〔原 著〕

肝細胞癌の早期診断に対する血清 α フェトプロテイン- レクチン親和電気泳動分画と PIVKA-II の有用性

中田 直行*・戸沢 辰雄**

SUMMARY

Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) and microheterogeneity forms of α -fetoprotein (AFP): L3 and P4+5, in the sera from 30 patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and 40 patients with chronic liver diseases (CLD) having serum AFP concentrations 20-387 ng/ml, were determined by enzyme-immunoassay and lectin-affinity electrophoresis, respectively. PIVKA-II, AFP-L3 and AFP-P4+5 were detected in 63.3%, 40.0% and 46.7% of the patients with HCC, respectively, and in 2.5%, 0.0% and 0.0% of the patients with CLD, respectively. A combination of PIVKA-II and AFP-L3, PIVKA-II and AFP-P4+5 and these three markers raised the diagnostic rate of HCC to 66.7%, 66.7% and 73.3%, respectively. Therefore, a combined determination of PIVKA-II, AFP-P4+5 and AFP-L3 in the serum is useful for early detection of HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma, α -fetoprotein, lectin-affinity electrophoresis, protein induced by vitamin K absence or antagonist-II: PIVKA-II.

緒 言

血清 α -フェトプロテイン (AFP) が一元平板免疫拡散法で定量されていた時代, AFP の肝細胞癌 (HCC) に対する特異性はきわめて高かったが, その陽性率は 50~70% であった¹⁾. しかし, 1971 年に RIA 法による AFP の測定法が開発され²⁾, HCC の AFP 陽性率は 90% に向上したが, 慢性肝炎, 肝硬変をはじめとする多彩な病態のほか妊娠でも血中に AFP が検出され^{1,3)}, AFP の特異性は低下した. それゆえに, AFP の HCC に対する診断的有用性は適切なカットオフ値を設定する, ないしは, 測定値の推移を観察することにより保たれているが, HCC の高度危険群である慢性肝疾患 (CLD) に併

発してくる HCC の早期発見は容易でなく, HCC に診断的有用性がある他の指標が望まれている.

近年, protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II) がその指標として利用されている. PIVKA-II はビタミン K 欠乏状態で γ -carboxylation が障害されるために産生されるプロトロンビン前駆体 (すなわち異常プロトロンビン) である. これが HCC 患者の血中にも検出されることが報告された⁴⁾. HCC 患者血中に出現する PIVKA-II はプロトロンビン前駆体の産生亢進か原因と考えられ, ビタミン K 欠乏によるものではないとされている⁵⁾. CLD 患者血中の PIVKA-II 陽性率は低く⁶⁾, また, AFP 非産生 HCC 患者の約半数に PIVKA-II が検出され⁷⁾, PIVKA-II と

Evaluation of AFP-bands separated by lectin-affinity electrophoresis and PIVKA-II in early diagnosis of hepatocellular carcinoma.

* Naoyuki Nakata; 兵庫医科大学病院中央臨床検査部

** Tatsuo Tozawa; 同大学中央臨床検査部

Correspondence address: Naoyuki Nakata, Department of Clinical Laboratories, Hyogo College of Medicine, 1-1 Mukogawa-cho, Nisinomiya 663, Japan.

(受付 1993 年 12 月 29 日, 受理 1994 年 3 月 4 日)

AFP の組合せによる HCC 診断率の向上が認められている⁶⁻⁸⁾。

最近, CLD と HCC の鑑別法として, HCC で出現するある種のレクチンに対し親和性をもつ AFP をレクチン親和電気泳動法によって分析する方法が期待されている⁹⁻¹¹⁾。今回, CLD との鑑別が困難である血清 AFP レベル (<400 ng/ml)¹²⁾をもつ HCC 患者血清を対象にし, レクチン親和電気泳動法による AFP 分画の診断的有用性を, PIVKA-II との対比から検討した。

材料と方法

総 AFP 値が 20~387 ng/ml であった HCC 患者 30 例 (男 23 例: 52~77 歳, 女 7 例: 56~76 歳) の血清を用いた。症例の内訳は HCC に対して未治療であった患者が 9 例, transcatheter hepatic arterial embolization (TAE) 治療歴があり, 再発を確認した患者が 21 例であった。対照として, 総 AFP 値が 21~248 ng/ml であった CLD 患者 40 例 (男 24 例: 41~70 歳, 女 16 例: 51~78 歳) の血清を用いた。

