

①

主 論 文

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

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), 28)-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Liebmanら³⁾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, シアリル 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、エーザイ社エイテストモノ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2cm以下、2.1cm以上3.0cm以下、3.1cm以上5cm以下、5.1cm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0.02Mペロナール緩衝液pH8.6にてLCA(0.5mg/ml), Con A(2.0mg/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100V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50V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¹⁸⁾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

HCC155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(Trans-catheter 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50mM Tris-HCl, pH7.5, 0.15M NaCl, 1mM Ca^{2+} , 1mM Mn^{2+} を使用し、氷室(4°C)にて、血清100 μ lをLCA, Con Aカラム各8.8ml, 6.6mlに添加し非結合分画を得、次に0.5M α -methylglucoside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、20mlの血漿に1M塩化バリウム1.6mlを添加混和後3600gにて遠心し、得られた沈澱を3mlの0.1M NaCl, 5mM BaCl₂, 5mM 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、0.02Mのペロナール緩衝液pH8.6を使用し1%アガーロースゲルにDAKO社製ウサギ免疫抗ヒトPTを添加し、定電圧50V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0.1AU/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, 5cm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2cm以下単発) のにおいては, 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1.5cm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21ng/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 $+2SD$ 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

討した結果をしめすが (Fig. 6), 血漿 PIVKA-II 値 0.1 AU/ml 未満と 0.1 AU/ml 以上をしめした HCC 症例の 2 群間において, AFP フコシル化率を検討し, 0.1 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 にて統計学的に有為な上昇 ($p < 0.01$) 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) の陽性例が認められ, 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500U/ml以上の高値を呈する例が42%(10/26)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。

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非産性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の低下度より急峻で、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.11A) 63才女性。肝左葉1.5cm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. 11B) 70 才男性 肝右葉の多結節型 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 カ月後 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 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. 12Aに示すが、Con A Sepharose 4Bに吸着されない非結合分画が存在してする事を示している。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. 12B)。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HCC4例を含むHCC群および非HCC群におけるPTのCon A非結合分画は、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にては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 ($5.7 \pm 2.3\%$) 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。

HCC11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、フコシル化率は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%と比較的低値を示した。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%と低値を示した。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, HCC558例中295例(52.9%)に PIVKA-II 値が0.10AU/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の吸収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例の偽陽性例をみとめたが, 肝硬変症例を除き, いずれも黄疸例で, 黄疸の改善が得えられた 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, phyloquinone (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、腫瘍経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0.062AU/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の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の診断上鑑別に苦慮する場合が多い。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21ng/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、脾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ともに陰性のHCC9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500U/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、その産生過程に酵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 クローン¹⁹⁾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

一陽性の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質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)においてに陽性をしめし、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 非結合亜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。

文 献

- 1) Abelev GI: 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 HA, Furie BC, Tong MJ, 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, 斉藤 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, Izumi M, Ichikawa E: Distinct molecular species of human α -feto-

protein 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 fucosyl

ation 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 RS, Gaillard MT, Levine SJ, 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 Research 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. & Hanahan, D. J: Purification and characterization of human Factor II. Biochim Biophys Acta, 304, 103-113, 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 Carbo-
hydrate Moiety of Human Prothrombin. J
Biochem 1023, 1981

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, cholelithiasis; 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).

Fig. 4 Relationship between plasma concentrations of PIVKA-II (logarithmic scale) and serum concentrations of AFP (logarithmic scale) in patients with HCC. (n=155)

Fig. 5 Relationship between the fucosylation index of AFP (arithmetic scale) and plasma concentrations of PIVKA-II in patients with HCC.

Fig. 6 Serum concentrations of AFP (logarithmic scale) and the fucosylation index of AFP (arithmetic scale) in patients with HCC, LC and CH.

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.

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.

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 PLVKA-II with Con A-Sepharose.

A. Serum from patient with HCC ($100\mu\text{l}$) was applied to Con A-Sepharose.

B. Con A nonreactive fraction of PLVKA-II was collected and re-applied to Con A-Sepharose.

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

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

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

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

from a patient with HCC.

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

PIVKA-II concentration (AU/ml)

