

論文題目

肝切除を施行した肝細胞癌患者における alpha-fetoprotein (AFP) と  
protein induced by vitamin K deficiency or antagonist-II (PIVKA-II) の  
重要性における検討

所属

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻博士課程

山元謙太郎

## 目次

第一章 緒言	3
第二章 方法	5
第一節 対象	5
第二節 AFP・PIVKA-II の測定法	7
第三節 評価事項	7
第一項 HCC に対する AFP および PIVKA-II の感度・特異度	7
第二項 HCC の治療効果判定における AFP 値および PIVKA-II 値の扱い	7
第三項 HCC の腫瘍マーカーとしての AFP および PIVKA-II の相補性	8
第四項 病理組織学的因子の代替因子としての AFP および PIVKA-II の役割	8
第五項 再発形式の予想指標としての AFP 値および PIVKA-II 値	8
第六項 AFP 値および PIVKA-II 値から検討した初回切除時と再発時の HCC の病因的 関連	9
第四節 統計解析	9
第三章 結果	10
第一項 HCC に対する AFP および PIVKA-II の感度・特異度	10
第二項 HCC の治療効果判定における AFP 値および PIVKA-II 値のあつかい	12
第三項 HCC の腫瘍マーカーとしての AFP および PIVKA-II の相補性	13
第四項 病理組織学的因子の代替因子としての AFP および PIVKA-II の役割	14
第五項 再発形式の予測指標としての AFP 値および PIVKA-II 値	17
第六項 AFP 値および PIVKA-II 値から検討した初回切除時と再発時の HCC の病因的 関連	19
第四章 考案	22

第五章 結語	27
第六章 参考文献	28
謝辞	33

## 第一章 緒言

肝細胞癌（hepatocellular carcinoma、以下 HCC）の診療において、早期に癌を診断することは効果的な治療を行う上で重要である[1]。血清 alpha-fetoprotein（以下 AFP）は HCC に対する生物学的腫瘍マーカーとして長年使われてきたが感度・特異度が低く、スクリーニング検査に用いるには理想的なマーカーとは言い難かった[2-5]。1984 年、Liebman らは HCC 患者で血漿 protein induced by vitamin K deficiency or antagonist-II（以下 PIVKA-II、別名 des-γ-carboxy prothrombin: DCP）値が上昇することを報告した[6]。それ以降 PIVKA-II の重要性を検討するさまざまな研究がなされ、本邦では 1990 年代初期から HCC の日常的な診療検査項目として導入されてきた[7-9]。さらに 1997 年からは従来の酵素免疫測定法（enzyme immunoassay、以下 EIA）の 10 倍の感度をもつ電気化学発光免疫測定法（electro-chemiluminescence immunoassay、以下 ECLIA）を用いた高感度 PIVKA-II 測定キットが開発されて使用されるようになった[10]。HCC の診療において、AFP と PIVKA-II は独立した腫瘍マーカーであるという見解は一致していたが[8,11-17]、一つの腫瘍マーカーとして比べた際に PIVKA-II と AFP のどちらがより優れたマーカーであるかについては意見の統一はない[12,16-22]。

スクリーニングに続く腫瘍マーカーの二つ目の役割として、治療に対する反応のモニタリングがある。すなわち治療前にその値が陽性である一方、効果的な治療後に値が正常域に下がることが理想的な腫瘍マーカーの条件である。経カテーテル的動脈化学塞栓療法（transcatheter arterial chemo-embolization、以下 TACE）等、効果的な治療が行われた場合でもその結果が壊死や線維化として得られるような場合には、画像所見は必ずしも生物学的寛解の度合いを表すわけではないので、腫瘍マーカーの動向により治療効果を判定することは重要となる[23]。治療に対する反応性に関しては、今まで AFP と PIVKA-II の比較はなされたことはなかった。

腫瘍マーカーの三つ目の役割として、予後因子として同定されている特定の病理組織学因子の代替マーカーとしての働きが挙げられる [14,21,22,24-26]。これまで血漿 PIVKA-II 値の上昇は門脈腫瘍栓の存在を示唆し[14,21,22,24,27]、血清 AFP 値の上昇は低分化 HCC の存在を意味していると報告されてきたが[24,28]、これらの仮説を切除標本を用いて包括的にかつ大規模コホートで検証した報告はない。

最後に腫瘍マーカーの四つ目の用途として再発形式の推測および再発予知がある。HCC 術後の再発には異時多中心再発と転移によるものの二つが寄与していると考えられているが、再発形式が転移である場合には、理論上は、HCC の初回治療時に AFP 値もしくは PIVKA-II 値が高ければ再発時のこれらのマーカー値も高いことが想定される。しかしこの仮説を検証した報告はない。

本研究では、HCC の腫瘍マーカーである AFP と PIVKA-II についてこれまで検証されていなかった上記の事柄に注目して、その臨床的重要性について包括的に検討した。

## 第二章 方法

### 第一節 対象

1998 年 1 月から 2006 年 12 月までに東京大学医学部附属病院肝胆膵・人工臓器移植外科で HCC に対して根治的肝切除を行った 714 例を対象とした。すべての症例で HCC の確定診断は切除標本の病理組織診によって行った。なお、今回の検討においては全症例で術前に包括同意を得ている。

対象の背景を表 1 に示す。退院後 1 年間は、外来で毎月の腫瘍マーカー（AFP・PIVKA-II）測定、腹部超音波検査、そして 4 ヶ月毎の腹部造影 CT により経過観察を行った。術後 1 年以降は隔月で腫瘍マーカーの測定と腹部超音波検査を行い、半年毎の腹部造影 CT により再発の有無を確認した。二つ以上の画像診断法で典型的な HCC 所見が得られた場合に HCC の再発確定とした[29]。

表 1 肝切除を受けた肝細胞癌患者 714 人の背景

変数	n = 714
性別	
男性	556 (77.9%)
女性	158 (22.1%)
年齢 (歳) *	67 (19-90)
HBs-Ag <sup>†</sup>	
無し	560 (78.4%)
有り	154 (21.6%)
HCV-Ab <sup>†</sup>	
無し	250 (35.0%)
有り	464 (65.0%)
Child-Turcotte-Pugh grade <sup>‡</sup>	
A	601 (84.2%)
B	113 (15.8%)
背景肝 <sup>§</sup>	
正常肝	14 (2.0%)
慢性肝炎	295 (41.3%)
肝硬変	405 (56.7%)
切除術式 <sup>□</sup>	
解剖学的肝切除	281 (39.4%)
区域切除以上	90 (12.6%)
亜区域切除	191 (26.8%)
非解剖学的肝切除	433 (60.6%)
部分切除	398 (55.7%)
核出	35 (4.9%)

