

# Evaluation of a Plasma PIVKA-II Assay Including Microestimation in Hepatocellular Carcinoma

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8340">http://hdl.handle.net/2297/8340</a>

## 肝細胞癌における PIVKA-II 測定の意義

### —PIVKA-II 微量測定を含めた検討—

金沢大学医学部内科学第一講座 (主任:小林健一教授)

大 溝 了 庸

(平成4年4月9日受付)

肝細胞癌および各種疾患における血漿中異常プロトロンビン (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II, PIVKA-II) を酵素抗体免疫測定法 (E-1023), E-1023 にアビジン-ビオチン法を応用し, 微量測定を可能にした高感度法, ラテックス凝集法 (TZR-110) の3法を用い測定し, その有用性を検討した. E-1023 による測定では, 0.1AU/ml 以上を陽性とする, 健康人は全例陰性で, 肝細胞癌96例中58例 (60%), 肝硬変79例中1例 (1%), 慢性肝炎83例中3例 (3%) が陽性を示し, 肝細胞癌において PIVKA-II 陽性は高率であり, その差は有意であった ( $p < 0.001$ ). また, PIVKA-II と  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) には相関を認めず, 両者併用により肝細胞癌の診断率は96例中69例 (72%) と向上した. さらに, 経時的測定により, 肝細胞癌の臨床経過を反映した PIVKA-II の変動も確認された. 一方, 他臓器悪性腫瘍や原発性胆汁性肝硬変の一部に PIVKA-II 高値例がみられたが, これらはすべて閉塞性黄疸や肝内胆汁うっ滞例であった. なお, ビタミンK<sub>2</sub>投与により肝細胞癌患者においても, 胆汁うっ滞例と同様に, PIVKA-II の低下, 陰性化が認められ, ビタミンK<sub>2</sub>反応性からの両疾患の鑑別は困難であった. 高感度法を用いた PIVKA-II 微量測定では, 0.008AU/ml 以上を陽性とする, 健康人は全例陰性で, 肝細胞癌では52例中33例 (63%) が陽性であった. E-1023 による測定結果に比し, 肝細胞癌での陽性率の上昇と, 小肝細胞癌での陽性例を認めたが, 胆汁うっ滞例や肝硬変例における陽性率も増加した. また, 本法による測定は, 経過中に PIVKA-II 値が E-1023 の測定感度以下になった肝細胞癌例において, その臨床経過の評価に有用であった. ラテックス凝集法による測定は, 1  $\mu$ g/ml 以上を陽性とする, 肝細胞癌37例中21例 (56%) が陽性であったが, E-1023 での測定結果に比し, 肝硬変や慢性肝炎での陽性率が高くなる傾向がみられた. 以上の結果から, E-1023 による PIVKA-II 測定は, 胆汁うっ滞の有無, ビタミンK投与の有無に留意する必要があるが, 肝細胞癌の腫瘍マーカーとして有用であり, さらに, 高感度法による微量測定の併用は, PIVKA-II 低値の肝細胞癌の診断や臨床経過観察に有用性が増すものと考えられた. また, ラテックス凝集法による測定は簡便ではあるが, 肝細胞癌診断における特異性は劣ると考えられた.

**Key words** hepatocellular carcinoma, PIVKA-II, ELISA method, high sensitive method, latex agglutination method

異常プロトロンビン (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II, PIVKA-II) はビタミンKの吸収障害やワーファリン投与などによるビタミンKの利用障害が存在すると出現する異常蛋白であり<sup>1)2)</sup>, 近年 Liebman ら<sup>3)</sup>は放射性免疫測定 (radioimmunoassay, RIA) 法にて, 藤山ら<sup>4)</sup>は酵素抗体免疫測定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 2抗体サンドイッチ法にて, 各種肝疾患における血漿 PIVKA-II を測定し, 肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) において, 高率に PIVKA-II の出現を認めたと報告している. 今回著者はカップ型 ELISA 法 (E-1023)<sup>5)</sup>, さらに, E-1023 にアビジン-ビオチン系を応用した高感度法, ラテックス凝集法 (TZR-110)<sup>6)</sup>を用い, HCC を含む各種肝疾患及び他の悪性腫瘍において, PIVKA-II を測定し, HCC 診断における PIVKA-II 測定の有用性の検討, さらに, HCC 以外の PIVKA-II 陽性例の検討, 高感度法による PIVKA-II 微量測定の意義に関する検討を行ったので

報告する.