0.1 1.0 10.0 100.0 500.0

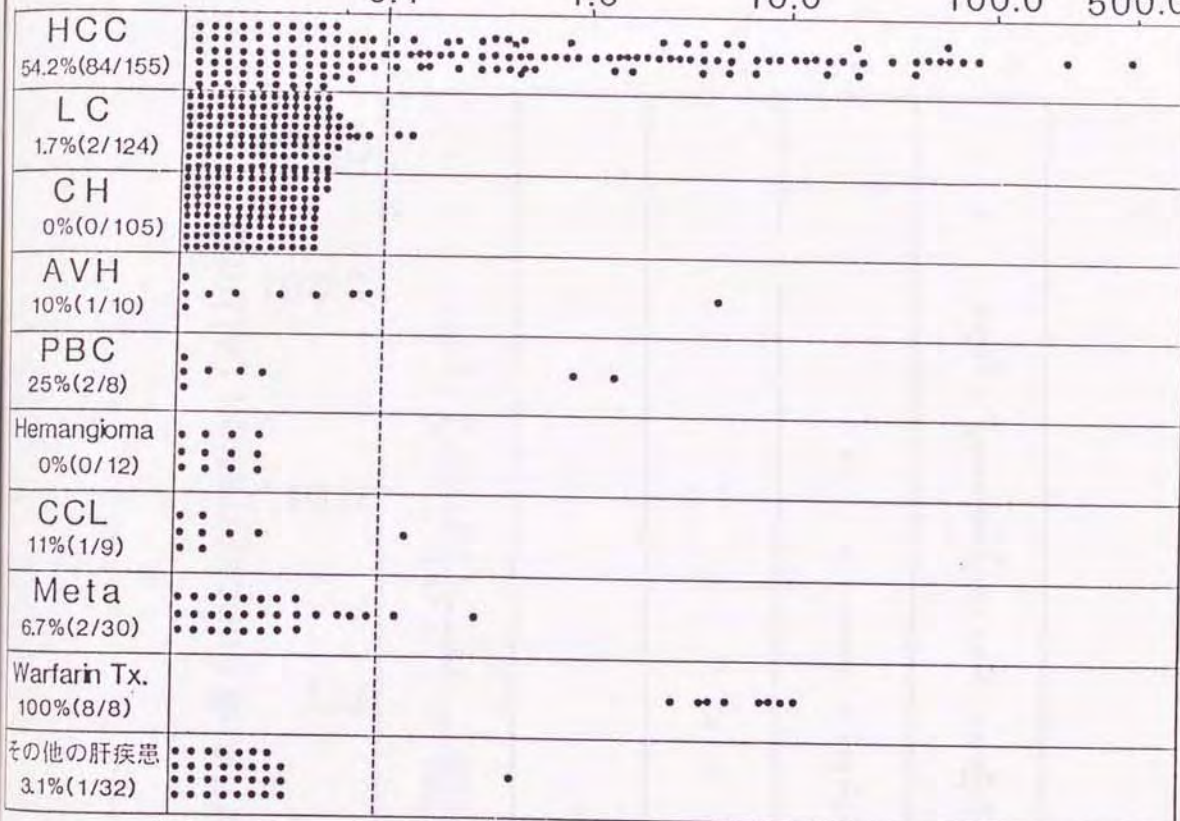


fig.1

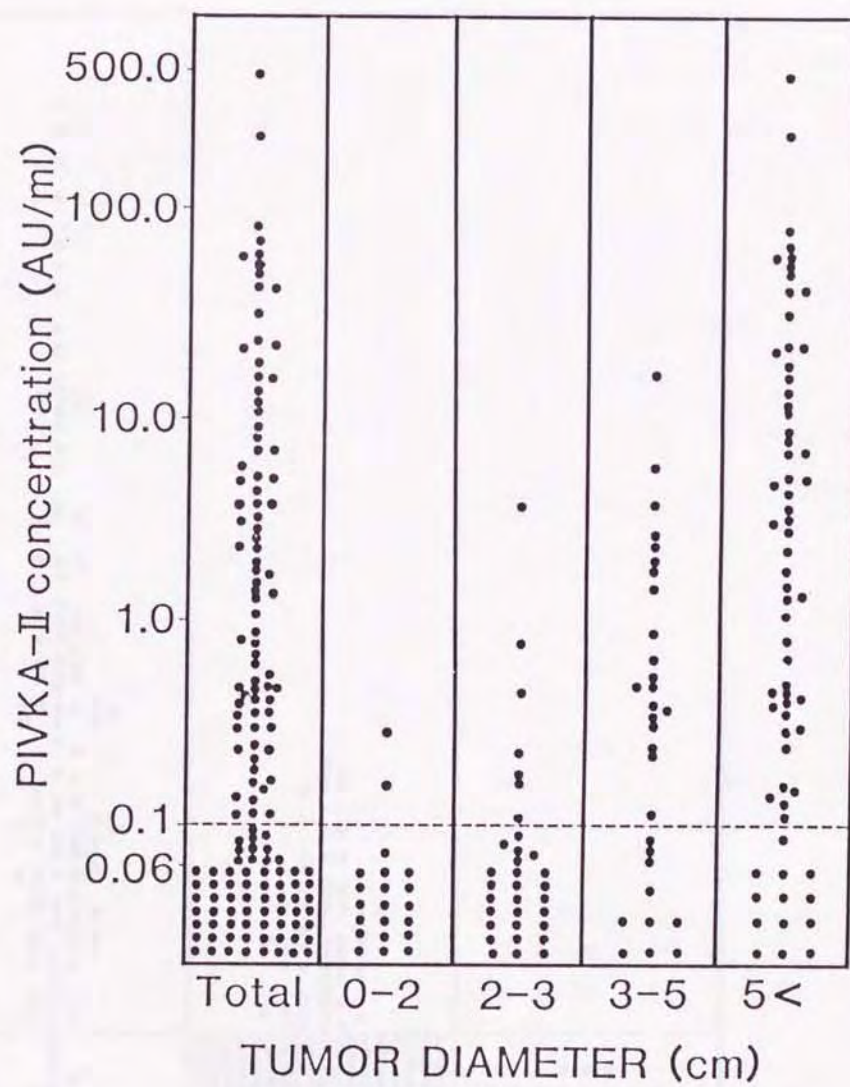


fig.2