\*中央値 (範囲幅) を示す。

<sup>†</sup>5 例で HBs-Ag、HCV-Ab とともに陽性であった。

101 例で HBs-Ag、HCV-Ab とともに陰性であった。

<sup>‡</sup>Child-Turcotte-Pugh grade C の患者は含まれていなかった。

<sup>§</sup>切除標本における非腫瘍部分を病理組織学的に検討した。

<sup>□</sup> 肝区域の分類は Healey & Schroy の分類に従い、亜区域切除は Makuuchi らの術式に従った。

## 第二節 AFP・PIVKA-II の測定法

術前 1 週間以内に腫瘍マーカーを測定し、その値を術前のマーカー値として採用した。

術前 TACE が行われた症例では TACE 前の値を術前値とした。血清 AFP 値は市販の測定キット（ST E テスト「TOSOH」II（AFP）免疫反応試薬、東ソー株式会社）で測定した。血漿 PIVKA-II 値は ECLIA 法を用いた市販の高感度 PIVKA-II 測定キット（ピコルミ PIVKA-II、エーザイ株式会社）を用いて測定した [10]。

## 第三節 評価事項

### ・第一項 HCC に対する AFP および PIVKA-II の感度・特異度

術後半年の時点で、714 例中 25 例が経過観察から脱落し、190 例に再発を認め、9 例は経過観察期間が半年以内であったがその時点では無再発生存であり、残り 490 例はこの時点で無再発生存していた。肝切除前の AFP 値 および PIVKA-II 値を HCC を有する症例のマーカー値（全 714 例）と定義し、術後半年以内に再発を認めない 490 例の術後半年での AFP 値および PIVKA-II 値を HCC を有しない症例のマーカー値と定義した。これらの値を用いて、receiver operating characteristic（以下 ROC）曲線を作成した。AFP および PIVKA-II の診断能は ROC 曲線の下部面積（area under the receiver operating characteristic curve、以下 AUROC）を比較して検討した。本研究における AFP のカットオフ値は 20 ng/ml を、PIVKA-II のカットオフ値は 40 mAU/ml を採用した。これらのカットオフ値は日常の臨床業務において従来使われてきたカットオフ値であり、過去の研究報告でも採用されてきた値である [30]。

### ・第二項 HCC の治療効果判定における AFP 値および PIVKA-II 値の役割

上記 490 例は、肝切除後半年の時点で、腫瘍の完全寛解が得られている状態であると考えられた。前項で採用したカットオフ値を用い各々の症例でマーカー値の陽性・陰性を判

定した。そしてこれらの 490 例における術前から術後半年にかけての腫瘍マーカー値陰陽性の推移が治療効果を正確に反映しているか否かを検証した。

- ・第三項 HCC の腫瘍マーカーとしての AFP および PIVKA-II の相補性

HCC714 例全てにおいて術前の AFP 値および PIVKA-II 値の関連を検証した。次にそれらの値を前項で定義したカットオフ値を用いてそれぞれ陽性・陰性に判別し、4 つの群に分類した。

- ・第四項 病理組織学的因子の代替因子としての AFP および PIVKA-II の役割

HCC714 例において予後因子として報告されてきた病理組織学的因子と術前 AFP 値および PIVKA-II 値との関連を検証した。検討した病理組織学的因子を表 4 に示す。さらにこれらの病理組織学的因子とそれぞれのマーカー値との関連をより包括的に検討するために、腫瘍マーカー値を被説明変数とした線形多変量解析をおこない、各病理組織学的因子とマーカー値上昇との独立した関連を調べた（表 5）。これら全ての因子は手術で切除された組織標本を用いて検討した。脈管侵襲の有無は門脈侵襲、静脈侵襲もしくは胆管侵襲のいずれかの存在で有りとして定義した。多中心性発生と肝内転移の区別は日本肝癌研究会の原発性肝癌取扱規約に沿って行った [31]。

- ・第五項 再発形式の予想指標としての AFP 値および PIVKA-II 値

データ収集の時点で 444 例に再発を認めた。われわれはこれら再発症例を術後半年以内の再発 190 例とそれ以降の再発である 254 例の 2 群に分けて以下の項目を検討した。まず術前および再発時の AFP 値および PIVKA-II 値をこれら 2 群間で比較した。そしてこの 2 群をさらに肝内もしくは肝外の再発部位別に区別し、術前のマーカー値と再発部位の関連について検討した。

・第六項 AFP 値および PIVKA-II 値から検討した初回切除時と再発時の HCC の病因的関連

上記の再発を認めた 444 例で術前の腫瘍マーカー値と再発時の腫瘍マーカー値との関連を検討した。これら 444 例を、術後半年以内再発の 190 例、術後 7～12 カ月で再発を認めた 70 例、13 から 24 カ月で再発を認めた 70 例、術後 2 年以降に再発を認めた 114 例の 4 群に分類した。そして、それぞれの群における術前の腫瘍マーカー値と再発時の腫瘍マーカー値の相関をもとめ、これらの相関の再発時期別の推移を検討した。

#### 第四節 統計解析

腫瘍マーカー値は中央値と 4 分位範囲 (median [inter-quartile range]) で表記した。腫瘍マーカーの AUROC は Wilcoxon の順位和検定で比較した [32]。マーカー値同士の関連は Spearman の順位検定 ( $r_s$ ) で検討した。2 項目からなる因子を比較する場合は Fisher の直接確率検定を用いた。マーカー値と病理組織因子の関連は Wilcoxon の順位和検定か Kruskal-Wallis 検定で適宜検討した。 $P$  値は 0.05 未満である場合に統計的に有意な差があると判断した。全ての統計解析は GraphPad Prism 5 (GraphPad Software 社、San Diego、California、USA) を用いて解析した。

### 第三章 結果

#### ・第一項 HCC に対する AFP および PIVKA-II の感度・特異度

714 例の術前の AFP 値および PIVKA-II 値はそれぞれ 22.0 (7.0-195.0) ng/ml 、55.0 (20.0-443.0) mAU/ml であった。術後半年の時点で再発を認めない 490 例の術後半年の AFP 値および PIVKA-II 値はそれぞれ 5.0 (3.0-9.0) ng/ml と 11.0 (10.0-15.0) mAU/ml であった。それぞれのマーカーの感度・特異度は ROC 曲線を作成して検討した (図 1)。AFP および PIVKA-II の AUROC (95% C.I.) はそれぞれ 0.79 (0.76-0.81) および 0.91 (0.89-0.92) であった ( $P < 0.001$ )。過去の報告で推奨されている腫瘍マーカーのカットオフ値である AFP の 20 ng/ml および PIVKA-II の 40 mAU/ml を含めて数種類のカットオフ値で感度・特異度を計算した (表 2)。

