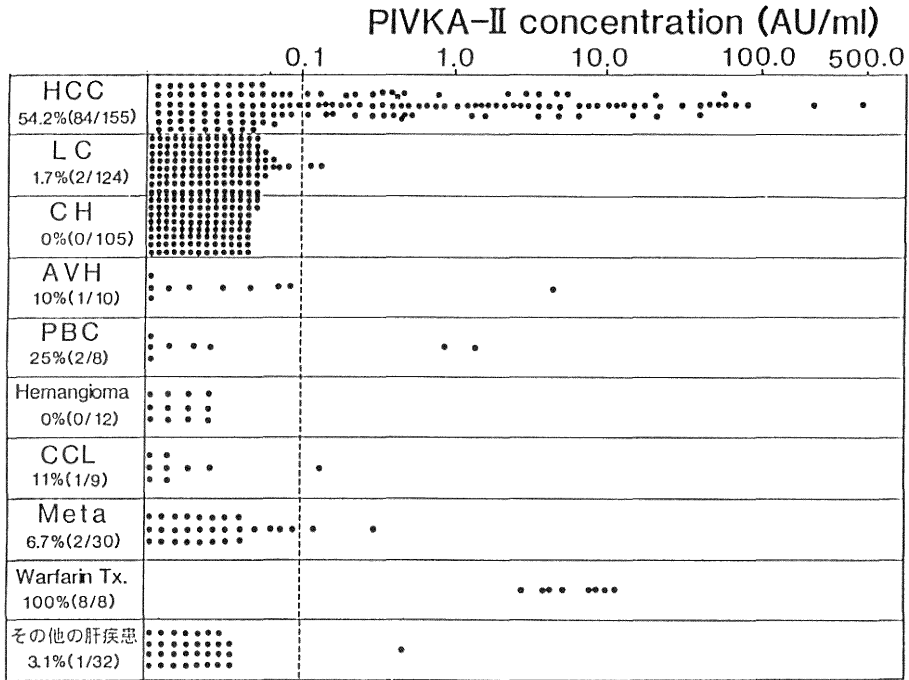


Fig. 1 Plasma concentrations of PIVKA-II (logarithmic scale) in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and other diseases.

LC, liver cirrhosis; CH, chronic hepatitis; AVH, acute viral hepatitis; PBC, primary biliary cirrhosis; CCL, cholecystolithiasis; Meta, carcinoma metastatic to the liver.

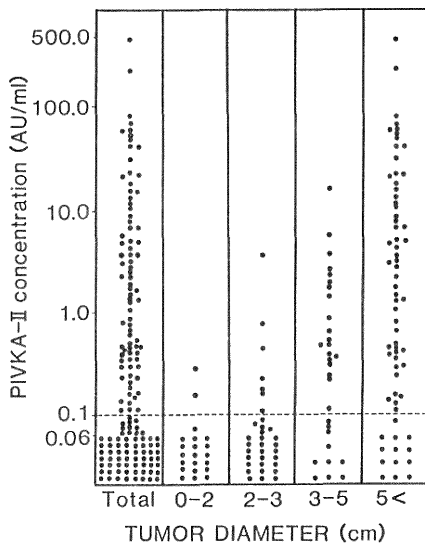


Fig. 2 Correlation between tumor diameter and plasma concentrations of PIVKA-II (logarithmic scale) in patients with HCC.

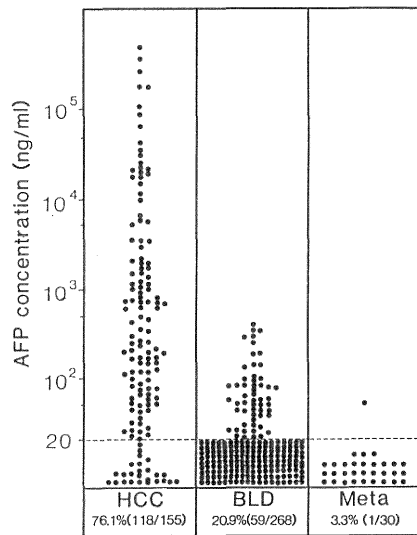


Fig. 3 Serum concentrations of AFP (logarithmic scale) in patients with HCC, benign liver diseases (BLD) and carcinoma metastatic to the liver (Meta).

胆汁性肝硬変 (PBC) 2 例, 総胆管結石 1 例, 骨髄移植後の graft versus host disease 症例 1 例, また HCC 以外の悪性腫瘍では, 転移性肝癌 2 例 (胆嚢癌 1 例, 悪性胸腺腫 1 例) の計 8 例において, PIVKA-II の上昇を認めた. またワーファリン投与例では全例が, PIVKA-II 陽性を示した.

2) 腫瘍最大径と PIVKA-II

HCC の最大径と, PIVKA-II 値の関係を解析した結果 (Fig. 2) では, 5 cm 以上の進行癌における陽性率は 80.6% (54/67) と高値を示したが, 最大径が小さくなるにつれ陽性率は, 低下傾向を示した. 原発性肝癌取扱い規約による Small liver cancer (最大径 2 cm 以下単発) においては, 21 例中 2 例 (9.5%) において上昇を認め, 陽性例中の最小の HCC は, 最大径 1.5 cm であり, 手術標本にて確認した.

3) AFP の診断能

AFP の測定成績を Fig. 3 に示したが, HCC 群は 21 ng/ml 以上を陽性とする, 良性肝疾患に比し chi-square test にて統計学的に有意な上昇をしめし ($p < 0.001$), その HCC に対する診断能は感度 76.1% (118/155), 特異性 78.0% (209/268), 正診率 77.3% (327/423) であった.

4) フコシル化 AFP の意義

AFP 20~500 ng/ml の低値 HCC 症例において良性肝疾患と重複する症例を認めたため, これらの鑑別を目的としてフコシル化率を測定した (Fig. 4). HCC 群の総 AFP に対するフコシル化 AFP の割合, すなわちフコシル化率は $27 \pm 25\%$ (Mean \pm SD) で肝硬変群の $8 \pm 7\%$ および慢性肝炎群の $1 \pm 3\%$ に比し, unpaired t-test にて統計学的に有意な上昇 ($p < 0.01$) を示し両疾患の鑑別に有用であった. 良性肝疾患の mean + 2 SD である 18% 以上を陽性とする, 良性肝疾患で AFP 21 ng/ml 以上を呈した 59 例中 35 例が陰性となり, 特異性を 78.0% より 91.0% に上昇させる事が出来た.