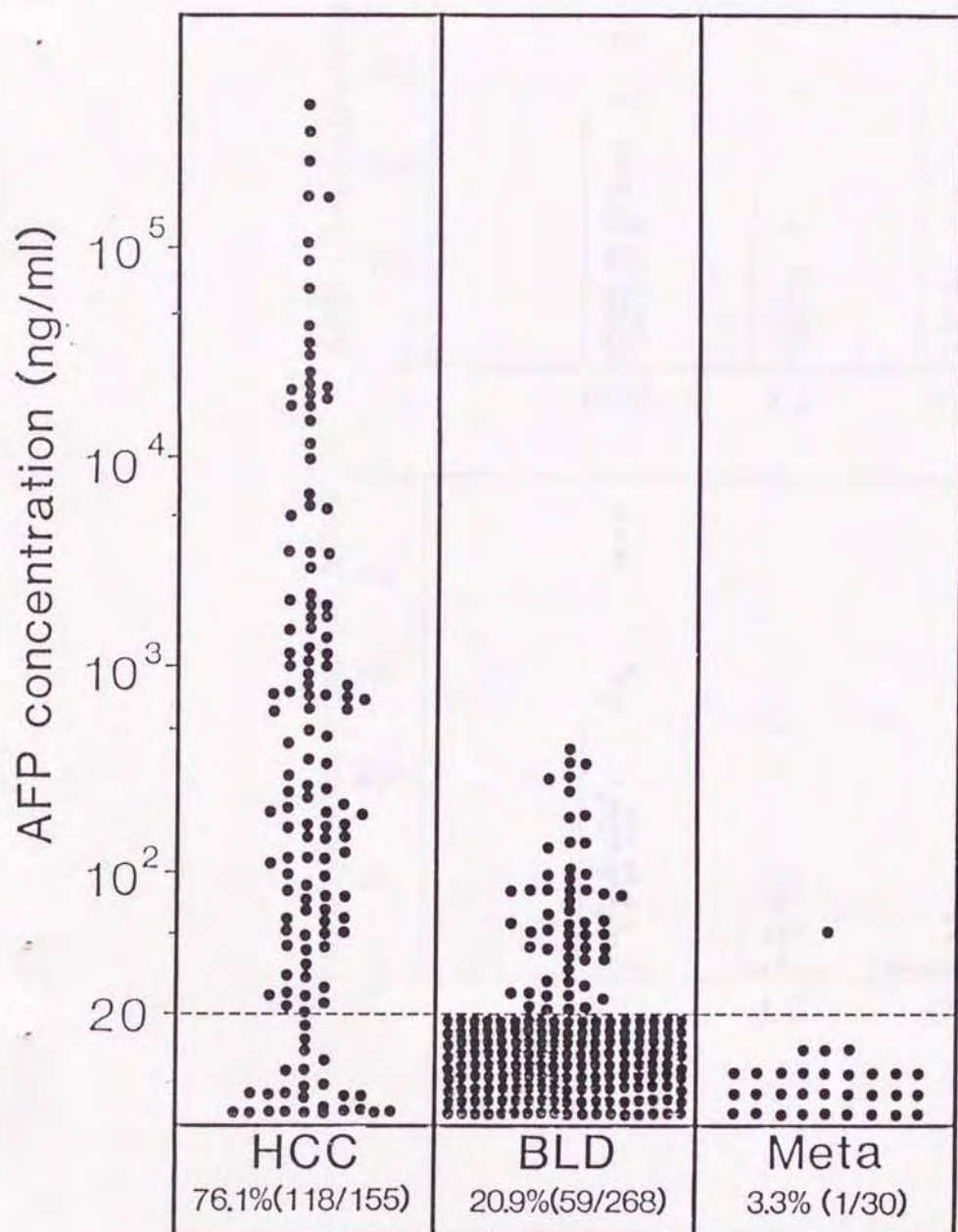


fig.3

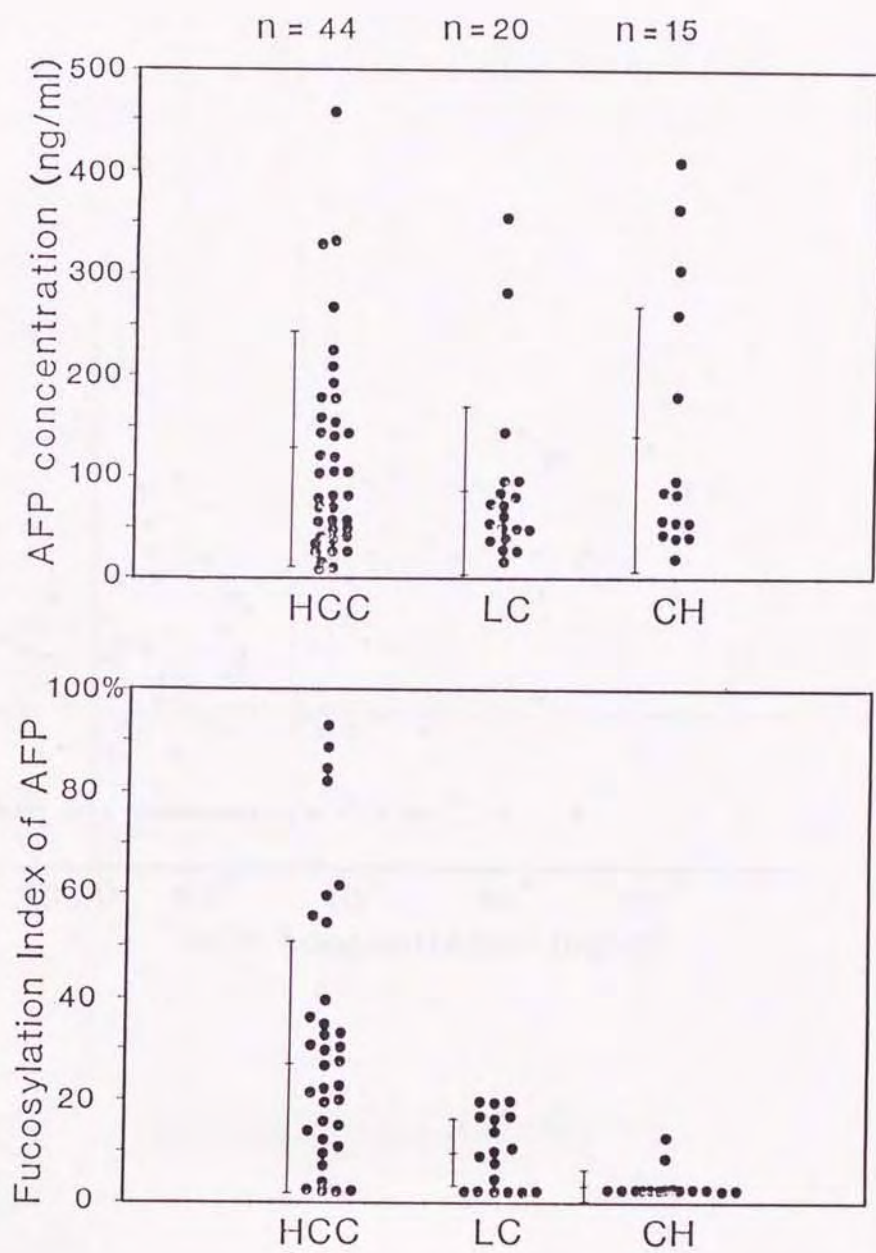


fig.4

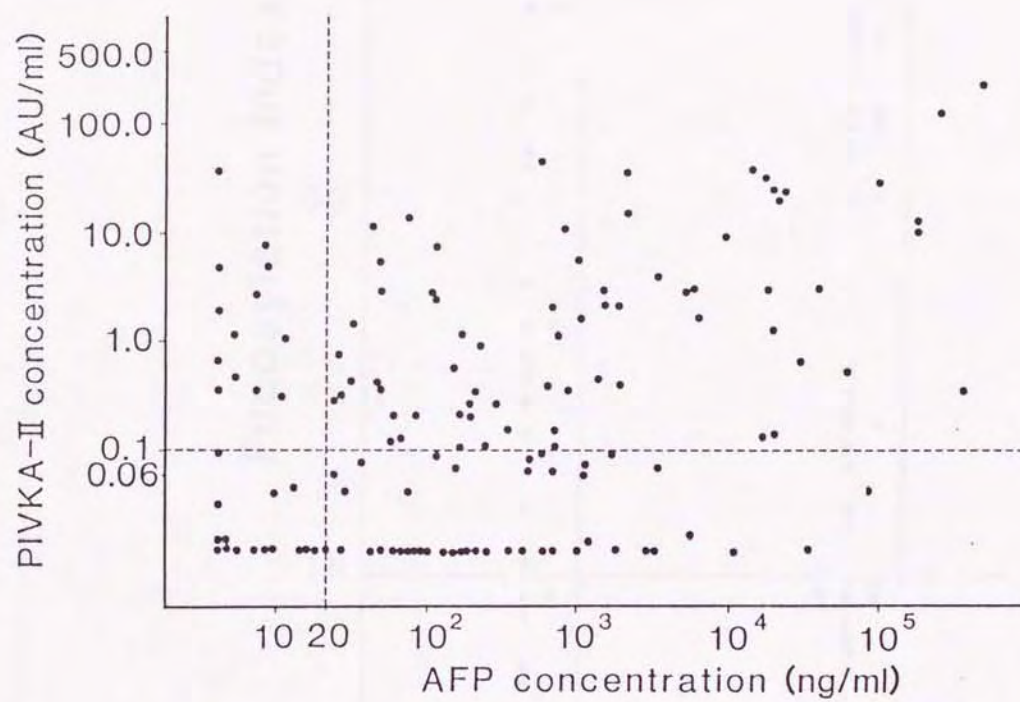