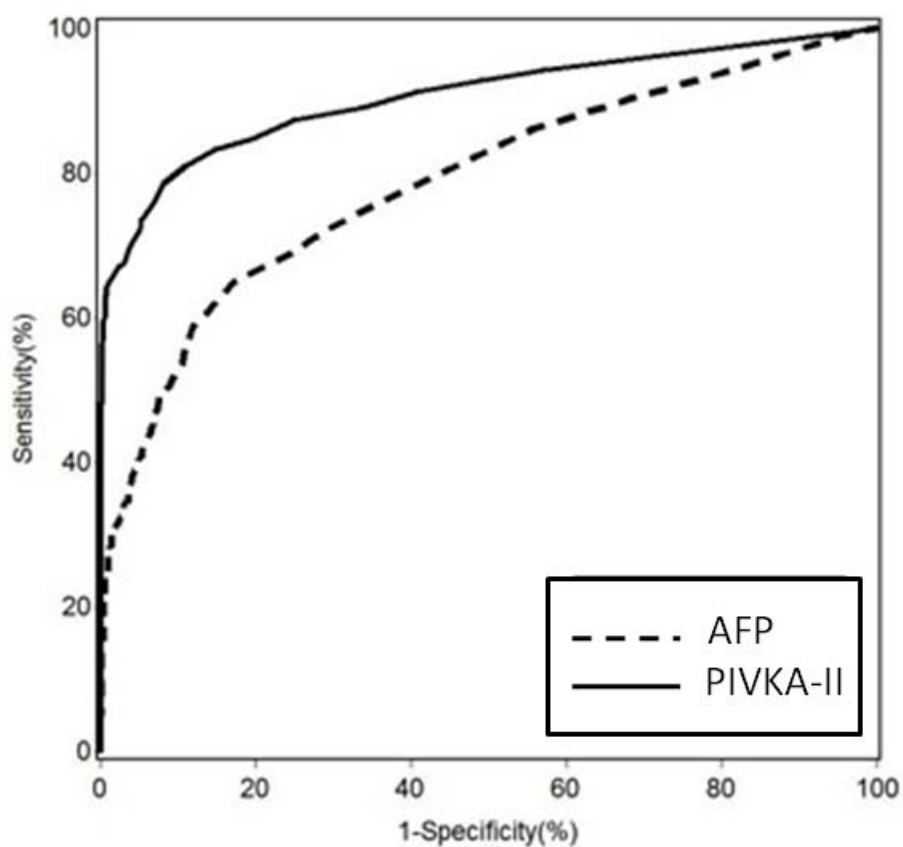


図1 AFP、PIVKA-IIのROC曲線。AFP、PIVKA-IIのAUROC(95% C.I.)はそれぞれ0.79(0.76-0.81)、0.91(0.89-0.92)であった( $P < 0.001$ )。

表2 AFPとPIVKA-IIのカットオフ値ごとの感度・特異度

AFP (ng/ml)	11	13	20	100	200
感度 (%)	64.9	60.8	51.3	30.4	24.7
特異度 (%)	82.9	86.1	90.8	98.6	99

PIVKA-II (mAU/ml)	20	30	40	100	125
感度 (%)	73.4	62.8	55.9	41.9	39.1
特異度 (%)	94.7	99.4	99.8	100	100

本研究ではカットオフ値としてAFP:20 ng/ml、PIVKA-II:40 mAU/mlを採用した。

・第二項 HCC の治療効果判定における AFP 値および PIVKA-II 値の役割

術後半年の時点で無再発生存である 490 例において、カットオフ値を AFP は 20 ng/ml、PIVKA-II では 40 mAU/ml と設定した場合、術前マーカー値陽性と判定された症例は AFP : 229/490 例 (46.7%)、PIVKA-II : 246/490 例 (50.2%) であった。これら術前マーカー値陽性症例のうち、腫瘍の完全寛解が得られていたと考えられる術後半年の時点でマーカー値が陰性化していた症例は AFP : 184/229 例 (80.3%) および PIVKA-II : 245/246 例 (99.6%) であった ( $P < 0.0001$ ) (表 3)。術後半年で再発を認めない AFP 値術後陽性例 45 例をさらに術後 12 ヶ月まで経過観察すると、このうち 33 例は無再発のままであったが、12 例に再発を認めた。この 12 例の再発症例について経過中の AFP 値の推移を詳細に検討すると、術後半年時点での AFP 値陽性は 6/12 例の患者では再発を示唆するものではなかった。術後半年の時点で PIVKA-II 値が陽性であった 1 症例は術後 5 年経過したが再発を認めていない。術前に AFP 値陰性であった 261/490 例 (53.3%) および PIVKA-II 値陰性であった 244/490 例 (49.8%) とともに術後半年の時点では陰性のままであった (表 3)。

表 3 術後半年以内無再発患者 490 人における術前後のマーカーの状態

AFP			
術前の状態		術後の状態	
陰性	261/490 (53.3%)	陰性	261/261(100.0%)
		陽性	0/261 (0.0%)
陽性	229/490 (46.7%)	陰性	184/229(80.3%)
		陽性	45/229 (19.7%)
PIVKA-II			
術前の状態		術後の状態	
陰性	244/490 (49.8%)	陰性	244/244 (100.0%)
		陽性	0/244 (0.0%)
陽性	246/490 (50.2%)	陰性	245/246 (99.6%)
		陽性	1/246 (0.4%)

AFP:20 ng/ml、PIVKA-II:40 mAU/ml をカットオフ値として設定した。

・第三項 HCC の腫瘍マーカーとしての AFP および PIVKA-II の相補性

714 例における術前 AFP 値と術前 PIVKA-II 値は図 2 に示す通り、相関は認められなかった ( $r_s = 0.23$ )。図 2 では更に前項で設定したカットオフ値を用いて 714 例を 4 群に分類した。つまり AFP・PIVKA-II とも陽性群の 229/714 例 (32.1%)、AFP 陽性で PIVKA-II 陰性の群の 137/714 例 (19.2%)、AFP 陰性で PIVKA-II 陽性の 170/714 例 (23.8%)、AFP・PIVKA-II とも陰性の 178/714 例 (24.9%) である。すなわち 307/714 例 (43.0%) はこれらマーカーのうち片方のみが陽性の症例であった。

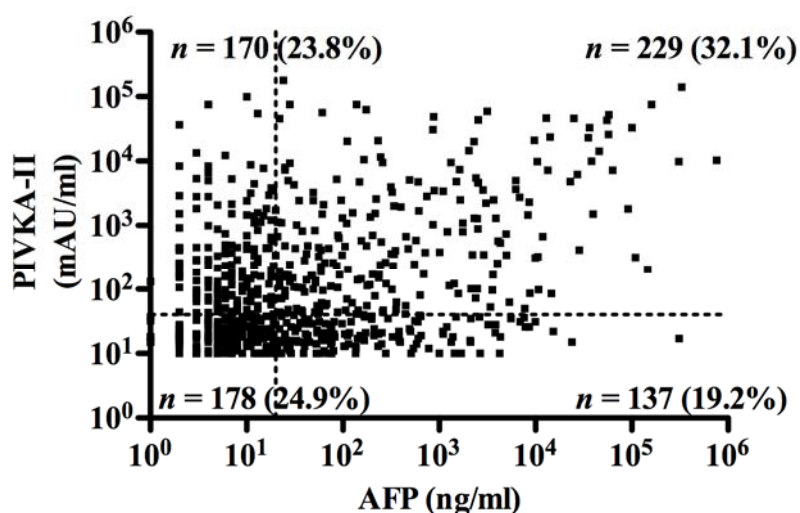


図 2 肝切除を受けた 714 例の術前の AFP 値と PIVKA-II の関係。両マーカーに関連は認められなかった ( $r_s = 0.23$ ,  $P < 0.0001$ )。点線はそれぞれのマーカーにおけるカットオフ値を示す (AFP : 20 ng/ml、PIVKA-II : 40 mAU/ml)。714 例をそれぞれのマーカーの陽性・陰性で 4 群に分類した。それぞれのカテゴリー毎の人数を図に示す。