5) PIVKA-II と AFP の関係

血漿 PIVKA-II 値と血清 AFP 値との関係を Fig. 5 に示すが, AFP 値と PIVKA-II 値の間には軽度の相関を認めるに過ぎず ($R = 0.40$) 両者は相補的な関係にあり, 併用することで 85% の HCC が診断可能であった.

次に PIVKA-II 値と AFP フコシル化率を比較検討した結果を示すが (Fig. 6), 血漿 PIVKA-II 値 0.1 AU/ml 未満と 0.1 AU/ml 以上を示した HCC 症例の 2 群間において, AFP フコシル化率を検討し, 0.1

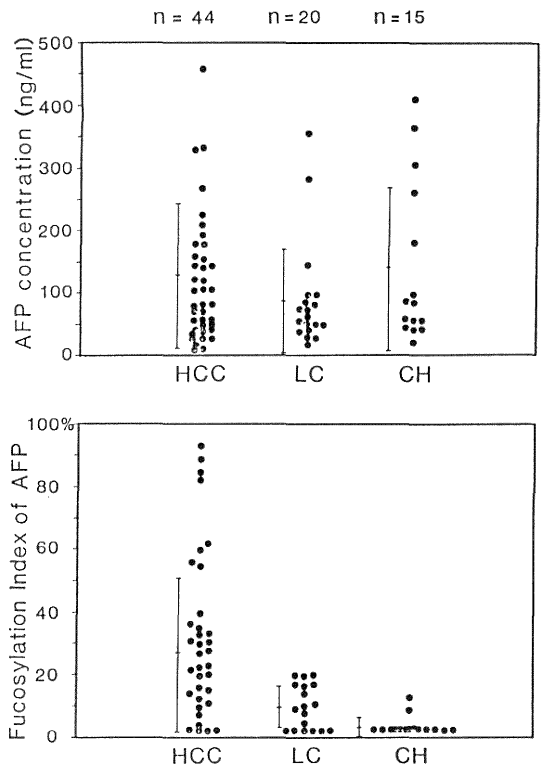


Fig. 4 Serum concentrations of AFP (logarithmic scale) and the fucosylation index of AFP (arithmetic scale) in patients with HCC, LC and CH.

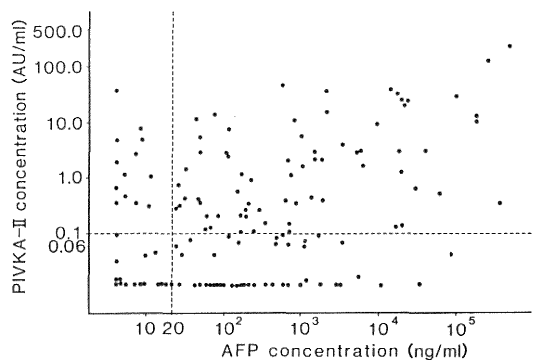


Fig. 5 Relationship between plasma concentrations of PIVKA-II (logarithmic scale) and serum concentrations of AFP (logarithmic scale) in patients with HCC. (n=155)

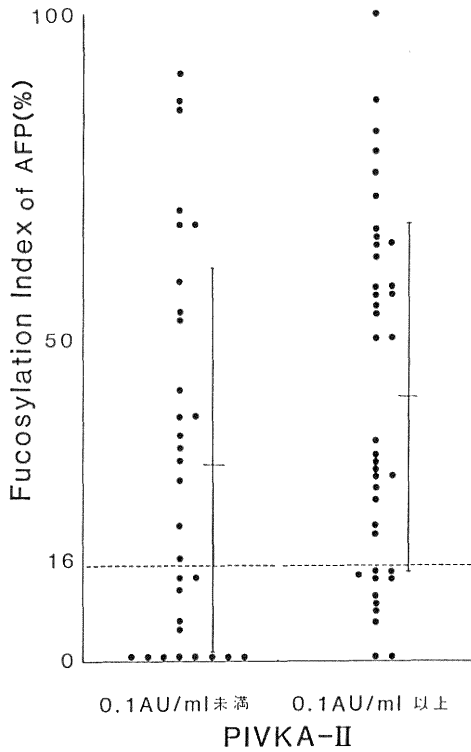


Fig. 6 Relationship between the fuosylation index of AFP (arithmetic scale) and plasma concentrations of PIVKA-II in patients with HCC.

AU/ml 以上群にフコシル化率の高い傾向を認めたが、両群の間に統計学的な有意差は認められなかった。

6) その他の腫瘍マーカー

SLX の測定結果を **Fig. 7** に示した。SLX は HCC 群において 36 ± 16 U/ml (Mean \pm SD) と、肝硬変群 (26 ± 6 U/ml)、慢性肝炎群 (13 ± 5 U/ml) に比し、unpaired t-test にて統計学的に有意な上昇 ($p < 0.01$) を示し、陽性率は30%と低いものの最大値 3 cm 以下の HCC にも上昇例を認め、両者の鑑別に有用であった。また、転移性肝癌においては、肺癌、胆嚢癌、膵癌症例で高値を示した。

CA-50 の各種肝疾患における測定結果では (**Fig. 8**)、HCC 群で40% (24/60) と上昇を示すものの、良性肝疾患群においても38% (23/60) の陽性率が認められ、両者の鑑別における有用性は認められなかった。しかしながら転移性肝癌群で63.1% (16/25) の症例が上昇を示し、特に 500 U/ml 以上の高値を呈する例が42% (10/

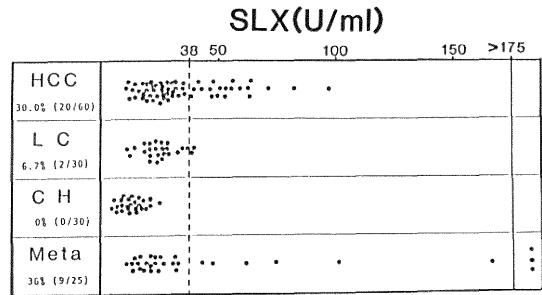


Fig. 7 Serum concentrations of SLX (arithmetic scale) in patients with HCC, LC, CH and Meta.