#### 対象および方法

##### 1. 対 象

金沢大学医学部第一内科に入院し, 腹腔鏡, 肝生検, 各種画像診断, 手術, 剖検などにより診断しえた HCC 96例, 肝硬変 (liver cirrhosis, LC) 79例, 慢性肝炎 (chronic hepatitis, CH) 83例, 急性肝炎 (acute hepatitis, AH) 20例, 劇症肝炎 (fulminant hepatitis, FH) 4例, 原発性胆汁性肝硬変 (primary biliary cirrhosis, PBC) 21例, HCC 以外の悪性腫瘍50例 (うち胃癌20例, 胃悪性リンパ腫1例, 肺癌3例, 胆管細胞癌1例, 膵臓癌12例, 胆道癌11例, 大腸癌2例), および健康人30例, 計383例を対象とした. なお, HCC 96例は, 男性78例, 女性18例, 年齢60 $\pm$ 10歳であった.

##### II. 検体採取法および保存法

Abbreviations: AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; AH, acute hepatitis; CEA, carcinoembryonic antigen; CH, chronic hepatitis; EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FH, fulminant hepatitis; Gla,  $\gamma$ -carboxy glutamic acid residues; Glu, glutamic acid residues; HCC, hepatocellular

原則として、早朝空腹時に3.8%クエン酸ナトリウムを含む真空採血管を用い採血した。採血後直ちに3000回転10分間の遠心分離を行い、得られた血漿を $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結し、使用時まで保存した。

### Ⅲ. PIVKA-II 測定法

#### 1. E-1023 操作法

ELISA 法を原理とした E-1023 (エーザイ株式会社, 東京) による測定法を以下に示す。

##### 1) 第1反応

抗 PIVKA-II モノクローナル抗体をコートしたカップに  $4^{\circ}\text{C}$  下で全てのカップに反応用溶液 (10%正常家兎血清, 50mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), 0.75M NaCl, 0.1%ベンザミジン, 0.1%アジ化ナトリウム含トリス塩酸緩衝液; 0.01M pH 8.0) を  $25\mu\text{l}$  ずつ注入し, さらに PIVKA-II 8.0AU/ml の標準抗原液を倍々希釈して作製された 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063AU/ml の標準抗原液あるいは, 標準抗原希釈用溶液 (正常人血漿 6ml 凍結乾燥品+精製水 6ml), 被検血漿を各々  $100\mu\text{l}$  ずつ 2 カップに注入し,  $4^{\circ}\text{C}$  下で 16時間反応させた。

##### 2) 第2反応

第1反応終了時, 洗浄器 (ミニウォッシャー 8穴用) を用い,  $4^{\circ}\text{C}$  下でカップ内溶液を吸引除去し, 0.01% Tween 20含有 0.15M 塩化ナトリウム液にて洗浄した。洗浄終了後, 酵素標識抗体 (ペルオキシダーゼ結合抗プロトンピン抗体) を  $100\mu\text{l}$  ずつ全てのカップに注入し  $4^{\circ}\text{C}$  にて 1時間反応させた。

##### 3) 第3反応

第2反応終了後, 2) と同様の方法で吸引, 洗浄を行った。さらに, 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) 18mg をクエン酸緩衝液 (0.1M pH4.2) 12ml で溶解した後, 3%過酸化水素水  $30\mu\text{l}$  を添加して作製した酵素基質液  $100\mu\text{l}$  を  $4^{\circ}\text{C}$  にて, 全てのカップに注入し,  $20\sim 30^{\circ}\text{C}$  にて 1時間反応させた。

##### 4) 反応の停止

第3反応終了後,  $4^{\circ}\text{C}$  下で反応停止液 (2mM アジ化ナトリウム)  $100\mu\text{l}$  を全てのカップに注入し, 反応を停止させた。

##### 5) 反応液の光学的測定

カップ内の全溶液 ( $200\mu\text{l}$ ) の吸光度を, 100-20型デジタル分光光度計 (日立, 東京) を用い, 精製水を対照として波長 405nm にて測定した。

##### 6) PIVKA-II 値への換算

両対数グラフ用紙を使用し, 縦軸に吸光度を, 横軸に PIVKA-II 標準抗原溶液の各濃度を記入した。次に, 各濃度の標準抗原溶液の測定から得られた吸光度値から標準抗原希釈用溶液の平均吸光度値を減じた数値を各々プロットし, 標準曲線を作製した。さらに被検血漿の測定で得られた各々 2 検体の吸光度値の平均から, 標準抗原希釈用溶液の平均吸光度値を減じた値を求め, 標準曲線から被検血漿中の PIVKA-II 値を算出した。本法にて PIVKA-II 値は 0.063AU/ml から 8AU/ml まで測定が可能であった<sup>7)</sup>。