fig.5

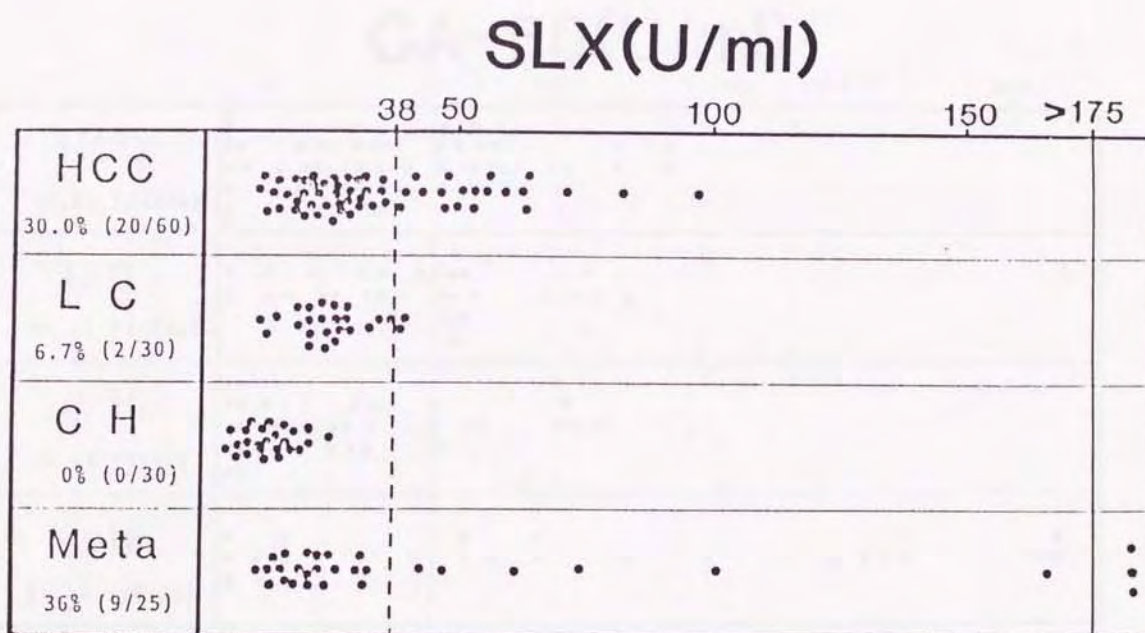


Fig. 7

CA-50(U/ml)

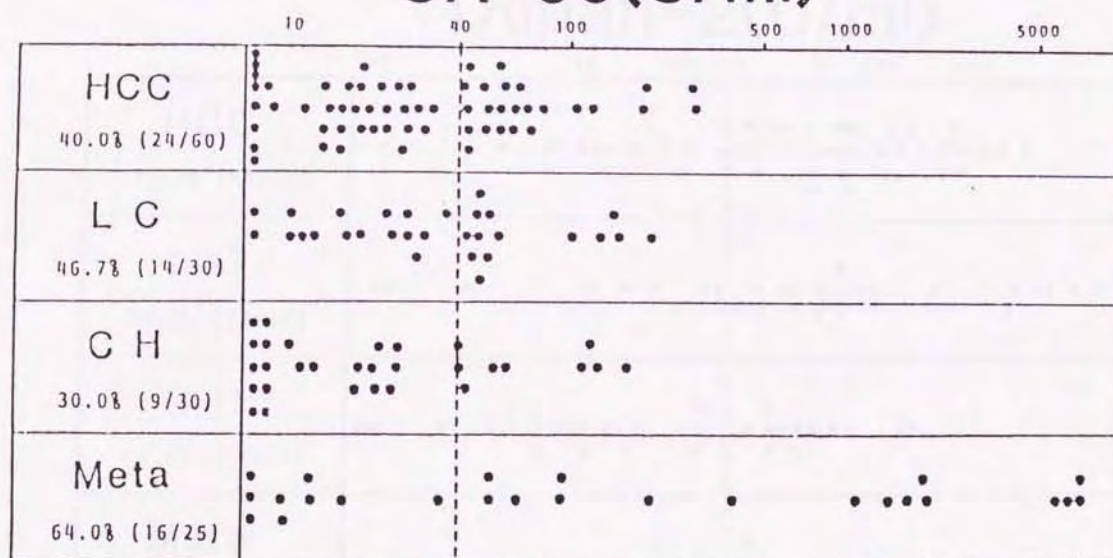


Fig.8

Dupan-2(U/ml)