・第四項 病理組織学的因子の代替因子としての AFP および PIVKA-II の役割

表 4 に AFP 値・PIVKA-II 値と病理組織学所見との関連を示した。腫瘍径の増大に伴い PIVKA-II 値は上昇する傾向にあったが ( $rs = 0.51$ )、AFP 値においては同様の傾向は認めなかった ( $rs = 0.19$ )。AFP 値は腫瘍数の増加に伴って上昇する傾向にあったが ( $P = 0.07$ )、PIVKA-II 値と腫瘍数には関連は認めなかった ( $P = 0.73$ )。AFP 値および PIVKA-II 値は腫瘍の進展を示す指標である脈管侵襲や肝内転移を有する症例で上昇していたが、その程度は同等でありいずれかのマーカー値のみが特異的に上昇している結果ではなかった。同様に腫瘍細胞の分化度が低分化になるほど両腫瘍マーカー値が上昇していたがその上昇も非特異的なものであった。

表 5 に、AFP 値および PIVKA-II 値を被説明変数としてマーカー値および病理組織学的因子との関連を検討した多変量解析の結果を示す。AFP 値上昇と独立して強い関連を示した病理組織学的因子は腫瘍の分化度、腫瘍径、脈管浸襲であり、PIVKA-II 値上昇と強い関連を示した因子は腫瘍径および脈管浸襲であった。

表 4 腫瘍関連因子と腫瘍マーカー値（単変量解析）

変数	n = 714	AFP (ng/ml) *	PIVKA-II (mAU/ml) *
腫瘍径 (mm)			
≤20	223 (31.2%)	18.0 (7.0-69.0)	24.0 (16.0-61.0)
20-50	335 (46.9%)	22.0 (7.0-144.0)	57.0 (21.0-328.0)
>50	156 (21.9%)	57.0 (8.5-3007)	1251.0 (118.5-7486.0)
		$r_s = 0.19$	$r_s = 0.51$
腫瘍数			
1	483 (67.7%)	19.0 (1.0-216.0)	55.0 (20.0-456.0)
2	138 (19.3%)	26.0 (8.0-177.5)	53.0 (19.50-254.0)
≥3	93 (13.0%)	49.0 (13.5-162.5)	59.0 (19.5-329.5)
		$P = 0.07$	$P = 0.73$
被膜形成			
無し	169 (23.7%)	25.0 (8.0-148.0)	32.0 (18.0-163.0)
有り	545 (76.3%)	21.0 (7.0-207.5)	72.0 (21.0-489.5)
		$P = 0.83$	$P < 0.05$
被膜浸潤†			
無し	137 (25.1%)	14.0 (6.0-78.5)	64.0 (10.0-364.0)
有り	408 (74.9%)	27.0 (7.0-278.0)	83.5 (21.5-579.5)
		$P < 0.01$	$P = 0.21$
脈管浸襲‡			
無し	495 (69.3%)	17.0 (7.0-76.0)	38.0 (18.0-189.0)
有り	219 (30.7%)	88.0 (12.0-1271.0)	233.0 (31.0-2110.0)
		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$
肝内転移			
無し	601 (84.2%)	19.0 (7.0-137.0)	44.0 (10.0-310.5)
有り	113 (15.8%)	81.0 (9.5-1261.0)	235.0 (40.0-2544.0)
		$P < 0.001$	$P < 0.0001$
腫瘍細胞の分化度			
高分化	104 (14.5%)	12.5 (6.0-31.0)	29.0 (17.0-87.5)
中分化	511 (71.6%)	20.0 (1.0-174.0)	63.0 (10.0-441.0)
低分化	99 (13.9%)	165.0 (25.0-2326.0)	145.0 (26.0-2455.0)
		$P < 0.0001$	$P < 0.0001$

\*中央値（四分位幅）

†被膜形成を認めた 545/714 例で検討した。

‡45/219 (20.5%)で肉眼的脈管浸襲を認め、174/219 (79.5%)で顕微鏡的脈管浸襲を認めた。

表 5 腫瘍関連因子と腫瘍マーカー値（多変量解析）

AFP			
変数	推定値	F 値	<i>P</i> 値
腫瘍細胞の分化度	0.4083	28.37	<0.0001
腫瘍径	0.0075	23.71	<0.0001
脈管浸襲	0.4000	19.67	<0.0001
肝内転移	0.2104	3.60	0.0582
被膜浸潤	-0.0514	1.17	0.28
腫瘍数	0.0188	0.43	0.51
PIVKA-II			
変数	推定値	F 値	<i>P</i> 値
腫瘍径	0.0186	250.84	<0.0001
脈管浸襲	0.2351	11.81	0.0006
被膜浸潤	0.0586	2.65	0.104
肝内転移	0.1286	2.34	0.127
腫瘍細胞の分化度	0.0752	1.67	0.196
腫瘍数	0.0012	0.00	0.96

・第五項 再発形式の予測指標としての AFP 値および PIVKA-II 値

表 6 は術後半年以内に再発を認めた 190 例と、再発を認めたもののそれが術後半年以降であった 254 例における術前 AFP および PIVKA-II の値と、これらの症例での再発時における AFP および PIVKA-II の値を示したものである。術後半年以内に再発を認めた群の術前 AFP および PIVKA-II の値は再発が術後半年以降であった群のそれらよりも有意に高かった。同様に再発時の AFP および PIVKA-II の値も術後半年以内の再発群で有意に高かった。

術後半年以内に再発を認めた 190 例において、32/190 例（16.8%）に肝外再発を認めた。肝外再発の内訳は、肺転移が 18/32 例（56%）、リンパ節転移が 6/32 例（19%）、骨転移が 4/32 例（13%）、腹膜転移が 2/32 例（6%）、副腎転移が 1/32 例（3%）であった。一方で、再発が術後半年以降であった 254 例における肝外転移の割合は 3/254 例（1.2 %）であり、術後半年以降の肝外転移は稀であった。

次に半年以内に再発を認めた 190 例を、その再発形式により肝内再発であった 158 例と肝外再発であった 32 例の 2 群に分類し、術前の AFP および PIVKA-II の値をこれらの群間で比較した（表 7）。肝外再発を認めた群の術前腫瘍マーカー値の方が肝内再発を認めた群の術前腫瘍マーカー値より高かった。

表 6 術後半年以内に再発を認めた 190 例と術後半年以降に再発を認めた 254 例における  
術前および再発時の AFP 値と PIVKA-II 値

	術前値		再発時の値	
	半年以内再発群	半年以降再発群	半年以内再発群	半年以降再発群
AFP (ng/ml)	54.0 (9.0-624.5) *	18.5 (7.0-76.0)	17.5 (6.0-163.5) *	13.0 (6.0-43.0)
PIVKA-II (mAU/ml)	237.5 (22.8-2553.0) †	37.5 (19.0-142.0)	25.0 (14.0-131.0) ‡	18.0 (13.0-34.3)

マーカー値は中央値（四分位範囲）で表記した。

\* $P < 0.0001$ （半年以降再発群と比較）。

† $P < 0.005$ （半年以降再発群と比較）。

‡ $P < 0.0005$ （半年以降再発群と比較）。

表 7 術後半年以内に再発した群で肝内再発を認めた 158 例と肝外再発を認めた 32 例の術  
前の AFP 値、PIVKA-II 値

	肝内再発群	肝外再発群
AFP (ng/ml)	50.0 (9.0-337.8) *	255.0 (10.8-9636.0)
PIVKA-II (mAU/ml)	188 (22.8-184.0) †	543.0 (34.3-10179.0)