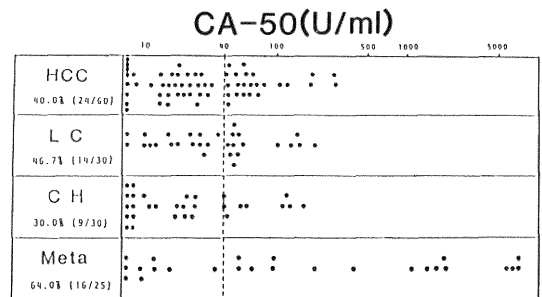


Fig. 8 Serum concentrations of CA-50 (logarithmic scale) in patients with HCC, LC, CH and Meta.

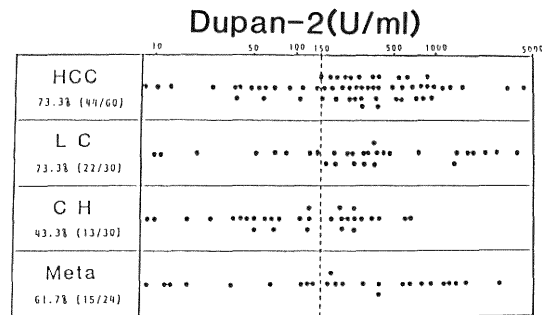


Fig. 9 Serum concentrations of Dupan-2 (logarithmic scale) in patients with HCC, LC, CH and Meta.

26) あり、その診断に有用と考えられた。

Dupan-2 は **Fig. 9** に示すごとく、HCC 群 73.3% (44/60)、良性肝疾患群 65.3% (35/60)、転移性肝癌群 70.5% (15/24) の三者での陽性率はほぼ同様で、各疾患群において統計学的有意差は指摘出来なかった。

Table 1 Summary of sensitivity, specificity and diagnostic accuracy of present study using PIVKA-II, AFP, fucosylation index of AFP and SLX.

	sensitivity		specificity		accuracy	
AFP	48/60	80.0%	57/70	81.4%	105/130	80.8%
PIVKA-II	32/60	53.3%	68/70	97.1%	100/130	76.9%
SLX	20/60	30.3%	68/70	97.1%	88/130	67.7%
AFP+F. Index*	42/60	70.0%	64/70	91.4%	106/130	81.5%
AFP+F. Index +PIVKA-II+SLX	53/60	88.3%	64/70	91.4%	117/130	90.0%

*F. Index, fucosylation index.

Sensitivity = TP / (TP + FN), specificity = TN / (TN + FP)

Accuracy = (TP + TN) / (TP + FP + TN + FN)

TP = true positive, FP = false positive

TN = true negative, FN = false negative

同時測定可能であった HCC 60例における PIVKA-II, AFP, SLX の HCC 診断能を Table 1 にまとめて示した。AFP は、感度 80.0%, 特異性 81.4% と特異性の点で他の二者に比較して劣るが、AFP フコシル化率を併用することで特異性は、81.4% から 91.4% まで向上した。また PIVKA-II, SLX の感度は、それぞれ 53.3%, 30.0% と低いものの AFP との関係は相補的で、AFP 非産生 HCC の診断において有用であり三者併用することで血清学的に 88% の HCC が診断可能であった。また、その特異性は 91% と高値を示し、三者をあわせた正診率は 90% であった。

II. PIVKA-II, AFP 同時測定の臨床的意義

1) 治療効果の指標として

HCC 治療効果判定における PIVKA-II, AFP 同時測定の有用性を検討した結果、腫瘍マーカーの低下度は、PIVKA-II において CR 群 4 症例中全例が A 群（陰性化）、PR 群 1 症例では、B 群（前値の 10% 以下）1 例、MR 群 6 症例においては A 群 3 例、B 群 2 例、C 群（前値の 50% 以下）1 例であった。AFP においては CR 群 2 症例中全例が A 群（陰性化）、PR 群 3 例では A 群 1 例、B 群 2 例、D 群（前値より上昇）1 例、MR 群 6 例においては A 群 2 例、B 群 3 例、C 群 1 例で、画像診断上の治療効果を PIVKA-II, AFP 両マーカーは、ともに反映する傾向にあった。次に PIVKA-II, AFP のどちらが、より良い治療効果判定の指標となり得るかを目的として行ったもののうち AFP, PIVKA-II 値がともに高値を示した 5 症例の検討を Fig. 10 に示すが、PIVKA-II においては、治療後早期より陰性化する例があり、これに比し AFP は緩徐な低下を示した。すなわち、PIVKA-II の低下度は全例で、AFP の低

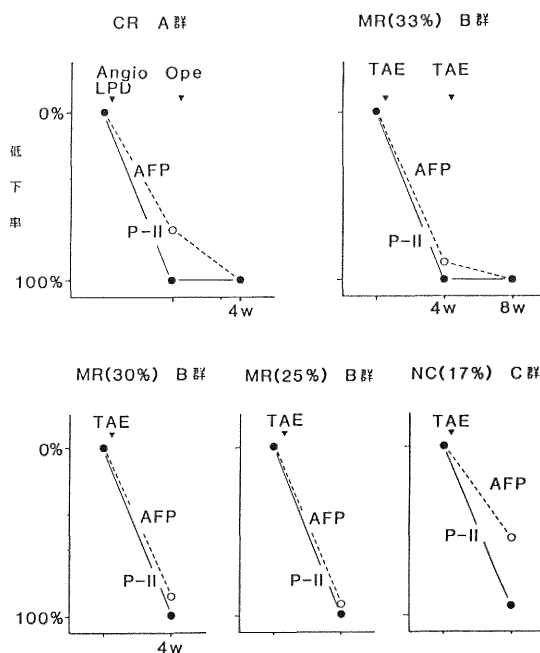


Fig. 10 Reduction rate of PIVKA-II and AFP concentrations 4 weeks after therapy in five patients with HCC.

CR, complete response; PR, partial response; MR, minor response; LPD, lipiodol injection; Ope, operation; TAE, transcatheter arterial embolization.