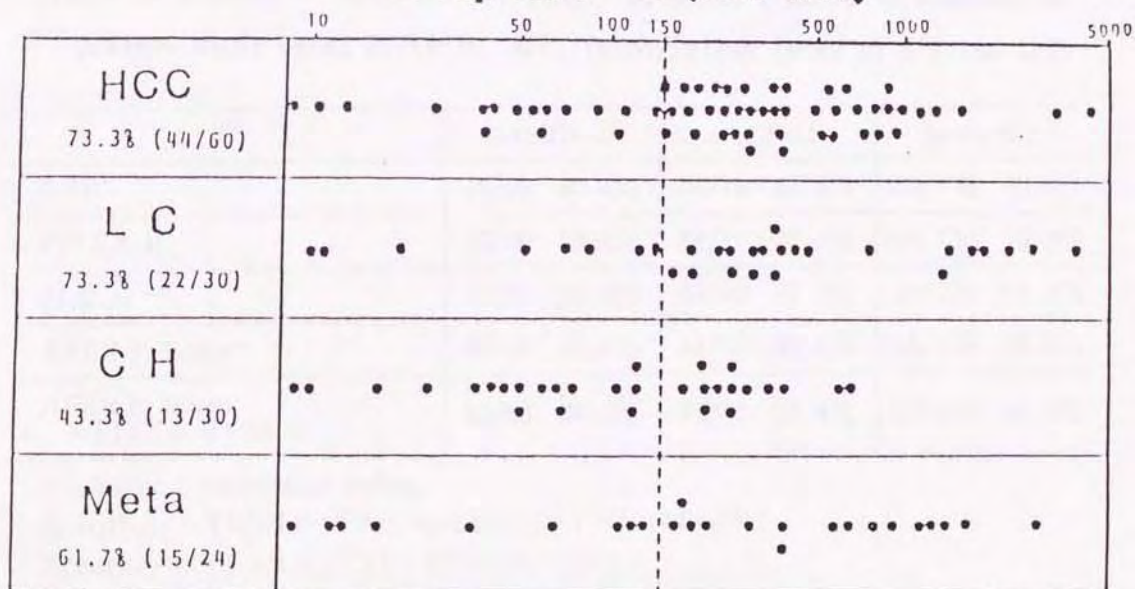


Fig.9

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 30.0%	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

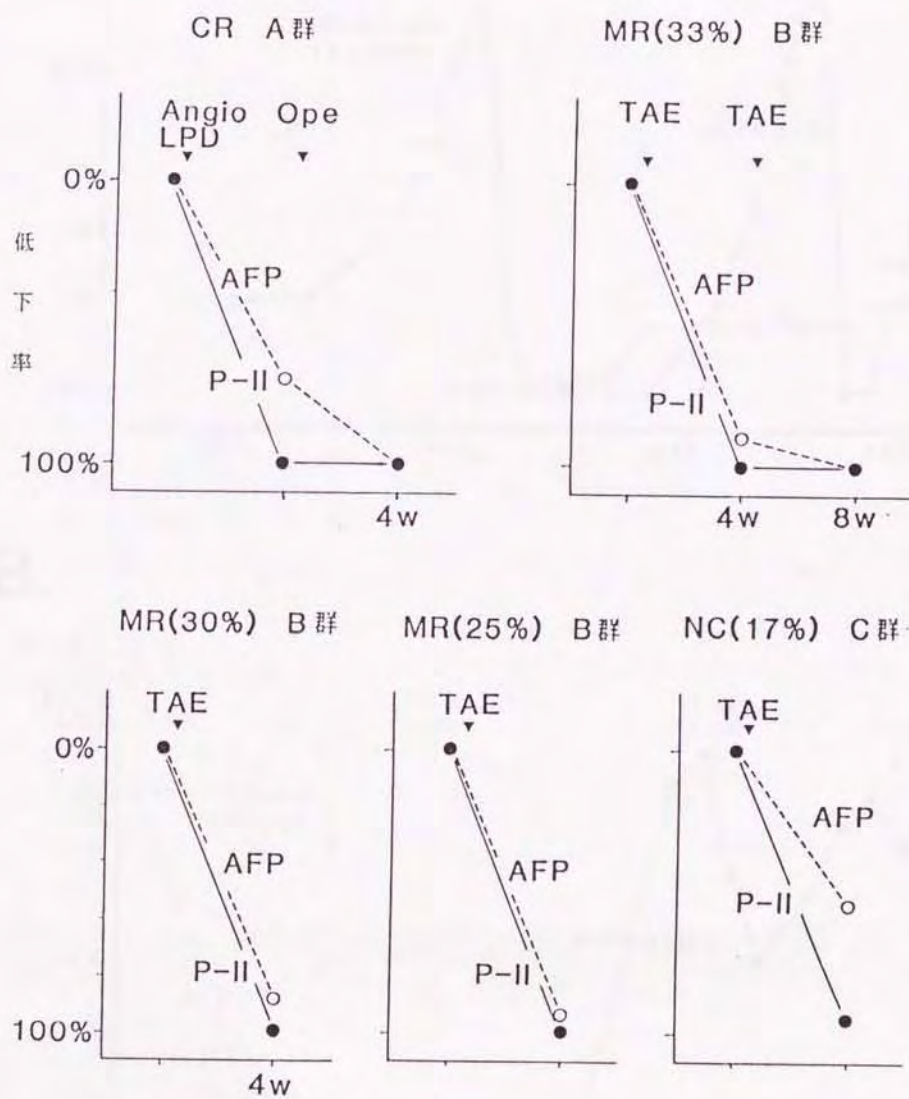
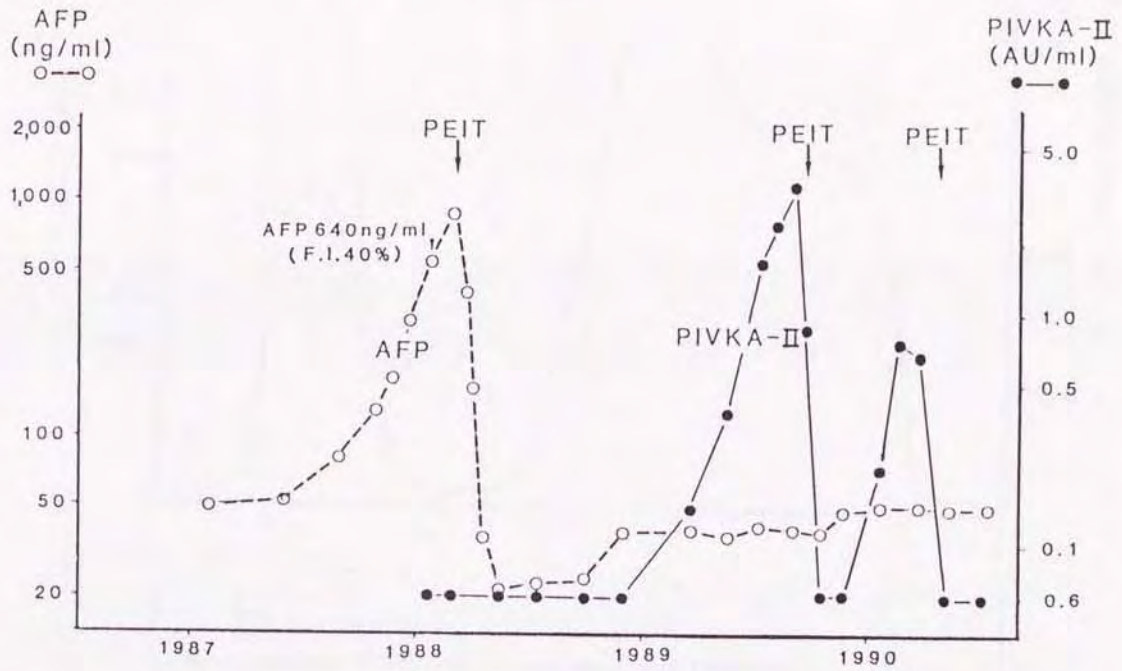


fig.10

A.