総 AFP 値は化学発光酵素免疫測定自動分析機ルミノマスター (三共) にて, 同社の専用試薬; ルミノマスター「AFP」を用いて測定した。レクチン親和性 AFP の測定は AFP-レクチン分画キット L およびキット P (和光純薬) を用いた¹³⁾。本キットの操作手順を Table 1 に示した。PIVKA II は, エイテスト・モノ P-II (エーザイ) を用いて測定した。

統計学的な分析は, Spearman の順位相関係数を使って相関性を検定した。なお, PIVKA-II の測定下限値 (0.06 AU/ml) 以下の値は 0.0 AU/ml として統計処理

した。

成績

1. 総 AFP 値と PIVKA-II 値

HCC 患者群の総 AFP 値は 20~387 ng/ml で, PIVKA-II 値は 11 例が 0.06 以下, 29 例が 0.08~18.32 AU/ml であった。CLD 群の総 AFP 値は 21~248 ng/ml で, PIVKA-II 値は 37 例が 0.06 ng/ml 以下, 他 3 例のそれぞれが 0.07, 0.08, 0.11 ng/ml であった。

2. レクチン親和電気泳動パターン

レクチン親和電気泳動法により得られた AFP 分画は陽極側から順に, LCA-A に対しては L1, L2, L3, E-PHA に対しては P1, P2, P3, P4, P5 と Taketa らが提唱した方法¹⁴⁾に従って命名されている。検出パターンの一例を Fig. 1 に示した。L1 と P2 はほとんどの疾患に共通して検出される分画であるが, L3, P4 および P5 は主として癌患者で検出される。以後, L3, P4 と P5 を異常 AFP-band と総称する。

HCC 群の 30 例中, 異常 AFP-band が検出された例数とその値%は, L3 が 18 例 (4.6~88.0%), P4 が 21 例 (7.1~52.7%), P5 が 4 例 (2.5~17.7%) であった。なお, P5 が検出された全例に P4 が検出されたこと, および両者の分離が決してよくないことから P4 と P5 を一括した (21 例: 6.4~52.7%)。なお, L2 および P1, P3 を検出した例はなかった。

一方, 対照の CLD 群 40 例中の異常 AFP-band の検出例数とその値%は, L3 が 2 例 (8.4, 12.7%), P4 が 1 例 (10.2%) で, P5 は検出しなかった。

Table 1. Procedure for separation of AFP by lectin-affinity electrophoresis.

Operation	Conditions (per 1 gel or NC membrane)
Electrophoresis	Lectin agarose gel (LCA-A or PHA-E4)
	Serum specimen (20 to 200 ng/ml AFP), 4 μ l
	Below 15°C
	40 to 50 min (BPB migration of 4 cm $\pm$ 10%)
Antibody-affinity blotting	Constant voltage 200 V $\pm$ 10% (10 to 20 mA)
	Antibody coated NC membrane
	Weight, 250 to 300 g
Washing	Room temperature (15 to 30°C), 30 min
Immuno reaction I	Wash buffer, room temperature, 10 min, 2 times
Washing	Anti-AFP antibody solution, 4 ml, 37°C, 30 min
Immuno reaction II	Wash buffer, room temperature, 10 min, 2 times
Washing	Enzyme labeled antibody solution, 4 ml, 37°C, 30 min
Coloring reaction	Wash buffer, room temperature, 10 min, 2 times
	Enzyme substrate solution, 10 ml
	Room temperature (15 to 30°C), 30 min

Fig. 1. Representative patterns of serum AFP-bands separated by Lectin-affinity electrophoresis.
LCA-A: *Lens culinaris* agglutinin A, PHA-E₄: erythroagglutinating phytohemagglutinin.

3. PIVKA-II と L3, P4+5 の診断的有用性

HCC 群と CLD 群の成績を用いた Response (Receiver) Operating Characteristic Curve (ROC) 分析で PIVKA-II, L3 および P4+5 の診断的有用性を比較した (Fig. 2). 診断的有用性は P4+5 が最も高く, L3 が最も低かった.