なお, 対象症例全例において, 本法による PIVKA-II 測定を行なった。

#### 2. 高感度法による測定法

E-1023 にアビジン-ビオジン系を応用した高感度法による PIVKA-II 微量測定法を以下に示す。

##### 1) 第1反応

E-1023 操作法と同様に, 抗 PIVKA-II モノクローナル抗体をコートしたカップに,  $4^{\circ}\text{C}$  で全てのカップに反応用溶液を  $25\mu\text{l}$  ずつ注入し, さらに PIVKA-II 8.0AU/ml の標準抗原液を倍々希釈して作製された 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008, 0.004AU/ml の標準抗原液あるいは, 標準抗原希釈用溶液, 被検血漿を各々  $100\mu\text{l}$  ずつ 2 カップに注入し,  $4^{\circ}\text{C}$  下で 16時間反応させた。

##### 2) 第2反応

第1反応終了後, 洗浄器にて  $4^{\circ}\text{C}$  下でカップ内溶液を吸引除去し, 0.01% Tween 20 含有 0.15M 塩化ナトリウム液にて洗浄した。洗浄終了後ビオチン化抗プロトンピン抗体を  $100\mu\text{l}$  ずつの全てのカップに注入し,  $4^{\circ}\text{C}$  にて 1時間反応させた。

##### 3) 第3反応

第2反応終了後, 2) と同様の方法で吸引, 洗浄を行った。さらに, アビジン化ペルオキシダーゼを  $100\mu\text{l}$  ずつ全てのカップに注入し,  $4^{\circ}\text{C}$  にて 1時間反応させた。

##### 4) 第4反応

第3反応終了後, 2), 3) と同様の方法で吸引, 除去を行った。さらに, 酵素基質液  $100\mu\text{l}$  を  $4^{\circ}\text{C}$  にて全てのカップに注入し,  $20\sim 30^{\circ}\text{C}$  にて 1時間反応させた。

##### 5) 反応の停止

第4反応終了後,  $4^{\circ}\text{C}$  下で反応停止液 (2mM アジ化ナトリウム)  $100\mu\text{l}$  を全てのカップに注入し, 反応を停止させた。

##### 6) 発色液の光学的測定

カップ内の全溶液 ( $200\mu\text{l}$ ) の吸光度を, 100-20型デジタル分光光度計 (日立) を用い, 精製水を対照として波長 405nm にて測定した。

##### 7) PIVKA-II 値への換算

両対数グラフ用紙を使用し, 縦軸に吸光度を, 横軸に PIVKA-II 標準抗原溶液の各濃度を記入した。次に, 各濃度の標準抗原溶液の測定から得られた吸光度値から標準抗原希釈用溶液の平均吸光度値を減じた数値を各々プロットし, 標準曲線を作製した。さらに, 被検血漿の測定で得られた各々 2 検体の吸光度値の平均から標準抗原希釈用溶液の平均吸光度値を減じた値を求め, 標準曲線から被検血漿中の PIVKA-II 値を算出した。本法にて, PIVKA-II 値は 0.008AU/ml から 1AU/ml まで測定が可能であった。

なお, 対象症例のうち, HCC 52例, LC 43例, CH41例, AH 3例, FH 2例, PBC 8例, 他臓器悪性腫瘍22例, 健常人 20例, 計191例において, 本法および E-1023 による PIVKA-II 測定を同一検体を用いて行った。

#### 3. TZR-110 操作法

正常プロトンピンはバリウム塩に吸着されるが, PIVKA-II は吸着されない性質<sup>8)</sup> を利用し, バリウム塩で吸着処理した後の検体について抗ヒトプロトンピン抗体とのラテックス凝集反応を指標とした TZR-110 (帝國臓器製薬株式会社, 東京) による PIVKA-II 測定法を以下に示す。

carcinoma; LC, liver cirrhosis; PBC, primary biliary cirrhosis; PIVKA-II, protein induced by vitamin K absence or antagonist-II; RIA, radioimmunoassay



5cm 以上の群では34例中22例 (64%) に PIVKA-II 陽性を認めた。なお、腫瘍径が 2cm の HCC の 1 例に PIVKA-II 陽性をみたが、その値は 0.11AU/ml と低値であった。