B.

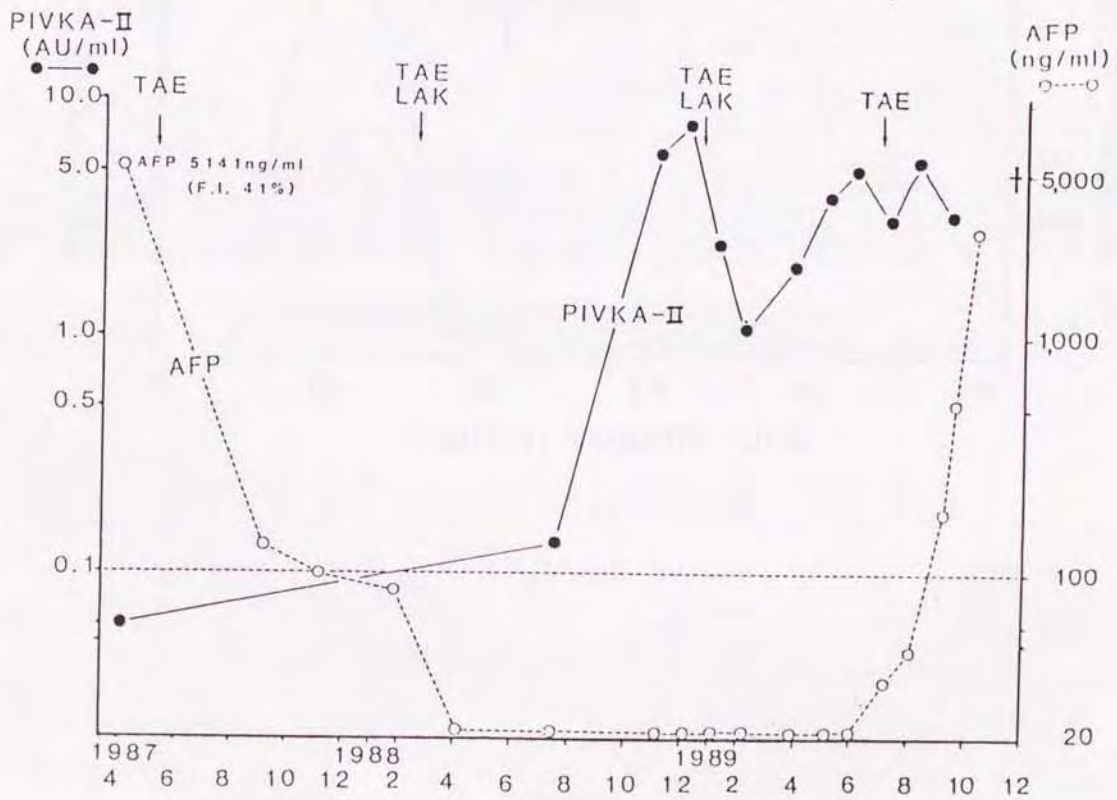


fig.11

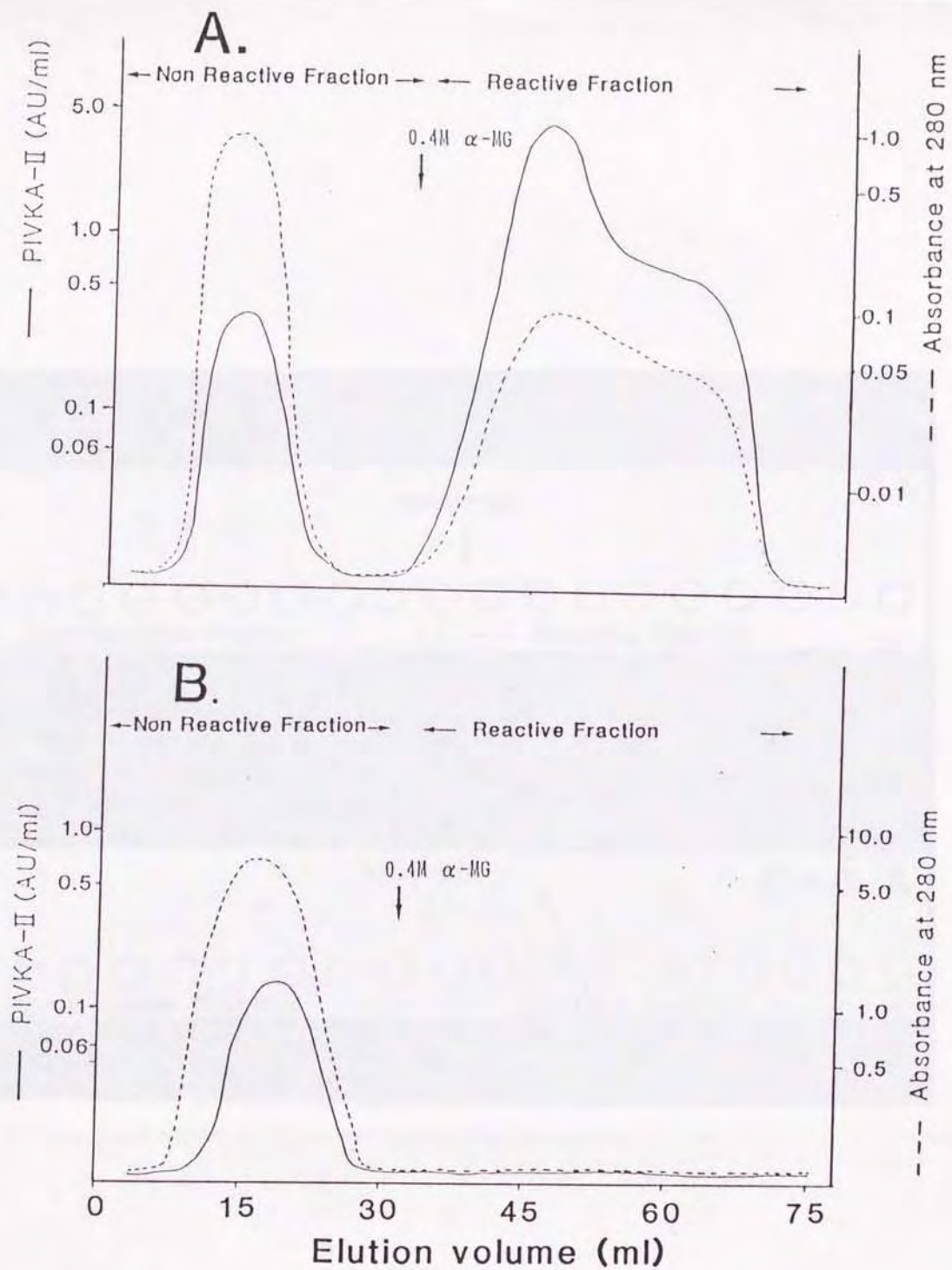


fig.12

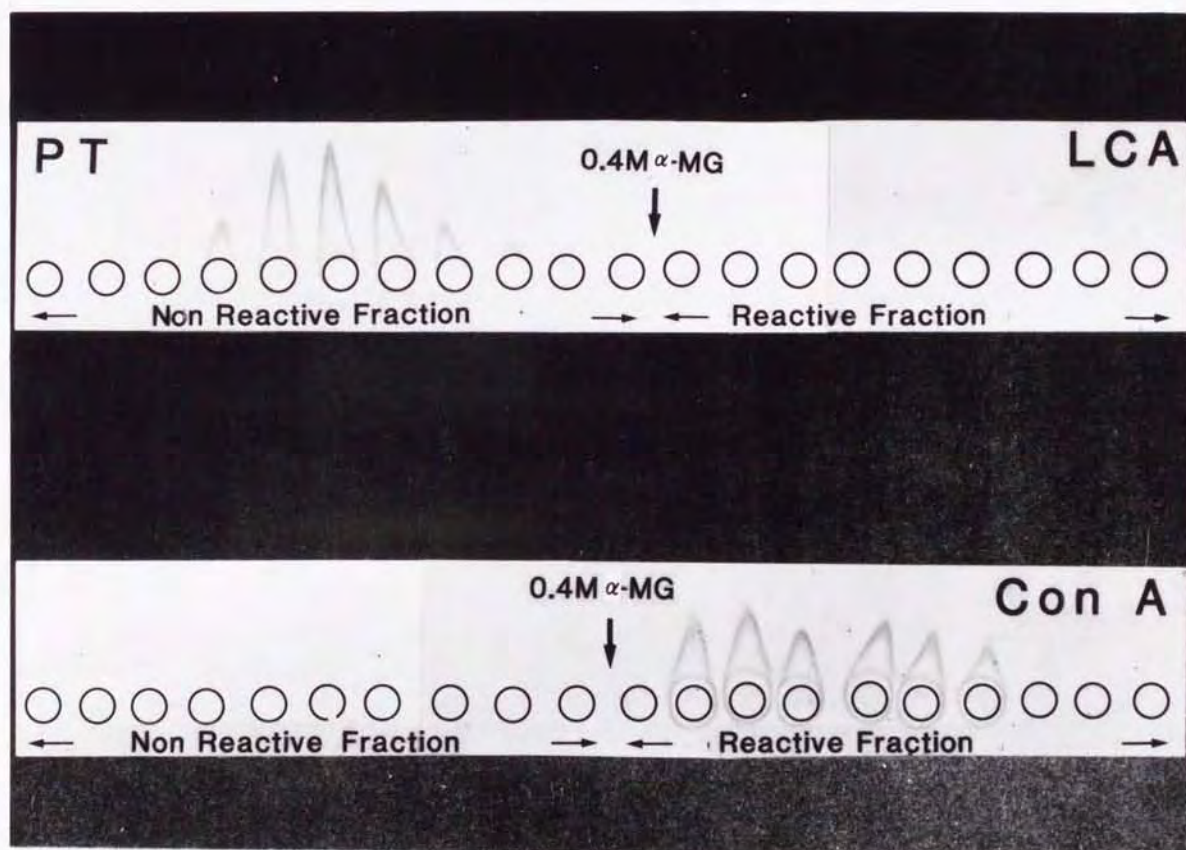


fig.13

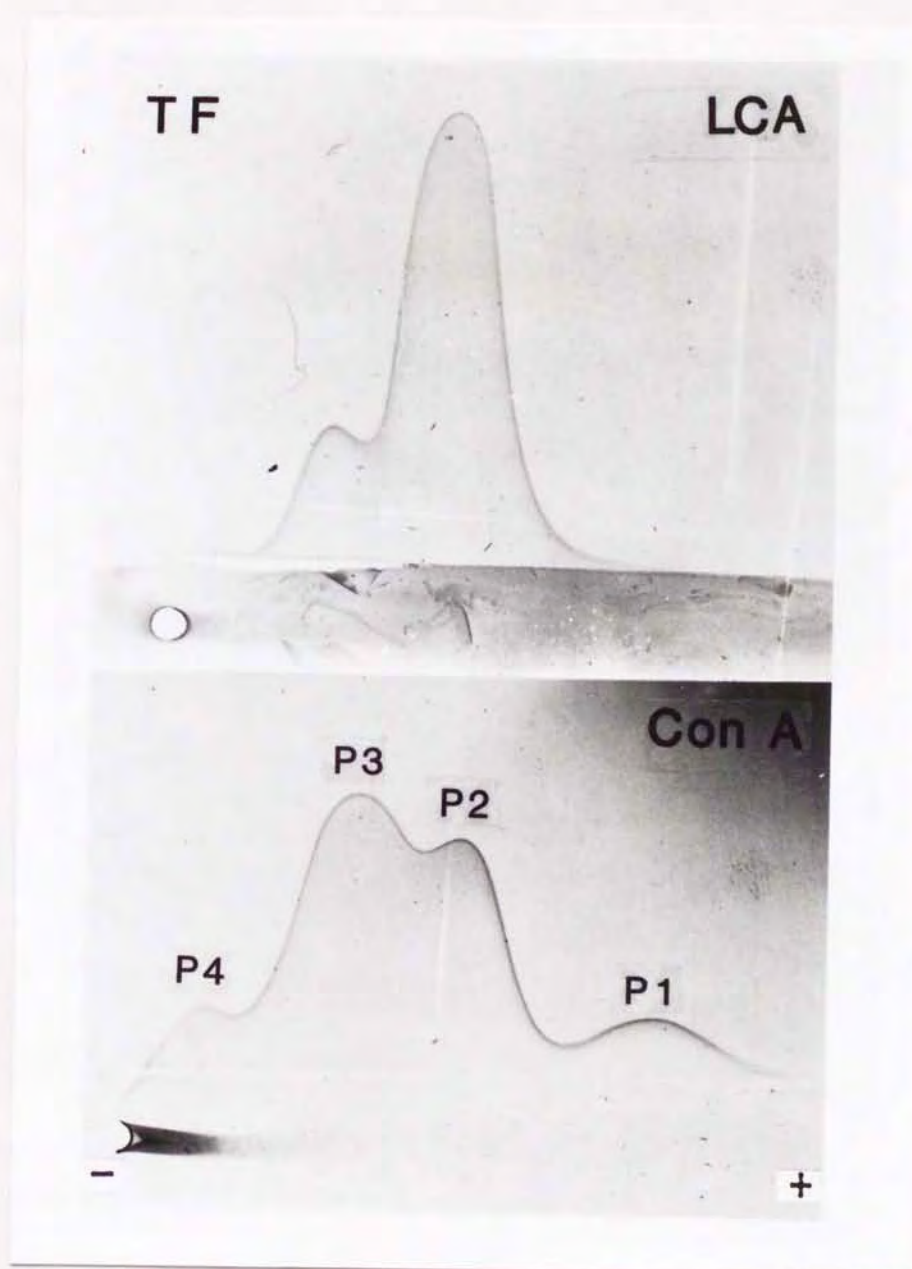


fig.14

α_1 -AT

LCA

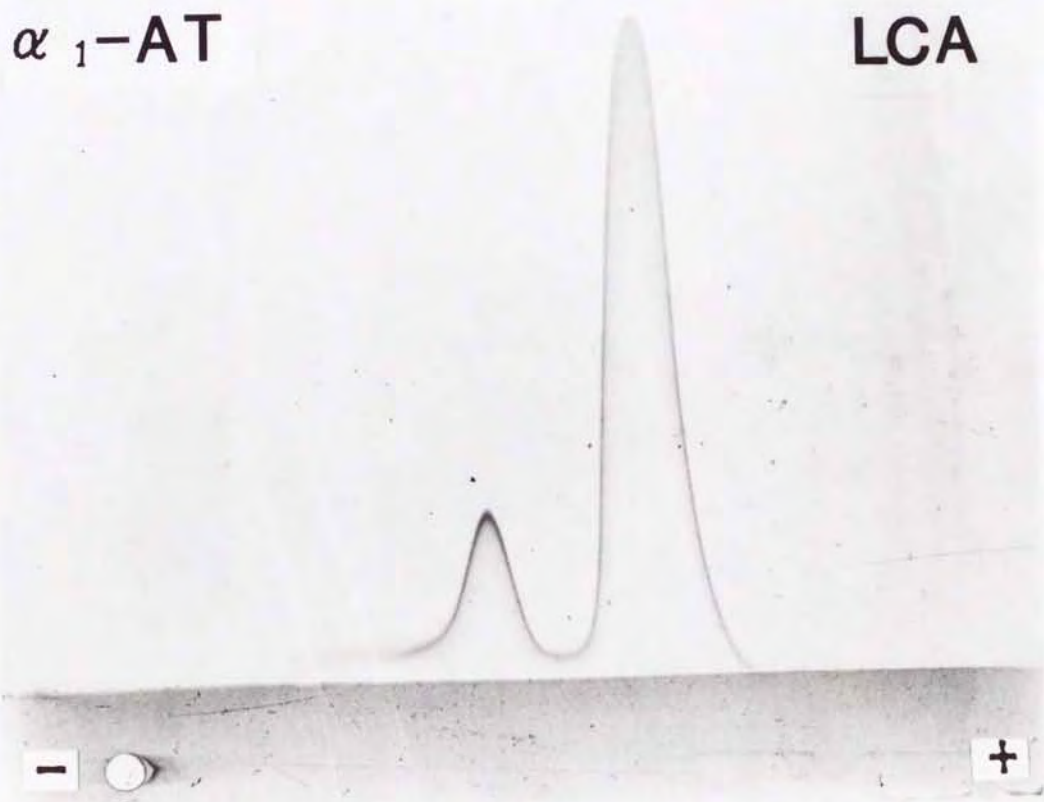


fig.15

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

	PIVKA-II濃度 (AU/ml)	LCA#		Prothrombin LCA# Con A#		AFP濃度 7394比率 Con A# (ng/ml)		Transferrin LCA Con A P1 P2 P3 P4				α_1 -AT LCA#		
		0	3.5	0	0	320,000	11	8	24.0	0.0	15.0	85.0	0.0	21.0
1. JO	365.00	0	3.5	0	0	320,000	11	8	24.0	0.0	15.0	85.0	0.0	21.0
2. CA	61.00	0	0	0	0	13,500	50	21	15.6	13.5	23.3	58.7	5.5	18.4