マーカー値は中央値（四分位範囲）で表記した。

\* $P < 0.05$ （肝外再発と比較）。

† $P = 0.08$ （肝外再発と比較）。

・第六項 AFP 値および PIVKA-II 値から検討した初回切除時と再発時の HCC の病因的関連

術前および再発時における AFP 値と PIVKA-II 値を再発時期別にプロットした(図 3 A-D、図 4 A-D)。術後半年以内に再発した群の再発時の AFP 値は術前の AFP 値と強い相関を示した ( $r_s = 0.78$ 、図 3A)。この相関は再発時期が晩期になるにしたがって弱くなっていった(図 3B-D)。PIVKA-II についても同様の傾向が認められたが、その相関の強さは AFP に比べるとどの時期においても弱かった(図 4A-D)。

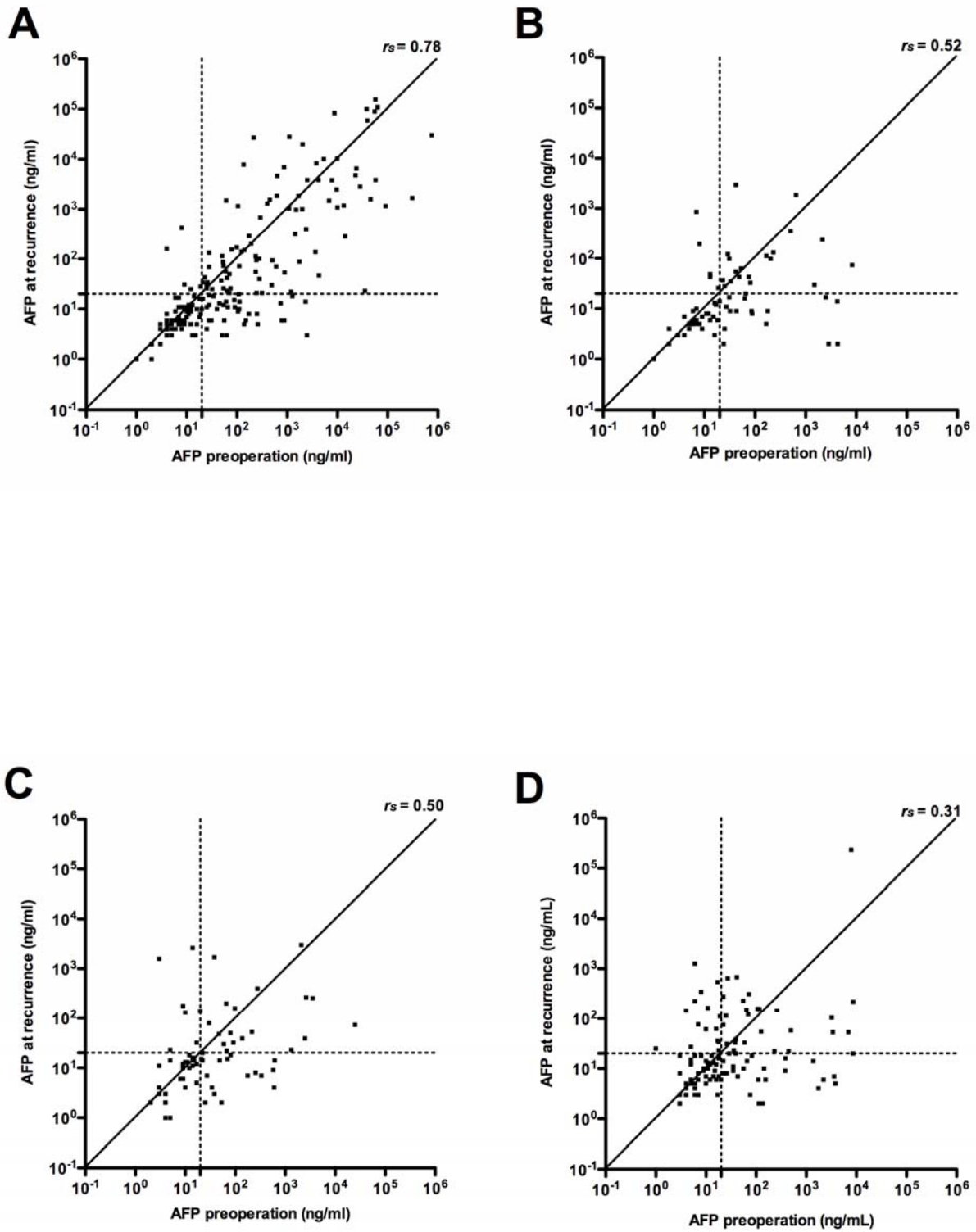


図 3 再発時期別の術前 AFP 値と再発時の AFP 値の関連。(A) 術後半年以内再発の 190 例、(B) 術後 7 ヶ月から 12 ヶ月以内再発の 70 例、(C) 術後 13 ヶ月から 24 ヶ月以内再発の 70 例、(D) 術後 2 年以降再発の 114 例。点線は 20 ng/ml を示す。