また, PIVKA-II, L3, P4+5 のそれぞれ単独と, PIVKA-II と L3, PIVKA-II と P4+5, および PIVKA-II と L3 と P4+5 の組合せによる HCC 群での陽性率 (カットオフ値は PIVKA-II: 0.10 AU/ml^{6,7}, L3 と P4+5: 15.0%¹¹) を Table 2 に示した. この結果, 単独で最も陽性率が高かった PIVKA-II (56.6%) と,

Fig. 2. ROC curves for prediction of HCC by PIVKA-II, L3 and P4+5.

単独では 50% に満たなかった L3 ならびに P4+5 の 3 者を組合せることにより陽性率は向上した (73.3%). なお, CLD 群には L3 あるいは P4+5 の値がカットオフ値を超えた例はなく, 3 者を組合せても特異度に変化はなかった.

4. HCC 群における総 AFP 値, L3, P4+5 および PIVKA-II 間の相関関係

総 AFP (ng/ml) と L3 (%) 間, L3 と P4+5 (%) 間,

Table 2. Positive rates(%) of cases for PIVKA-II, L3, P4+5 and combinations of two or these three markers.

	Positive (%) ^a
PIVKA-II ^b	17 (56.7)
L3 ^c	12 (40.0)
P4+5 ^c	14 (46.7)
PIVKA-II or L3	20 (66.7)
PIVKA-II or P4+5	20 (66.7)
PIVKA-II, P4+5 or L3	22 (73.3)

^a Total numbers of cases tested=30

^b The cut-off value of PIVKA-II=0.10 ng/ml

^c The cut-off value of L3, P4+5=15.0%

Table 3. Correlation among total-AFP (ng/ml), PIVKA-II (AU/ml), L3 (%) and P4+5 (%).

		r _s [*]	p-value
AFP	vs PIVKA-II	0.267	n.s.
	L3	0.443	<0.05
	P4+5	0.226	n.s.
PIVKA-II	vs L3	0.371	<0.05
	P4+5	0.388	<0.05
L3	vs P4+5	0.494	<0.01

^{*} Spearman's rank correlation coefficient.

PIVKA-II (AU/ml) と L3 間, および PIVKA-II と P4+5 間には弱い相関があった. 総 AFP と PIVKA-II 間, および総 AFP と P4+5 間には相関はなかった (Table 3).

考 察

AFP は過半数の CLD 患者血清中に正常参考域上限値を超えるレベルで検出されるが, 常時 400 ng/ml を超えることはまれである. しかし, 持続して 101 ng/ml 以上の血清 AFP レベルをもつ CLD 例は HCC 発生の危険性が高い¹²⁾. したがって, 血中 AFP 値が 100 ng/ml 付近の CLD 例および HCC 例に対する診断効率の高い HCC の指標が望まれる. 今日, PIVKA-II がその指標として用いられているが, HCC の PIVKA-II 陽性率は 50~60% でしかない⁵⁻⁸⁾. 本研究でも 56.7% であった. それゆえに, 別の指標として総 AFP 値が約 20 ng/ml 以上でなければ検出できない欠点はあるが, 異常 AFP-band (L3, P4+5) の有用性が期待される.

実際に本研究では, HCC 群における PIVKA-II 陰性の 13 例中, L3 のみの陽性例が 2 例, P4+5 のみの陽性例が 2 例, L3, P4+5 とともに陽性例が 1 例で, 合計 5 例が異常 AFP-band 陽性であった. 一方, CLD 群 40 例中に, 1 例の PIVKA-II 陽性例 (PIVKA-II : 0.11 AU/ml) があったが, 異常 AFP-band は検出しなかった. 残りの 39 例の PIVKA-II 陰性例中には, 異常 AFP-band を 3 例 (L3 : 2 例, P4+5 : 1 例) 検出したが, その値はすべてカットオフ値以下であった.

そして, HCC 群における陽性率は, PIVKA-II が 56.7%, L3 が 40.0%, P4+5 が 46.7% であったが, PIVKA-II と L3, PIVKA-II と P4+5 および PIVKA-II と L3 と P4+5 の組合せにより, 陽性率は 66.7, 66.7, 73.3% に向上した.

診断効率向上のためには, 相互に相関がない指標の組合せが有効である. したがって, 相関のない総 AFP と PIVKA-II の組合せは有効であり, 今日広く利用されている. しかし, 総 AFP が 400 ng/ml 以下の HCC 中の PIVKA-II 陽性率: 本研究では 56.7, 57⁴⁾, 44.4⁶⁾, 45%⁸⁾ は決して満足できるものでない. この AFP レベルでは, 弱い相関が PIVKA-II との間にあったが, L3 と P4+5 を PIVKA-II に加えた 3 者の組合せにより高い診断効率を得られることを本研究は示した. つまり, AFP-レクチン親和電気泳動分析は HCC の早期診断に有効な手段として期待される.