4. HCC 以外の PIVKA-II 陽性例の検討

LC 1 例, CH 3 例, AH 2 例, FH 1 例, PBC 7 例, 他臓器悪性腫瘍 5 例に PIVKA-II 陽性例がみられた。LC の 1 例の PIVKA-II 値は 0.15AU/ml と低値陽性であり, 非代償期黄疸例であった。AH の 2 例および, CH の 1 例は急性期あるいは急性増悪期の黄疸例であり, CH の残り 2 例はワーファリン服用患者であった。PBC 7 例は全例 stage III ないし IV 期の黄疸例であった。他臓器悪性腫瘍でみられた陽性例は, 肺癌 3 例, 大腸癌肝転移例 1 例, 胃癌肝転移例 1 例でいずれも閉塞性黄疸例であった。

PBC 黄疸例および HCC 以外の閉塞性黄疸例における PIVKA-II 値と総ビリルビン値の検討では, 両者間には明らか

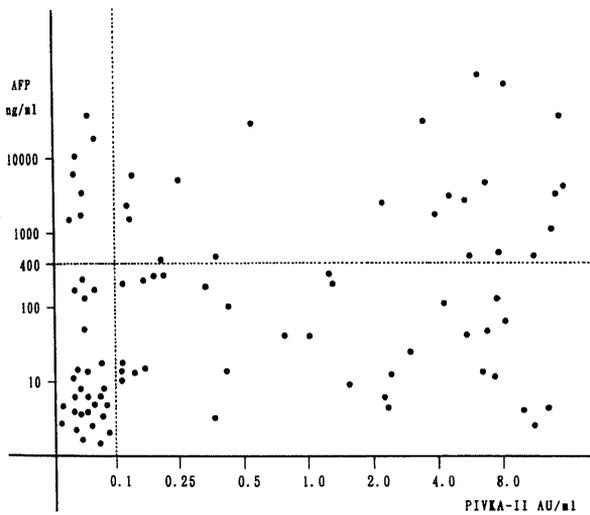


Fig. 2. Correlation between PIVKA-II levels assayed by E-1023 and AFP levels in patients with HCC. No correlation is apparent between these two parameters ( $r=0.15$ ).

A horizontal dashed line indicates the cut-off level of AFP, 400ng/ml and a vertical dashed line indicates the cut-off level of PIVKA-II, 0.1AU/ml.

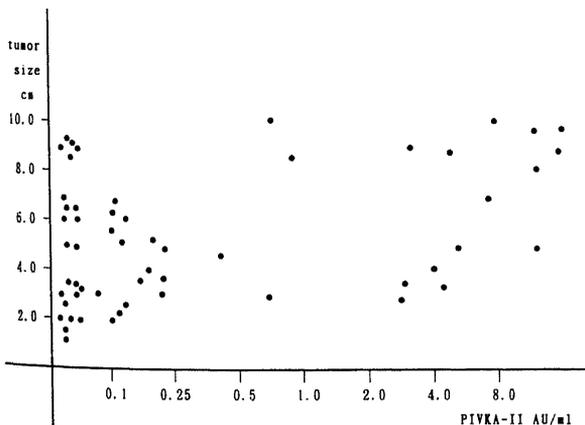


Fig. 3. Correlation between PIVKA-II levels assayed by E-1023 and tumor size in patients with HCC. No correlation was apparent between these two parameters ( $r=0.13$ ).

な相関はみられず ( $r=0.19$ ), 高度の黄疸が存在しながら PIVKA-II 陰性の症例もみられた (図 4).

5. PIVKA-II 陽性 HCC, PBC 例におけるビタミン K<sub>2</sub> 投与の影響

1) HCC および PBC におけるビタミン K<sub>2</sub> 30mg 7日間投

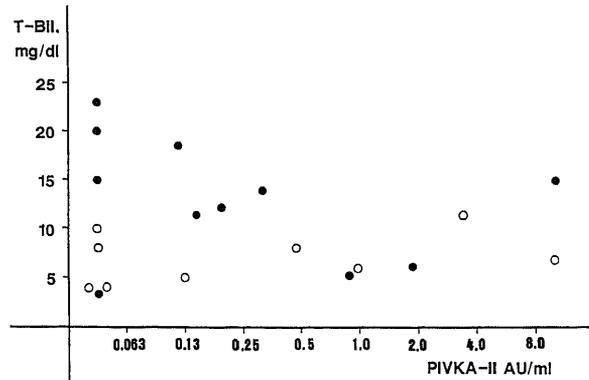


Fig. 4. Correlation between PIVKA-II levels assayed by E-1023 and total bilirubin levels in patients with cholestasis. No correlation was observed ( $r=0.19$ ).