低下より急峻で、この傾向は画像上の縮小率とは関係なく認められ、PIVKA-II は抗腫瘍効果を過度に評価する危険性が示唆された。

2) PIVKA-II, AFP 解離例の検討

HCC 治療後、AFP, PIVKA-II 両マーカーが解離

して変動した症例は、HCC 155 例中 5 例 (3.2%) あり、そのうちわけは 1) HCC 診断時において AFP のみが陽性を示し、再発時には、PIVKA-II のみの上昇を認めた症例 (2 例)、2) 診断時において AFP ならびに PIVKA-II がともに陽性を示し、再発時 AFP または PIVKA-II のいずれか一方しか上昇を示さなかった例 (2 例)、3) 診断時において PIVKA-II のみが陽性を示し、再発時 AFP が病勢を反映した例 (1 例) を認めた。次に典型例を 2 例呈示する。

症例 1. (Fig. 11-A) 63 才女性。肝左葉 1.5 cm の AFP 陽性 HCC に対し PEIT を施行した。AFP は陰性化、経過中 PIVKA-II は陰性であった。1 年後、AFP は陰性のまま PIVKA-II が突然上昇し、肝右葉に 2.5 cm の HCC の再発を認め、再び PEIT にて治療し、

PIVKA-II は陰性化した。再発に際し、AFP 値は 50 ng/ml 以下で動揺をしめすのみであった。剖検にて肝右葉 (S8) に 1.5 cm 大の HCC を認めたが、PEIT 治療を施行した S2, S5 領域においては、瘢痕組織を認めるのみであった。

症例 2. (Fig. 11-B) 70 才男性。肝右葉の多結節性 HCC で PIVKA-II 陰性、AFP 値は 5141 ng/ml でそのフコシル化率は 41% と高値を示した。肝動脈塞栓療法 (TAE) ならびに活性化リンパ球による養子免疫療法により腫瘍は縮小を示し、AFP は陰性化した。18 か月後 PIVKA-II は、急峻な上昇を示し、肝左葉に肝内転移巣が認められたが、AFP 値の再上昇は認められなかった。追加治療後、治療効果を裏付けるように PIVKA-II

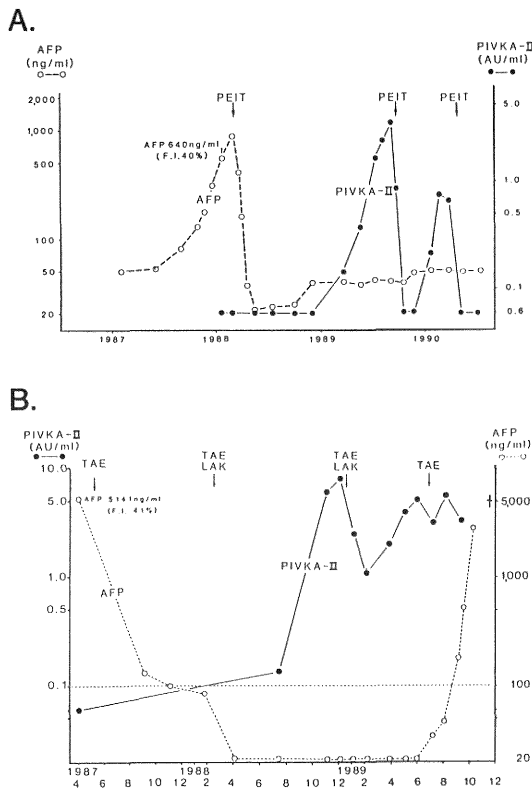


Fig. 11 Longitudinal series of the concentrations of PIVKA-II and AFP in patients with HCC.

PEIT, percutaneous ethanol injection therapy; LAK, Adoptive immunotherapy with lymphokine-activated killer cells. F.I., fucosylation index.

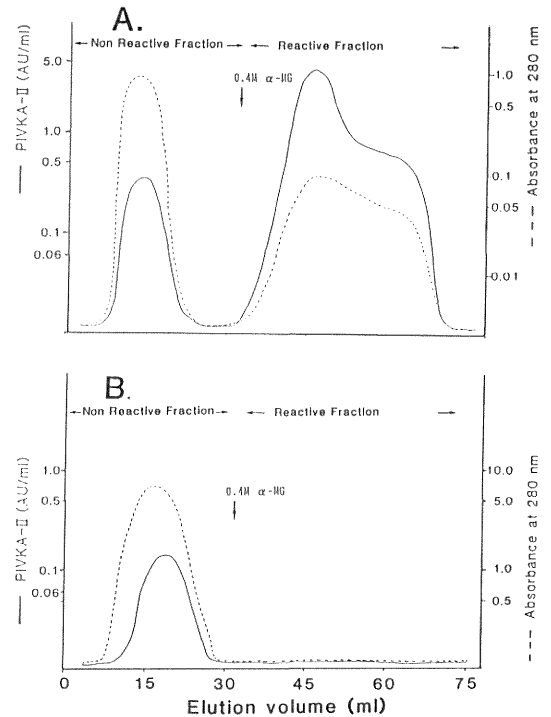


Fig. 12 Affinity chromatography elution profiles of human PIVKA-II with Con A-Sephrose.

A. Serum from patient with HCC (100 μ l) was applied to Con A-Sephrose.

B. Con A nonreactive fraction of PIVKA-II was collected and re-applied to Con A-Sephrose.

The arrows indicate the position where elution with 0.5 M α -methylglucoside solution was performed.

II 値は低下傾向を示した。5カ月後腫瘍は増大傾向を示し、それに伴い AFP 値が急上昇を示し、死亡した。剖検では、肝全葉に及ぶ多結節型 HCC の所見であった。

III. PIVKA-II ならびに各種血清蛋白の糖鎖変異

1) PIVKA-II

PIVKA-II の親和性クロマトグラフィーの結果を Fig. 12-A に示すが、Con A Sepharose 4B に吸着されない非結合性分画が存在している事を示している。この Con A 非結合性分画は、HCC 11例中4例において最高 18.5% から 3.5% の範囲で認められた。しかしながら非 HCC 例およびワーファリン投与例では、Con A 非結合性分画は全例に認められなかった。つぎに、HCC における PIVKA-II の Con A 非結合性分画を再度 Con A カラムに添加し、同分画が Con A 非結合性分画の位置に溶出される事、ならびに結合性分画には何も溶出されない事を確認した (Fig. 12-B)。また HCC 症例における PIVKA-II の LCA 結合性分画は 11例とも 0% であった。

2) PT

PT の親和性クロマトグラフィーにて分画後のロケット免疫電気泳動の結果を (Fig. 13) に示す。PIVKA-II の Con A 非結合性分画の上昇を認めた HCC 4例を含む HCC 群および非 HCC 群における PT の Con A 非結合性分画は、PIVKA-II とは異なり全例 0% であった。また LCA 結合分画も認められなかった。