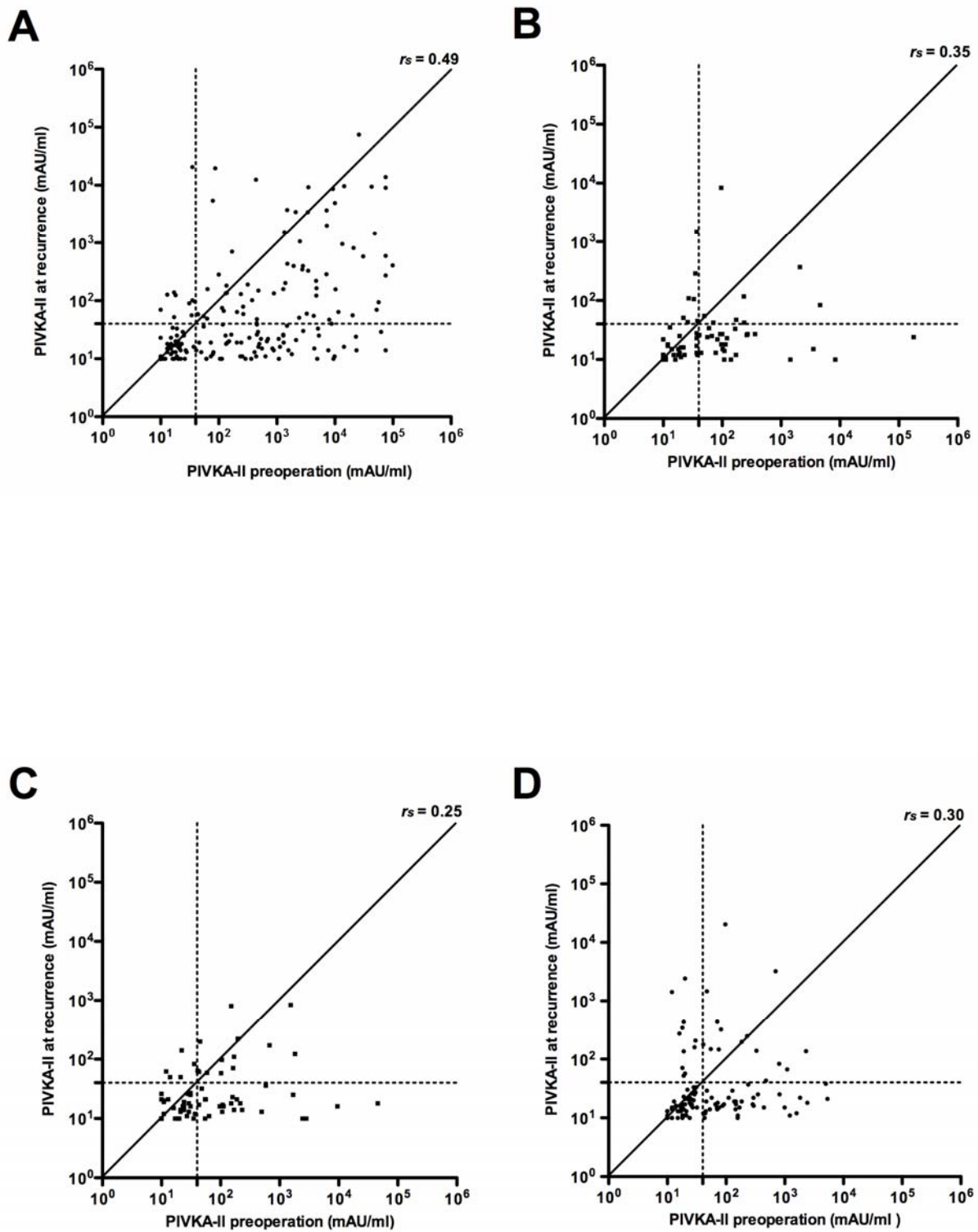


図4 再発時期別の術前 PIVKA-II 値と再発時の PIVKA-II 値の関連。(A) 術後半年以内再発の 190 例、(B) 術後 7 ヶ月から 12 ヶ月以内再発の 70 例、(C) 術後 13 ヶ月から 24 ヶ月以内再発の 70 例、(D) 術後 2 年以降再発の 114 例。点線は 40 mAU/ml を示す。

## 第四章 考案

腫瘍マーカーの診断能を評価するためには、その感度・特異度がトレードオフ関係にあるために、ROC 曲線を作成して評価することが望ましい [32]。現在まで 3 つの横断的研究が ROC 曲線を用いて AFP と PIVKA-II の診断能の比較を行っている [17,19,20]。そのうち Wang らと Marrero らの研究では PIVKA-II が優位な結果であり [17,20]、Nakamura らの研究では AFP の方が全般にわたり優れた診断能をしめすことが報告されている [19]。本研究における背景肝の病因の分布は Marrero らや Nakamura らの研究のそれとほぼ同じであった [19,20]。肝機能の評価法である Child-Turcotte-Pugh (以下 CTP)grade の分布に関しては、本研究の背景では CTP grade A が 84.2%の割合であったため、Marrero らと Nakamura らの報告の間にあると考えられた [19,20]。

本研究では、術後半年以内に再発を認めなかった患者の術後半年のマーカー値を HCC を有しない症例のマーカー値と定義して検討した。本研究の検討方法は過去の報告の方法とは異なっているが [17,19,20]、今回の検討方法は HCC を有する群と有さない群の背景因子がほぼ同一であるという点でより優れた方法と考えられる。対照群の背景因子を有疾患群のそれと同等にすることは、腫瘍マーカーの前向きスクリーニング研究においては必須条件であるが [33]、横断的研究ではそれは必ずしも保証されていない。本研究における ROC 曲線による比較は Marrero らや Wang らの報告とほぼ同等の結果であり [17,20]、PIVKA-II が AUROC で約 10%優れているという結果であった (0.73-0.83 vs. 0.85-0.93、AFP vs. PIVKA-II) (図 1)。

本研究で採用する腫瘍マーカーのカットオフ値は、今までさまざまな研究で採用され、かつ日常の臨床業務において一般的に使用されている値である AFP : 20 ng/ml および PIVKA-II : 40 mAU/ml に設定した [30]。AFP においては、100 ng/ml や 200 ng/ml といったさらに高い値がしばしばより適したカットオフ値として主張されている。しかし注目すべ

きことに、ROC 曲線上の感度・特異度のトレードオフと言う見地からは、今回採用したカットオフ値はこれらのより高い値よりもより適切であるだけではなく、さらに低い値がカットオフ値として推奨されるという結果であった（図 1、表 2）。今回採用した PIVKA-II のカットオフ値である 40 mAU/ml は、今回採用した AFP のカットオフ値と同等の感度を示しているが、過去の報告における推奨カットオフ値（40-125 mAU/ml）の中では最も低い値になる。しかし ROC 曲線による感度・特異度のトレードオフの検討からは、より低いカットオフ値が推奨されるという結果であった。すなわち AFP、PIVKA-II とも肝切除症例というコホートにおいては、カットオフ値は従来採用されてきている値よりも少なくとも 50% 程低い値にすべきであるという結果であり、今回の研究の新しい知見である。

さらに PIVKA-II は治療の効果をモニタリングするという観点から AFP よりも優れていた。すなわち術前 PIVKA-II 陽性であり術後半年以内に再発を認めなかった症例のうち 99.6 %（245/246 例）において術後半年の時点でマーカー値が陰転化していることが確かめられた。これに対して、術前 AFP 陽性例であり術後半年以内に再発を認めなかった症例中における術後半年の時点でのマーカー値の陰転化症例は 80.3 %（184/229 例）にとどまった。術後半年の時点での高い AFP の偽陽性率（19.7%）は急性肝炎や慢性肝炎、肝硬変などでしばしば観察される背景肝の状態によるマーカー値の上昇を反映したものであると考えられる [3]。背景肝の状態によってその値が上昇するという事実は、HCC に特異的な腫瘍マーカーとしての AFP の欠点である。PIVKA-II は閉塞性黄疸やワーファリンなどのビタミン K 拮抗薬を投与されてビタミン K の欠乏した患者で高値を示すことが報告されているが [12,34]、HCC 患者においてこれらのまれな臨床状態は比較的容易に鑑別が可能である。むしろ、肝炎ウイルス関連以外の肝癌の高危険群である慢性アルコール依存患者において非特異的な PIVKA-II 上昇が 5～8 %の患者で見られることは PIVKA-II を腫瘍マーカーとして使用する際に銘記すべき事項である [35,36]。Marrero らの報告で採用された 125 mAU/ml

という高いカットオフ値の設定は、彼らが検討した症例にアルコール依存症の患者がある程度以上の割合で（5％）で含まれていたためである可能性がある [20]。

今回の検討では、AFP 値と PIVKA-II 値には関連が認められなかった。この結果は過去の諸家の報告とも一致したものであった [11-17,21]。これら二つのマーカーは互いに独立しており、マーカー単独としては PIVKA-II の方が AFP より優れているものの臨床上は二つのマーカーを組み合わせて診療にあたることが強く勧められる。