●, cases with PBC.; ○, cases with obstructive jaundice.; T-Bil., total bilirubin.

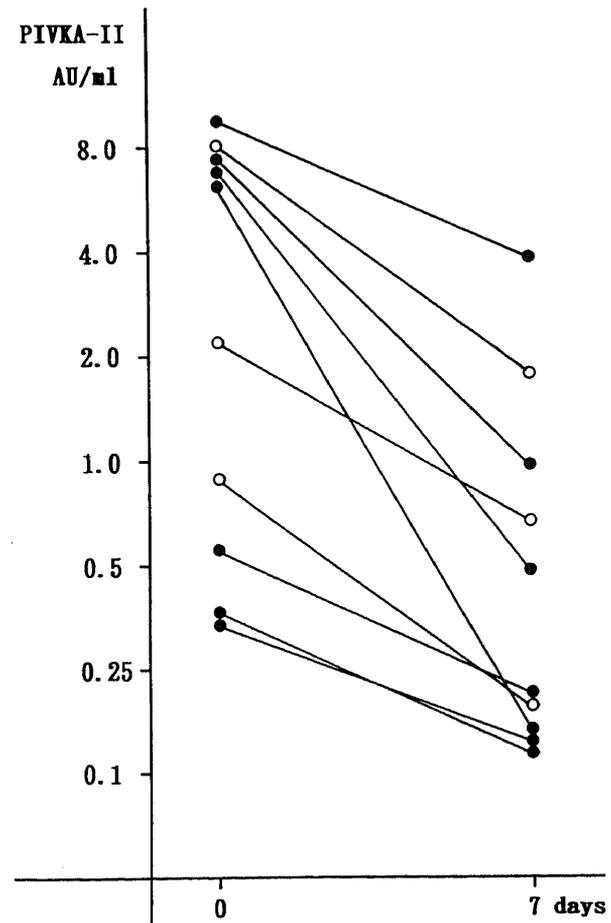


Fig. 5. Effects of vitamin K<sub>2</sub> administration on PIVKA-II levels assayed by E-1023 in patients with HCC or PBC. A daily dose of 30 mg of vitamin K<sub>2</sub> was given intra-venously for 7 days. ●, cases with HCC.; ○, cases with PBC.

与による PIVKA-II の変動

PIVKA-II 高値で、胆汁うっ滞を認めない HCC 7 例および PIVKA-II 高値の PBC 黄疸例 3 例におけるビタミン K<sub>2</sub> 30mg 7 日間点滴静注による PIVKA-II の変動を図 5 に示す。

HCC では、PIVKA-II の前値は 5.7±1.0AU/ml、後値は 1.2±0.5AU/ml と、ビタミン K<sub>2</sub> 投与前後にて有意の低下 (p<0.01) を認めた。また、その変化率 (後値/前値) は 21±7% であった。

一方、PBC においても、PIVKA-II の前値は 3.7±1.2AU/ml、後値は 0.94±0.6AU/ml と有意の低下 (p<0.01) を認め、その変化率は 25±8% であり、HCC における変化率との差はみられなかった。

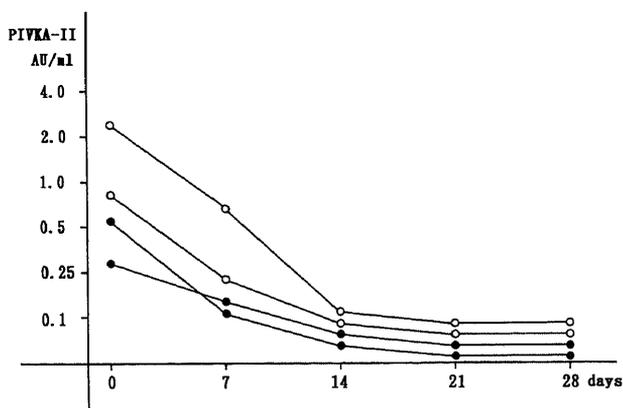


Fig. 6. Effects of vitamin K<sub>2</sub> administration on PIVKA-II levels assayed by E-1023 in patients with HCC or PBC. A daily dose of 30 mg of vitamin K<sub>2</sub> was given intra-venously for 28 days. ●, cases with HCC.; ○, cases with PBC.