3) AFP

AFP は前述のごとく LCA ならびに Con A にてそれぞれ 2 峰性に分画された。HCC 群における AFP の LCA 結合分画すなわちフコシル化率 ($51.2 \pm 32.6\%$) は、LC 群 ($4.0 \pm 6.0\%$) に比し unpaired t-test にて統計学上有意味な上昇 ($p < 0.001$) を示した。また AFP の Con A の非結合分画は $10.3 \pm 12.0\%$ と軽度の上昇を示した。

4) TF

TF は LCA にて 2 峰性に、Con A にて 4 峰性に分画され、移動度の大きい側より P1, P2, P3, P4 として、測定した (Fig. 14)。HCC 群における TF の LCA 結合分画 ($15.9 \pm 6.1\%$) は、LC 群 (5.7 ± 2.3

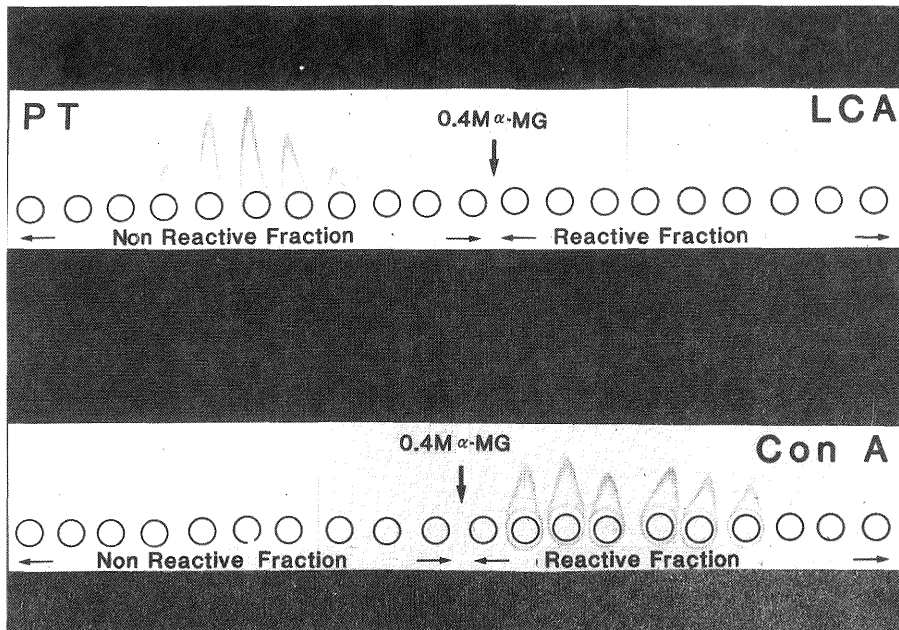


Fig. 13 Affinity chromatography elution profiles of human prothrombin (PT) with LCA- and Con A-Sepharose detected by Rocket immuno-electrophoresis.

The arrows indicate the position where elution with 0.5 M α -methylglucoside solution was performed.

Table 2 Lectin affinity profiles of PIVKA-II, AFP, transferrin and α_1 -antitripsin in patient with HCC.

	PIVKA-II		Prothrombin		AFP		Transferrin				α_1 -AT LCA*		
	濃度 (AU/ml)	LCA*	Con A*	LCA*	Con A*	AFP 濃度 (ng/ml)	フコシル 化率	LCA	Con A				
									P1	P2		P3	P4
HCC													
1. JO	365.00	0	3.5	0	0	320,000	11	24.0	0.0	15.0	85.0	0.0	21.0
2. CA	61.00	0	0	0	0	13,500	50	15.6	13.5	23.3	58.7	5.5	18.4
3. NE	45.00	0	0	0	0	16,200	79	20.0	7.9	26.4	58.7	7.0	16.9
4. MW	15.84	0	9.5	0	0	770,000	95	10.2	8.5	33.3	58.1	0.0	19.5
5. TT	12.94	0	18.5	0	0	8,800	27	13.8	4.5	24.1	63.5	7.9	13.7
6. HM	10.00	0	4.5	0	0	18,400	67	8.2	13.8	28.1	53.8	4.3	34.9
7. TS	6.87	0	0	0	0	11,563	0	12.5	0.0	28.6	71.4	0.0	11.9
8. MO	3.60	0	0	0	0	539	72	4.6	7.4	28.4	60.6	3.0	20.7
9. KS	2.70	0	0	0	0	3,800	18	8.5	0.0	34.3	64.7	0.0	16.0
10. GK	0.38	0	0	0	0	338,300	58	14.0	6.3	24.9	63.7	6.1	27.4
11. CW	<0.06	0	0	0	0	832	87	23.0	0.0	26.7	73.3	0.0	12.0
Mean			3.3	0	0		51.3	15.9	5.2	26.6	64.7	3.1	19.3
SD			± 5.9				± 32.6	± 6.1	± 5.2	± 5.2	± 8.9	± 3.2	± 6.9
			NS				(P<0.001)	<0.01	NS	(P<0.05)	NS		(P<0.001)
CONTROL													
Mean		0	0	0	0		4.0	5.7	3.1	20.7	68.1		13.0
SD							± 6.0	2.3	± 3.9	± 4.5	± 7.5		± 5.0
n		4(W.)	4(W.)	5(LC)	5(LC)		7(LC)	6(LC)	6(LC)	6(LC)	6(LC)		54(LC)

LCA*, LCA reactive(%); Con A*, Con A nonreactive(%); W., Warfarin therapy; LC, liver cirrhosis.

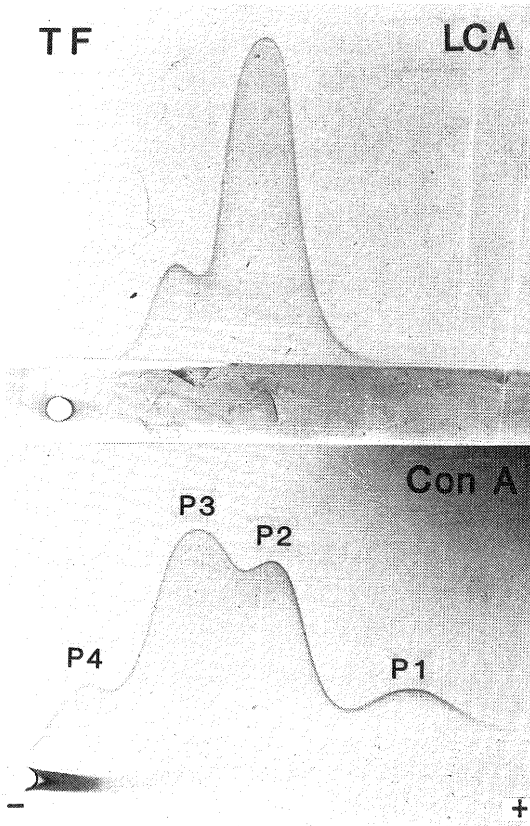


Fig. 14 Crossed immunoaffino-electrophoretic patterns in the presence of LCA (A) and Con A (B) of transferrin. (Serum from a patient with HCC.)