さまざまな研究で腫瘍マーカーと各種病理組織学的因子との関連が検討されているが、これらの報告の大多数は特定の病理組織学的因子に注目してマーカー値との関連を検討したものであり、さらに AFP 単独もしくは PIVKA-II 単独での検討である。また、以前の報告のほとんどが生検や画像による所見での検討であり、HCC の最も強力な予後因子として従来一貫して報告されている脈管侵襲および肝内転移との関係は、検討不可能か画像でも同定可能なレベルのもののみでの検討にとどまっている。さらには検討症例数も 100 例程度にとどまり、切除標本を用いて病理組織学的因子を詳細に大規模コホート研究をしたものはない。これらの事実を考慮して、われわれはこれらの関連をより包括的に切除標本で検討した。血漿 PIVKA-II 値は腫瘍径の増大に伴い上昇したが、血清 AFP においてはその傾向は見られなかった（表 4）。この結果は以前の報告と一致したものであり

[8,13,14,16,17,26,37]、AFP 合成能における各個体間の差異は腫瘍細胞数の増加による腫瘍マーカーの上昇をはるかに上回っていることを反映した結果と考えられた。

血清 AFP 値は腫瘍数の増加に伴い上昇する傾向にあったが、この関連は PIVKA-II では見られなかった（表 4）。この結果は、AFP と腫瘍数には有意な関係があるとした Kasahara らや Carr らの報告と一致している [13,22]。腫瘍数は背景肝における発癌性の上昇を反映した因子であることを考慮すると [38]、この結果は背景肝の重症度と共に AFP が上昇することで説明がつくかもしれない [3,37]。

今回の 714 例の検討においては、AFP および PIVKA-II の上昇は双方とも血管侵襲や肝内転移など腫瘍進展の指標と関連していた。現在までに AFP や PIVKA-II とこれらの病理組織学的指標の関連を検討した報告はいくつか存在するが、いずれも 72～161 例での検討であり、さらには外科的に切除した標本で病理組織学所見を検討した報告は 3 つにとどまる [14,21,24]。過去の報告では、PIVKA-II がこれらの指標と密接もしくは特異的な関係を示すとされてきたが、AFP の PIVKA-II の双方が上昇しているという点は以前の報告とは矛盾した結果である。また本研究では、AFP 値および PIVKA-II 値は同等に腫瘍細胞の分化度と関連していた（表 4）。この所見も AFP [24,28] もしくは PIVKA-II [24,26,28] の片方のみが特異的に腫瘍の分化度と密接な関連があるとした以前の報告（56～354 例）とは矛盾している。今回の大規模コホート研究は、AFP 値および PIVKA-II 値の上昇は腫瘍の進展もしくは悪性度を代表する病理因子の存在を全般的に強く示唆するものであるが、特定の因子の存在を特異的に示すものではなかった。ただしこれらの組織学的因子と腫瘍マーカー上昇の独立した関係を包括的に検討した多変量解析での結果では、AFP 値上昇には腫瘍の分化度、腫瘍径、脈管浸襲が強く関係し、一方 PIVKA-II 値上昇には腫瘍径、脈管浸襲が関連するという、二つの腫瘍マーカーでやや異なった結果であった。この解釈については今後の検討課題と考えられる。また肝内転移は多変量解析では両マーカー値の上昇と関連する因子ではなかったが、これは肝内転移が脈管侵襲と病理学的に等価な因子であることの統計学的な傍証と考えられる。

術前の AFP 値もしくは PIVKA-II 値の上昇は術後早期の再発（半年以内）と関連し、早期再発症例では高い腫瘍マーカー値を示す特徴があった。これらの結果は以下のように解釈される。すなわち腫瘍マーカー高値は腫瘍の臨床的な悪性度を表し、早期再発の大部分は転移による再発である。一方、晚期再発は多くの場合、異時多中心性発癌によるもので、多段階発癌の過程の早期に位置する悪性度の高くない腫瘍である。この解釈は腫瘍マーカー

一高値と肝外再発（理論的に 100%転移による再発である）の頻度の高さに強い関連があるという事実によりさらに支持される。

このように HCC 術後再発には 2 つの異なった機序が関与していると考えられる。理論上は、転移による再発が術後早期に認められ、晩期再発の大部分は異時多中心性発癌によるものと考えられる [38,39]。また腫瘍マーカーの発現という観点からは、転移による再発は原発病巣と同様な性質を持っており、二次的に発生した病巣は原発病巣とは独立した性格を持っていると仮定される。従って早期再発症例における腫瘍マーカー値は肝切除術前のマーカー値と密接な関連があるものの、この関連は再発時期が遅くなるにつれて不明瞭になると予想される。再発の時期別に相関係数（図 3、図 4）の推移を検討するとこの仮説はほぼ正しいと考えられ、さらにこの関連は全ての再発時期において PIVKA-II より AFP において強い傾向にあった。このことは、術前および再発時の AFP 高値は少なくとも部分的には背景肝の状態に影響を受けていると考えられる。

## 第五章 結語

慢性肝疾患患者から HCC を有する症例を鑑別することにおいて PIVKA-II は AFP に比べてより正確であるが、AFP と PIVKA-II は互いに独立したマーカーであるため、臨床応用上は双方を計測して判断することが望ましい。また肝切除後も、術前に片方の腫瘍マーカーのみに異常を示す症例でも異時多中心性発癌による再発もあるため、双方を組み合わせ経過観察を行うことが強く勧められる。また、新しい知見として両腫瘍マーカーとも現在汎用されているカットオフ値より低い値が肝切除後の経過観察におけるカットオフ値として設定することが推奨された。今回初めて大規模コホートで切除標本を用いて病理組織学的に詳細に腫瘍マーカーと病理組織学的因子の関連を検討した。両腫瘍マーカーとも腫瘍の進展とともにその値が上昇するが、それぞれに特異的なある特定の病理学的因子の存在を示すものではなかった。術前の腫瘍マーカー高値は術後早期再発の寄与因子であり、術前の腫瘍マーカー値と再発時の腫瘍マーカー値にみられる関係は、肝内転移もしくは異時多中心性発生という HCC の再発様式を予想する基準として役に立つと考えられる。

## 第六章 参考文献

1. **Bruix J, Sherman M.** Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005; 42:1208-36.
2. **Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin IS.** Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation*. 1963; 1:174-80.
3. **Collier J, Sherman M.** Screening for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1998; 27:273-8.
4. **Oka H, Tamori A, Kuroki T, Kobayashi K, Yamamoto S.** Prospective study of alpha-fetoprotein in cirrhotic patients monitored for development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1994; 19:61-6.
5. **Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodés J; EASL Panel of Experts on HCC.** Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*. 2001; 35:421-30.
6. **Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, Coleman MS, Furie B.** Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Eng J Med*. 1984; 310:1427-31.
7. **Tanabe Y, Ohnishi K, Nomura F, Iida S.** Plasma abnormal prothrombin levels in patients with small hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 1988; 83:1386-9.
8. **Fujiyama S, Izuno K, Gohshi K, Shibata J, Sato T.** Clinical usefulness of des-gamma-carboxy prothrombin assay in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*. 1991; 36:1787-92.
9. **Grazi GL, Mazziotti A, Legnani C, Jovine E, Miniero R, Gallucci A, Palareti G, Gozzetti G.** The role of tumor markers in the diagnosis of hepatocellular carcinoma, with special reference to the des-gamma-carboxy prothrombin. *Liver Transpl Surg*. 1995; 1:249-55.
10. **Nomura F, Ishijima M, Kuwa K, Tanaka N, Nakai T, Ohnishi K.** Serum des-gamma-carboxy prothrombin levels determined by a new generation of sensitive

immunoassays in patients with small-sized hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94:650-4.