文 献

- 1) Abelve GI. Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res* 1971; 14: 295-358.
- 2) 石井 勝, 池原英夫, 戸沢辰雄, 井上英士, 新光毅. α -fetoprotein の radio-immunoassay とその臨床的意義. 医学のあゆみ 1971; 79: 77-9.
- 3) 戸沢辰雄. α -Fetoprotein の臨床的研究, とくに single radial immunodiffusion 法および radio-immunoassay 法による血中 AFP レベルとその動態における意義について. 肝臓 1973; 14: 302-14.
- 4) Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, Coleman MS, Furie B. Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1984; 310: 1427-31.
- 5) 左近賢人, 門田守人, 後藤満一, 小林研二, 森武貞. 原発性肝癌症例における PIVKA-II 測定 of 臨床的意義. 日臨外会誌 1989; 50: 278-83.
- 6) 藤山重俊, 森下愛文, 伊津野清徳, 佐藤辰男. 肝細胞癌と PIVKA. 肝胆脾 1989; 18: 599-608.
- 7) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 橋本悦子, 古川みどり, 小幡 裕. 肝細胞癌と異常プロトロンビン. 肝胆脾 1987; 14: 759-66.
- 8) 松木康彦, 三田村圭二, 山口高史, 田中直見, 相川達也, 高橋 陽, 矢倉道泰, 原田英治, 大林明, 大菅俊明. 肝細胞癌における異常プロトロンビン (PIVKA-II) とその変動—モノクローナル抗体を用いた ELISA による測定—. 肝臓 1987; 28: 1073-8.
- 9) 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 1981; 22: 1559-68.
- 10) Taketa K, Ichikawa E, Nakabayashi H, Sato J, Kato K, Akai S, Ohkawa R, Ohkawa K, Taga H, Hirai H. Further resolution of human α -fetoprotein by affinity electrophoresis with erythro agglutinating phyto-hemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* lectin. *Tumor Biol* 1985; 6: 519-31.
- 11) Taketa K, Sekiya C, Namiki M, Akamatsu K, Ohta Y, Endo Y, Kosaka K. Lectin-reactive profiles of α -fetoprotein characterizing hepatocellular carcinoma and related conditions. *Gastroenterology* 1990; 99: 508-18.
- 12) 遠藤康夫. α -フェトプロテイン測定の診断への応用の現状. 生物物理化学 1981; 25: 105-9.
- 13) Taketa K, Ichikawa E, Hanada T. A tetrazolium method for staining peroxidase labels in blotting assays. *J Immunol Methods* 1986; 95: 71-7.
- 14) Taketa K, Ichikawa E, Umetsu K, Suzuki T.

Allomyrina dichotoma lectin nonreactive α -fetoprotein in hepatocellular carcinoma and other tumors: Comparison with *Ricinus communis* agglutinin-I. Cancer Lett 1986; 31: 325-31.

要 旨

HCC と CLD の鑑別困難な血清 AFP レベル (<400 ng/ml) をもつ、HCC 患者 30 例と CLD 患者 40 例の血清 PIVKA-II と血清 AFP のレクチン親和性 AFP-band (L3, P4+5) を測定し、それらの HCC の指標としての有用性を比較検討した。

ROC 分析から得た診断的有用性は P4+5 が最も高

く、L3 が最も低かった。HCC 群での陽性率 (カットオフ値は PIVKA-II が 0.10 AU/ml, AFP-band が 15 %) は、PIVKA-II が 56.7%, L3 が 40.0%, P4+5 が 46.7% であった。一方、CLD 群では PIVKA-II 陽性が 1 例あったが、L3 および P4+5 陽性例はなかった。また、HCC 群において PIVKA-II と L3, PIVKA-II と P4+5, あるいは PIVKA-II と L3 と P4+5 を組合せることにより、診断率はそれぞれ 66.7, 66.7, 73.3 % に向上した。結論として、PIVKA-II と AFP-band の組合せ (コンビネーションアッセイ) は、HCC の早期診断に有効な手段として期待できる。