%) に比し unpaired t-test にて有意の上昇 ($p < 0.01$) を示した。また Con A 結合性では、HCC 群において TF の P2 画分 ($22.6 \pm 5.2\%$) が LC 群 ($20.7 \pm 4.5\%$) に比し unpaired t-test にて統計学上有意な上昇 ($p < 0.05$) を示し、P3 画分は LC の対応画分に比較して低下傾向を示した。

5) α_1 -AT

α_1 -AT は LCA にて 2 峰性に分画され (Fig. 15), HCC 群における α_1 -AT の LCA 結合分画 ($19.3 \pm 6.9\%$) は、LC 群 (13.0 ± 5.0) に比し unpaired t-test にて有意の上昇 ($p < 0.001$) を示した。

HCC 11 例における各糖蛋白の LCA および Con A レクチン反応性について、比較検討した結果を Table 2 に示す。症例 1. では、フコシル化率 11% と低値を示したが、TF および α_1 -AT の LCA 結合分画は、それ

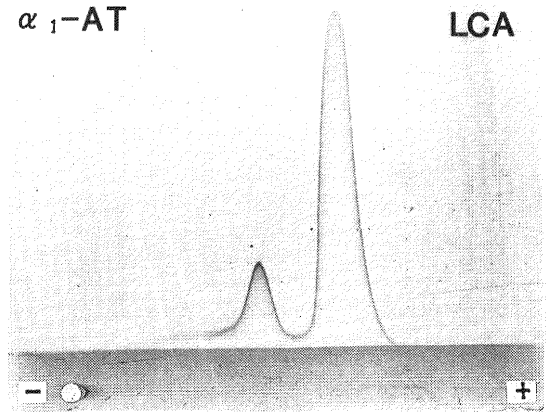


Fig. 15 Crossed immunoaffino-electrophoretic pattern of α_1 -antitripsin with LCA. (Serum from a patient with HCC.)

ぞれ 24.0%, 21.0% と高値を示した。また症例 4. において、AFP フコシル化率は 95% と高値を示したが、TF の LCA 結合分画は 10.2% と比較的 low 値を示した。症例 5. において、PIVKA-II の Con A 非結合性分画は、18.5% と高値を示したが、AFP の Con A 非結合性分画は 0% であった。症例 6. において、 α_1 -AT の LCA 結合分画は 34.9% と高値を示したが、TF の LCA 結合分画は 8.2% と low 値を示した。このように、各糖蛋白のレクチン結合性は、それぞれが独立した変動を示し一定の傾向は認められなかった。

考 案

1984 年 Liebman らによって報告³⁾された PIVKA-II は、ELISA 法の開発以後その有用性についての報告⁴⁾⁵⁾⁶⁾があり、当科を含む全国 PIVKA-II 研究会の報告⁶⁾において、HCC 558 例中 295 例 (52.9%) に PIVKA-II 値が 0.10 AU/ml 以上の高値を示している。また偽陽性例の検討では、悪性腫瘍 5.6% (6/107)、慢性肝炎 3.6% (19/533)、肝硬変 4.0% (16/404) と少数例に認められるのみで、PIVKA-II が特異性の高い検査であることを報告している。また、ビタミン K 欠乏が PIVKA-II の上昇に関与するためビタミン K の吸入不全が予測される肝内胆汁うっ滞、閉塞性黄疸においても PIVKA-II の上昇を示す例を認め、特に原発性胆汁性肝硬変において偽陽性率が高いとしている。今回の著者らの検討でも、陽性率 54.2%、特異性 97.6%、正診率 82.9% とほぼ同様の結果を得ており、特異性の高い検査であると考えられた。また、良性疾患において肝硬

変2例, 亜急性肝炎1例, PBC 2例, 総胆管結石1例, graft versus host disease 1例の計7例の偽陽性例を認めたが, 肝硬変症例を除き, いずれも黄疸例で, 黄疸の改善が得られた3例においては, 黄疸の軽減とともに PIVKA-II は正常化し, その原因として黄疸に伴うビタミンK吸収障害が示唆された. 黄疸を認めない肝硬変において2例の偽陽性例を認めたが, いずれも低値の上昇で, 2週間後の再検査では陰性化を示した. 他方, 胆嚢癌による遷延した閉塞性黄疸1例および黄疸のない悪性胸腺腫の肝転移例2例が PIVKA-II 陽性を示したが, その原因として黄疸以外にも, 長期にわたる中心静脈栄養管理あるいはN-メチルテトラゾールチオール基を有するセフェム系抗生物質投与の影響などに起因するビタミンK欠乏状態の存在が想定された. 左近⁷⁾らはHCC患者血漿において, phyllo-quinone (VK1), menaquinone-4 (MK4), menaquinone-7 (MK7) を測定し, HCC患者において有意なビタミンKの欠乏は認められなかったとしており, HCC由来とビタミンK欠乏に伴う PIVKA-II の上昇の鑑別に, ビタミンK測定は有用と思われた. 腫瘍サイズと PIVKA-II 値の検討では, 腫瘍径2cm以下の Small liver cancer 例においても2例の陽性例があり, その陽性率は9.5%とやや低いものの, cut off 値を測定感度限界である0.062 AU/ml まで下げた場合, 今回対象症例中さらにもう1例において陽性例が認められ, 今後測定感度の改善および cut off 値の再検討にて, Small liver cancer 診断における陽性率の増加が期待される.