2) HCC および PBC におけるビタミン K<sub>2</sub> 30mg 28 日間投与による PIVKA-II の変動

PIVKA-II 高値で、胆汁うっ滞を認めない HCC 2 例及び、PIVKA-II 高値の PBC 黄疸例 2 例におけるビタミン K<sub>2</sub> 30mg 28 日間点滴静注による PIVKA-II の変動を図 6 に示す。

HCC 例では、2 例とも低下を認め、ビタミン K<sub>2</sub> 投与 14 日後には、0.063AU/ml 未満の検出不能域に達した。

PBC 2 例においても、PIVKA-II は低下を認め、1 例は HCC 同様 14 日後より陰性化した。残り 1 例はビタミン K<sub>2</sub> 投与前 PIVKA-II は 2.4AU/ml であったが、投与 14 日後に 0.15 AU/ml と低値陽性となり、21 日後には検出不能域にまで低下した。

II. 高感度法による PIVKA-II 測定結果

健康人全例が 0.008AU/ml 未満であったことより、0.008 AU/ml 以上を陽性とする、HCC では 52 例中 33 例 (63%) が陽性を示した (図 7)。一方、CH, AH, FH では全例陰性であったが、LC 43 例中 4 例 (9%), PBC 8 例中 4 例 (50%), 他臓器悪性腫瘍では 22 例中 3 例 (14%) にも陽性例がみられた。

同一検体を用いた E-1023 による測定結果と比較すると、E-1023 での陽性率は HCC 54%, LC 0%, CH 0%, AH 0%, FH 0%, PBC 38%, 他臓器悪性腫瘍 9% であり、高感度法の成績は、HCC での陽性率が高くなるが、LC, PBC, 他臓器悪性腫瘍での陽性率も高まる傾向がみられた。

E-1023 にて陰性ながら本法による微量測定にて始めて PIVKA-II 陽性を示した HCC は 5 例認められ、この 5 例につき検討すると、5 例中 1 例の AFP は 2600ng/ml と高値であったが、残り 4 例ではその AFP は 20ng/ml 以下の低値を示していた。また、5 例中 4 例は腫瘍径が 3cm 以上であったが、残り 1 例は腫瘍径 2cm の小肝癌であった。

	PIVKA-II AU/ml								positive rate (%)	
	0,008	0,016	0,031	0,063	0,13	0,25	0,5	1,0		
Hepatocellular carcinoma n=52	●●●●●●●●	●	●	●	●	●	●●●	●●	●●●●●●●●	63
Liver cirrhosis n=43	●●●●●●●●	●	●	●						9
Chronic hepatitis n=41	●●●●●●●●									0
Acute hepatitis n=3	●									0
Fulminant hepatitis n=2	●									0
Primary biliary cirrhosis n=8	●			●	●●			●		50
Other malignant tumors n=22	●●●●●●●●	●						●●		14
Normal control n=20	●●●●●●●●									0

Fig. 7. PIVKA-II levels assayed by high sensitive method in patients with various diseases.

	PIVKA-II $\mu\text{g/ml}$					positive rate (%)
	(-)	1	2	4	8	
Hepatocellular carcinoma n=37	●●●● ●●●● ●●●●	●●●● ●●●● ●●●●	●● ●● ●●	●	●	57
Liver cirrhosis n=13	●●●● ●●●● ●●●●	● ● ●				23
Chronic hepatitis n=14	●●●● ●●●● ●●●●	● ● ●				21
Other malignant tumors n=10	●● ●● ●●	● ●				20
Normal control n=15	●●●● ●●●● ●●●●					0

Fig. 8. PIVKA-II levels assayed by TZR-110 in patients with various diseases.

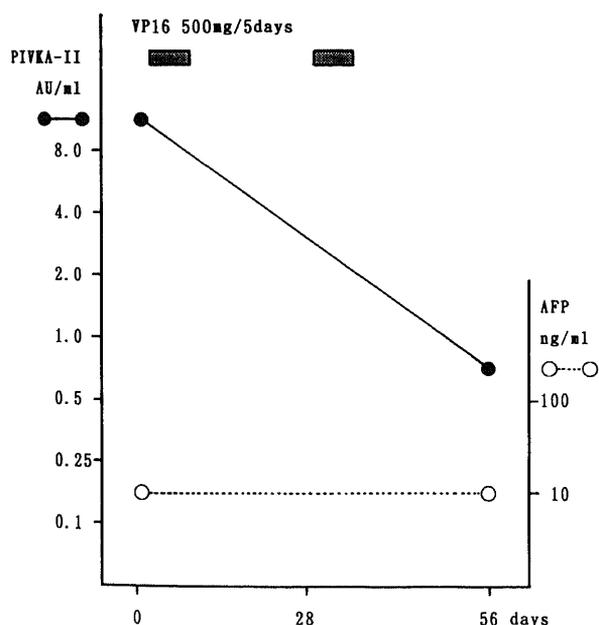


Fig. 9. Changes of PIVKA-II level assayed by E-1023 in a patient with HCC (male, 65 years old).