3. NE	45.00	0	0	0	0	16,200	79	14	20.0	7.9	26.4	58.7	7.0	16.9
4. MW	15.84	0	9.5	0	0	770,000	95	0	10.2	8.5	33.3	58.1	0.0	19.5
5. TT	12.94	0	18.5	0	0	8,800	27	0	13.8	4.5	24.1	63.5	7.9	13.7
6. HM	10.00	0	4.5	0	0	18,400	67	27	8.2	13.8	28.1	53.8	4.3	34.9
7. TS	6.87	0	0	0	0	11,563	0	0	12.5	0.0	28.6	71.4	0.0	11.9
8. MO	3.60	0	0	0	0	539	72	0	4.6	7.4	28.4	60.6	3.0	20.7
9. KS	2.70	0	0	0	0	3,800	18	0	8.5	0.0	34.3	64.7	0.0	16.0
10. GK	0.38	0	0	0	0	338,300	58	0	14.0	6.3	24.9	63.7	6.1	27.4
11. CH	<0.06	0	0	0	0	832	87	0	23.0	0.0	26.7	73.3	0.0	12.0
Mean			3.3	0	0		51.3	10.3	15.9	5.2	26.6	64.7	3.1	19.3
SD			±5.9				±32.6	±12.0	±6.1	±5.2	±5.2	±8.9	±3.2	±6.9
			NS				(P<0.001)	NS	<0.01	NS	(P<0.05)	NS		(P<0.001)
CONTROL														
Mean		0	0	0	0		4.0	2.0	5.7	3.1	20.7	68.1		13.0
SD							±6.0	±4.0	2.3	±3.9	±4.5	±7.5		±5.0
n		4(W.)	4(W.)	5(LC)	5(LC)		7 (LC)	7(LC)	6(LC)	6(LC)	6(LC)	6(LC)		54(LC)

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

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 immunoaffinoelectrophoresis 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 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 PIVKA-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