AFP は, HCC 腫瘍マーカーとしてその診断, 治療効果の判定, 再発の予知などに広く用いられてきた. しかしながら, 軽微な AFP 値の上昇は, 肝硬変などの非癌性疾患においても多々認められ, HCC 診断上鑑別に苦慮するケースが多い. 著者らは, これら HCC 由来ならびに良性肝疾患由来 AFP の糖鎖構造の違い, 特にフコシル化にもとづく両者の分子識別を報告してきた²⁾⁸⁾⁻¹³⁾. 今回の検討によると, 良性疾患中22% (59/268) において, AFP 値が21 ng/ml 以上の上昇を示し, 測定可能であった. 35例のフコシル化率はいずれも低値で, このフコシル化率を検討することで良性肝疾患由来の AFP と HCC 由来の AFP との鑑別が可能であり, AFP の特異性を78%から91%まで高めることができた.

二型糖鎖抗原である SLX¹⁴⁾ は, 一型糖鎖抗原に比し陽性率が低い反面, 特異性が高く, 肺癌, 卵巣癌, 膵癌において有用であると報告されている. また, 他の二型糖鎖抗原に比し SLX は, その抗原決定基に, シアル

酸を有しているため肝細胞や網内系細胞による除去を受けにくく, 血液中に蓄積滞留すると推測されている¹⁵⁾. 今回の我々の検討では, SLX の HCC における陽性率はやや低いものの, HCC 群において良性肝疾患群に比し有意な上昇を示し特異性の高い検査であると考えられた. また AFP, PIVKA-II とともに陰性の HCC 9例中2例が SLX 陽性を示し, いずれも最大径3cmの比較的早期の症例であったことより, AFP, PIVKA-II との併用にて HCC の診断能の向上が示唆された.

一方 CA-50¹⁶⁾ は, HCC, 良性肝疾患ともに軽度の上昇を示し HCC において特異性は認められなかったが, 転移性肝癌で500 U/ml 以上の高値を呈する例があり, その鑑別に有用であった.

Dupan-2¹⁷⁾ は HCC 群, 良性肝疾患群, 転移性肝癌群でそれぞれ同程度に上昇を認め HCC 特異性は指摘できなかった. また, CA-50 あるいは Dupan-2 高値の HCC 例において治療による値の変動を検討したが, 病勢を反映すると考えられる成績は得られなかった. すなわち, これら二者の糖鎖抗原においては, HCC の基礎疾患である肝硬変などによる肝クリアランスの低下, あるいは腫瘍占拠性病変による二次的な胆道系への影響がその上昇機序である事が示唆され, 腫瘍マーカーとしての意義は少ないものと考えられた.

HCC 治療効果判定における PIVKA-II, AFP の同時測定の有用性を検討した結果, 腫瘍縮小率との正の相関を認めた. しかしながら PIVKA-II は AFP に比較して, 治療により鋭敏に低下し, ややもすると治療効果を過大評価する傾向があり, AFP が治療の効果量と低下率との容量依存性をより良く反映すると考えられた. この理由として PIVKA-II は, AFP に比較して半減期が極めて短い事や, その産生過程に酸素反応を介している事などが考えられた.

解離例の検討では, HCC 150例中5例において, AFP ならびに PIVKA-II 値の解離を認め, 単一の腫瘍マーカーのみの経過観察では不十分な場合がある事を意味していると考えられた¹⁸⁾. 解離の原因として, 頻回の化学療法ならびに肝動脈塞栓術に伴う HCC クロウンの腫瘍マーカー産生性の変異が推定されるが, エタノール局注例で, 他の部位の再発時にマーカーの解離を示した症例が1例あり, 異時性多中心性発癌により, このような変化が生ずる可能性も示唆された. また今回検討した初回時マーカー陽性の HCC 症例において, 再発時に PIVKA-II または AFP の再上昇を伴わない例は認められず, 両者の同時測定は有用と考えられた.

血漿蛋白質はアルブミンを除いて大半が糖蛋白質であり、その多くは主として肝臓において合成されており、各種肝疾患における血漿糖蛋白質成分の変動が臨床的に検討されてきた¹⁹⁾。一方、担癌患者で産生される糖蛋白質は免疫学的には正常のものと区別し得ないが、等電点、電気泳動度、各種レクチンに対する親和性などの異なっている場合が多いことより癌化に伴って糖蛋白質の糖鎖部分に構造変化がおこっていることが指摘されていた²⁰⁾。しかしながら、肝臓で産生される血液凝固蛋白の癌化に伴う糖鎖変異の報告は、認められない。今回の PIVKA-II ならびに PT の癌化に伴う糖鎖変異に関する検討では、HCC 症例における PIVKA-II の Con A 非結合性分画の存在を確認した²⁶⁾。しかし、同症例の血漿中プロトロンビンにおいては Con A 非結合性分画は認められず、また良性肝疾患患者血漿およびワーファリン服用患者血漿の PIVKA-II にも認められなかった。また LCA 結合性分画は、PIVKA-II、PT ともに認められなかった。プロトロンビン (PT) 糖鎖においては、biantennary type の糖鎖が知られている²⁷⁾が、非結合性分画の糖鎖構造としては、本来のプロトロンビン糖鎖に bisecting N-アセチルグルコサミンが付加したもののや、tri-antennary, tetra-antennary 型などが推定され、癌化に伴う変異が示唆された。このことは PIVKA-II の HCC における産生機序を考える上で興味深い事実であるとともに、良性肝疾患由来の PIVKA-II と HCC 由来の PIVKA-II の鑑別において有用と考えられた。

HCC 患者における、糖鎖変異の各種蛋白における相互関係の検討を目的に行った血液凝固蛋白以外の AFP、 α_1 -AT、ならびに TF の今回の検討では、LCA 結合分画は HCC 患者血清において、良性肝疾患に比し有意な増加を示した。他方 TF においては、HCC 患者における Con A 非結合性 TF の増加が認められた。しかしながら、今回検討した各糖蛋白質のレクチン反応性は、症例によりそれぞれ独立した変化を示し、ある糖蛋白質の糖鎖変異の多寡が、必ずしも他の糖蛋白質の糖鎖変異に影響を及ぼさず、これらの五種の糖蛋白質の glycosylation は独立した調節をうけている事が推定された。

結 語

1) PIVKA-II は、HCC 患者血漿において 54.2% (84/155) において陽性を示し、特異性は 97.6% (7/300) と高値を示し、正診率は 82.9% (377/455) であった。