HCC 以外で、E-1023 では陰性ながら、本法にて始めて陽性となった症例は、LC 4 例、PBC 1 例、他臓器悪性腫瘍 1 例であり、この LC 4 例は全て肝予備能不良の黄疸例で、PBC の 1 例、他臓器悪性腫瘍の 1 例は、肝内胆汁うっ滞あるいは閉塞性黄疸を呈していた。

Ⅲ. TZR-110 による PIVKA-II 測定結果

健常人は全例陰性であった。一方、HCC では、37 例中 21 例 (56%) が  $1 \mu\text{g/ml}$  以上の陽性を示し、陽性例 21 例中 10 例

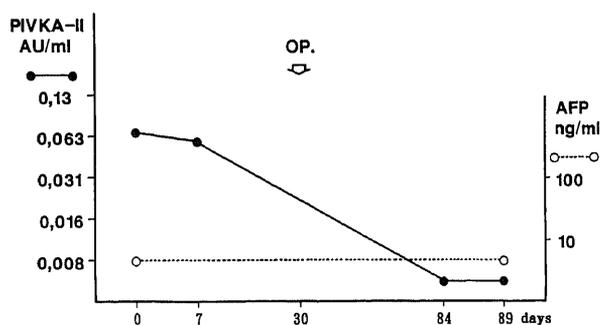


Fig. 10 Changes of PIVKA-II level assayed by E-1023 and high sensitive method in a patient with HCC (male, 50 years old). OP. indicates the time of the surgical operation.

(47%) が  $2 \mu\text{g/ml}$  以上であった (図 8)。他疾患では、LC で 13 例中 3 例 (23%)、CH で 14 例中 3 例 (21%)、他臓器悪性腫瘍で 10 例中 2 例 (20%) に陽性であったが陽性例はいずれも  $1 \mu\text{g/ml}$  であった。

同一検体を用いた E-1023 による測定結果と比較すると、E-1023 での陽性率は HCC 62%、LC 0%、CH 7%、他臓器悪性腫瘍 10% であり、TZR-110 による成績は、HCC 以外の慢性肝疾患や他臓器悪性腫瘍での陽性率も高くなる傾向がみられた。

Ⅳ. HCC 症例の臨床経過と PIVKA-II の変動

E-1023、高感度法による PIVKA-II 測定が治療効果判定に有用であることを示唆した HCC 3 例の臨床経過を以下に示す。

図 9 に 65 歳男性 HCC 例の臨床経過中の PIVKA-II の変動を示す。本例は VP16 100mg/日、5 日間点滴静注を 2 クール施行して、partial response の抗腫瘍効果が得られた前後にて、