11. **Tsai SL, Huang GT, Yang PM, Sheu JC, Sung JL, Chen DS.** Plasma des-gamma-carboxyprothrombin in the early stage of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 1990; 11:481-8.
12. **Deyashiki Y, Nishioka Y, Takahashi K, Kosaka Y, Suzuki K.** Evaluation of des-gamma-carboxy prothrombin as a marker protein of hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 1989; 64:2546-51.
13. **Kasahara A, Hayashi N, Fusamoto H, Kawada Y, Imai Y, Yamamoto H, Hayashi E, Ogiwara T, Kamada T.** Clinical evaluation of plasma des-gamma-carboxy prothrombin as a marker protein of hepatocellular carcinoma in patients with tumors of various sizes. *Dig Dis Sci.* 1993; 38:2170-6.
14. **Inoue S, Nakao A, Harada A, Nonami T, Takagi H.** Clinical significance of abnormal prothrombin (DCP) in relation to postoperative survival and prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 1994; 89:2222-6.
15. **Lamerz R, Runge M, Stieber P, Meissner E.** Use of serum PIVKA-II (DCP) determination for differentiation between benign and malignant liver diseases. *Anticancer Res.* 1999; 19:2489-93.
16. **Cui R, He J, Zhang F, Wang B, Ding H, Shen H, Li Y, Chen X.** Diagnostic value of protein induced by vitamin K absence (PIVKA-II) and hepatoma-specific band of serum gamma-glutamyl transferase (GGTII) as hepatocellular carcinoma markers complementary to alpha-fetoprotein. *Br J Cancer.* 2003; 88:1878-82.
17. **Wang CS, Lin CL, Lee HC, Chen KY, Chiang MF, Chen HS, Lin TJ, Liao LY.** Usefulness of serum des-gamma-carboxy prothrombin in detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005; 11:6115-9.
18. **Mita Y, Aoyagi Y, Yanagi M, Suda T, Suzuki Y, Asakura H.** The usefulness of determining

des-gamma-carboxy prothrombin by sensitive enzyme immunoassay in the early diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1998; 82:1643-8.

19. **Nakamura S, Nouse K, Sakaguchi K, Ito YM, Ohashi Y, Kobayashi Y, Toshikuni N, Tanaka H, Miyake Y, Matsumoto E, Shiratori Y.** Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101:2038-43.
20. **Marrero JA, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, Lok AS.** Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in American patients. *Hepatology*. 2003; 37:1114-21.
21. **Suehiro T, Sugimachi K, Matsumata T, Itasaka H, Taketomi A, Maeda T.** Protein induced by vitamin K absence or antagonist II as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. Comparison with alpha-fetoprotein. *Cancer*. 1994; 73:2464-71.
22. **Carr BI, Kanke F, Wise M, Satomura S.** Clinical evaluation of lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in histologically proven hepatocellular carcinoma in the United States. *Dig Dis Sci*. 2007; 52:776-82.
23. **Johnson PJ.** The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*. 2001; 5:145-59.
24. **Imamura H, Matsuyama Y, Miyagawa Y, Ishida K, Shimada R, Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S.** Prognostic significance of anatomical resection and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg*. 1999; 86:1032-8.
25. **Hagiwara S, Kudo M, Kawasaki T, Nagashima M, Minami Y, Chung H, Fukunaga T, Kitano M, Nakatani T.** Prognostic factors for portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2006; 41:1214-9.
26. **Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, Saito A, Hayashi N, Takasaki K, Takenami K, Yamamoto M, Nakano M.** Serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin measured using the revised enzyme immunoassay kit with increased sensitivity in relation to clinicopathologic

features of solitary hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2000;88:544-9.

27. **Koike Y, Shiratori Y, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M, Yoshida H, Shiina S, Omata M.** Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer*. 2001;91:561-9.
28. **Oishi K, Itamoto T, Amano H, Fukuda S, Ohdan H, Tashiro H, Shimamoto F, Asahara T.** Clinicopathologic features of poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol*. 2007; 95:311-6.
29. **Takayama T, Sekine T, Makuuchi M, Yamasaki S, Kosuge T, Yamamoto J, Shimada K, Sakamoto M, Hirohashi S, Ohashi Y, Kakizoe T.** Adoptive immunotherapy to lower postsurgical recurrence rate of hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *Lancet*. 2000; 356:802-7.
30. **Tateishi R, Yoshida H, Matsuyama Y, Mine N, Kondo Y, Omata M.** Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Hepatol Int*. 2008; 2:17-30.
31. **Liver Cancer Study Group In Japan.** The general rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer. 5th Ed. Tokyo: Kanehara and Co. Ltd, 2000.
32. **Metz CE.** Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med*. 1998; 8:283-98.
33. **Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y.** Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93:1054-61.
34. **Nakao A, Suzuki Y, Issiki K, Kimura Y, Takeda S, Kishimoto W, Nonami T, Harada A, Takagi H.** Clinical evaluation of plasma abnormal prothrombin (des-gamma-carboxy prothrombin) in hepatobiliary malignancies and other diseases. *Am J Gastroenterol*. 1991; 86:62-6.
35. **Lefrere JJ, Gozin D, Lerable J, Soulier JP.** Des-gamma-carboxyprothrombin assay in alcoholic cirrhotic patients with alpha-fetoprotein level slightly increased. *Hepatology*. 1986;

6:1066-7.

36. **Ohhira M, Ohtake T, Saito H, Ikuta K, Tanaka K, Tanabe H, Kawashima T, Fujimoto Y, Naraki T, Ono M, Kohgo Y.** Increase of serum des-gamma-carboxy prothrombin in alcoholic liver disease without hepatocellular carcinoma. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999; 23:67S-70S.
37. **Nakagawa T, Seki T, Shiro T, Wakabayashi M, Imamura M, Itoh T, Tamai T, Nishimura A, Yamashiki N, Matsuzaki K, Sakaida N, Inoue K, Okamura A.** Clinicopathologic significance of protein induced vitamin K absence or antagonist II and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma. *Int j Oncol.* 1999; 14:281-6.
38. **Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, Sugawara Y, Minagawa M, Takayama T, Kawasaki S, Makuuchi M.** Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol.* 2003; 38:200-7.
39. **Poon RT, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J.** Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2000; 89:500-7.

## 謝辞

指導教官として直接、多岐にわたり御指導くださった東京大学大学院医学系研究科肝胆膵・人工臓器移植外科 國土典宏教授に深く感謝の意を表します。

研究を直接御指導いただいた順天堂大学医学部肝胆膵外科 今村宏准教授に深く感謝の意を表します。

最後に研究の機会を与えていただいた日本赤十字社医療センター 幕内雅敏院長（東京大学大学院医学系研究科肝胆膵・人工臓器移植外科 前教授）に深く感謝いたします。