2) PIVKA-II、AFP ならびに SLX の同時測定は、

正診性を下げる事なく、HCC における陽性率を 53.3% (PIVKA-II 単独) から 88.3% まで高めることが可能であった。

3) 腫瘍縮小率ならびに解離例の検討より、PIVKA-II と AFP の同時測定は、HCC 経過観察において、有用な検査法と考えられた。

4) PIVKA-II 糖鎖の検討にて Con A 非結合性種の存在を示唆する結果を得た。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました朝倉 均教授に深甚なる謝意を表します。また直接御指導を賜りました青柳 豊講師に深く感謝いたします。

なお、本研究の主旨は、第30回消化器病学会大会、第25回肝癌研究会、第26回肝癌研究会、第77回消化器病学会総会、第25回肝臓学会総会、第27回肝癌研究会にて発表した。

参 考 文 献

- 1) Abelev, G.I.: Production of embryonal serum α -globulin by hepatomas: Review of experimental and clinical data. *Cancer Res*, **28**: 1344~1350. 1968.
- 2) Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Isemura, M. et al.: Differential reactivity of alpha-feto protein with lectins and evaluation of its usefulness in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Gann*, **75**: 809~815, 1984.
- 3) Liebman, H.A., Furie, B.C., Tong, M.J. et al.: Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, **310**: 1427~1431, 1984.
- 4) Fuziyama, S., Morishita, T., Hashiguchi, O. et al.: Plasma abnormal prothrombin (des- γ -carboxy prothrombin) as a marker of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **61**: 1621~1628, 1988.
- 5) 小黒 仁, 青柳 豊, 齊藤 敦, 他: 肝細胞癌診断における AFP, PIVKA-II, シアリル Le^x-i 抗原 (SLX), CA-50, および Dupan-2 の臨床的意義. *肝臓*: **30**: 1589~1595, 1989.
- 6) 服部 信: 肝細胞癌における異常プロトロンビンの臨床的評価. *臨床と研究*, **65**: 249~258, 1989.
- 7) Sakon, M., Monden, M., Gotoh, M. et al.: The effects of vitamin K on the generation of

- des- γ -carboxy prothrombin (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*, **86**: 339~345, 1991.
- 8) 宮崎 純, 遠藤康夫, 織田敏次: Crossed immunoaffino-electrophoresis による α -フェトプロテインのレクチン親和性の分析. *肝臓*: **22**: 1559~1568, 1981.
 - 9) Taketa, K., Lzumi, M., Ichikawa, E. et al.: Distinct molecular species of human α -fetoprotein due to differential affinities to lectins. *Ann NY Acad Sci*, **417**: 61~68, 1983.
 - 10) Aoyagi, Y., Isemura, M., Yoshizawa, Z. et al.: Fucosylation of serum alpha-fetoprotein with primary hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta.*, **830**: 217~223, 1985.
 - 11) Aoyagi, Y., Isemura, M., Suzuki, Y. et al.: Fucosylated alpha-fetoprotein as a marker of early hepatocellular carcinoma. *Lancet*, **2**: 1353~1354, 1985.
 - 12) Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Isemura, M. et al.: The fucosylation index of alpha-fetoprotein and its usefulness in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **61**: 769~774, 1988.
 - 13) Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Igarashi, K. et al.: The usefulness of simultaneous determinations of glucosaminylation and fucosylation indices of alpha-fetoprotein in the differential diagnosis of neoplastic diseases of the liver. *Cancer*, **67**: 2390~2394, 1991.
 - 14) Solter, D. and Knewles, B.: Monoclonal antibody defining a stage-specific embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**: 5565~5569, 1978.
 - 15) Kannagi, R., Fukusi, Y., Takikawa, T. et al.: Quantitative and qualitative characterization of human cancer-associated serum glycoprotein antigens expressing fucosyl or sialylfucosyl Type 2 chain polylactosamine. *Cancer Res*, **46**: 2619~2626, 1986.
 - 16) Lindholm, L., Holmgren, J., Svennerholm, L. et al.: Monoclonal antibodies against gastrointestinal tumor-associated antigens isolated as monosialo gangliosides. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **71**: 178~181, 1983.
 - 17) Metzgar, R.S., Gaillard, M.T., Levine, S.J. et al.: Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cell defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res*, **42**: 601~608, 1982.
 - 18) 小黒 仁, 青柳 豊, 斉藤 敦, 他: 肝細胞癌治療効果判定における AFP, PIVKA-II 同時測定の有用性. *肝臓*, **81**: 1063, 1991.
 - 19) 谷内 昭: 糖蛋白, *肝胆膵*, **2**: 803~811, 1981.
 - 20) 小幡 陽: 腫瘍産生糖蛋白質の糖鎖の異常. 癌と化学療法, **13**: 747~753, 1986.
 - 21) Yamashita, K., Hitoi, A., Taniguchi, N. et al.: Comparative study of the sugar chains of γ -glutamyltranspeptidases purified from rat liver and rat AH-66 hepatoma cells. *Cancer Reserch*, **43**: 5059~5063, 1983.
 - 22) Sekine, C., Aoyagi, Y., Suzuki, Y. et al.: The reactivity of alpha-1-antitrypsin with Lens culinaris agglutinin and its usefulness in the neoplastic diseases of the liver. *Br J Cancer*, **56**: 371~375, 1987.
 - 23) 斉藤 敦, 青柳 豊, 小黒 仁, 他: 肝細胞癌患者血清 α_1 -アンチトリプシンの糖鎖構造解析. *肝臓*, **80**: 896, 1991.
 - 24) 鈴木康史, 青柳 豊, 五十嵐健太郎, 他: アルファフェトプロテイン (AFP) 低フコシル化肝細胞癌 (HCC) 患者血清中におけるトランスフェリン (TF) 糖鎖変異に関する研究. *肝臓*, **31**: suppl. 1990.
 - 25) Kisiel, W. and Hanahan, D.J.: Purification and characterization of human Factor II. *Biochim Biophys Acta*, **304**, 103~11., 1973.
 - 26) 小黒 仁, 青柳 豊, 斉藤 敦, 他: 肝細胞癌症例における血中 PIVKA-II の糖鎖変異に関する検討. *肝臓*, **78**: 894, 1991.
 - 27) Mizouchi, T., Fuji, J., Walter, K. et al.: Studies on the Structures of the Carbohydrate Moiety of Human Prothrombin. *J Biochem* **1023**, 1981.

(平成4年2月24日受付)