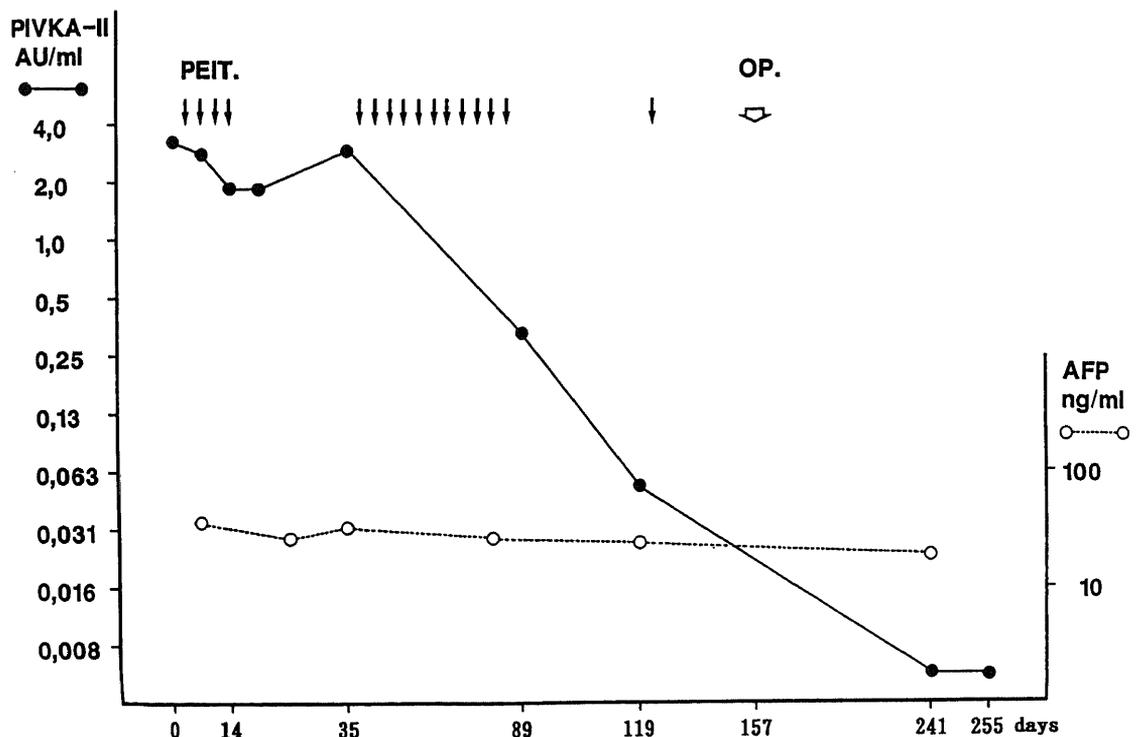


Fig.11. Serial changes of PIVKA-II level assayed by E-1023 and high sensitive method in a patient with HCC (female, 58 years old). PEIT. indicates the times of percutaneous ethanol injection therapy performed.; OP. indicates the time of surgical operation.

PIVKA-II は 8AU/ml 以上の高値より 0.7AU/ml に低下を認めた。

図10に50歳男性 HCC 例の臨床経過中の PIVKA-II 値と AFP 値を示す。本例は HCC に対し手術を施行した。PIVKA-II は E-1023 にて手術前後とも陰性ながら、高感度法による微量測定では術前 0.06AU/ml から術後 0.008AU/ml 未満へと低下を認めた。

図11に58歳女性 HCC 例の臨床経過を示す。本例はエタノール局注療法を行った後手術を施行した。PIVKA-II は E-1023 にて治療前 3.4AU/ml であったが、局注療法後陰性化を認めた。ここで高感度法による微量測定を行うと、0.04AU/ml と異常値を示し、手術後、0.008AU/ml 未満の測定不能域にまで低下した。

#### 考 察

HCC の腫瘍マーカーとして AFP が有用とされ、HCC の診断、経過および治療効果の判定、再発の予知などの指標として臨床的に広く用いられている。しかし、画像診断の進歩により、AFP 陰性例の HCC の比率が増加しつつあり、一層実用的かつ特異性の高い腫瘍マーカーが望まれている。

肝臓で産生される蛋白質のなかで血液第Ⅱ因子であるプロトロンビンや第Ⅶ、Ⅷ、Ⅹ因子、プロテイン C (protein C)、プロテイン S (protein S)、プロテイン Z (protein Z) などの一群の蛋白質は、合成の過程においてビタミン K を補酵素として、正常構造を有する因子に転換される<sup>10)11)</sup>。また、これらの凝固因子が正常機能を有する因子として完成されるためには、ビタミン K の存在が必要なことからビタミン K 依存性凝固因子と称されている。一方、ビタミン K の吸収障害時や、ワーファリンなど

のビタミン K 拮抗物質の投与を受けている状態では、凝固因子の抗原性はほぼ正常に保たれているが、機能的に異常な蛋白質が出現する。これらの異常蛋白質はピブカ (protein induced by vitamin K absence or antagonist, PIVKA) と総称されている。PIVKA にはそれぞれのビタミン K 依存性凝固因子に対応したものが存在しており、プロトロンビンに対応する PIVKA を PIVKA-II と表現し、同様に、PIVKA-VI、PIVKA-K、PIVKA-X、PIVKA-protein C の存在も知られている<sup>12)</sup>。

肝細胞でのプロトロンビンの生成に際しては、まずポリペプチドであるプロトロンビン前駆物質のグルタミン酸残基 (glutamic acid residues, Glu) の  $\gamma$  位の炭素がカルボキシル化を受けて  $\gamma$ -カルボキシルグルタミン酸残基 ( $\gamma$ -carboxy glutamic acid residues, Gla) に転換され、正常プロトロンビンとなる<sup>13)</sup>。この様な Glu のカルボキシル化にはビタミン K が必要で、正常プロトロンビンにはその 1 分子中に 10 個の Gla があり、これらの Gla を介して  $\text{Ca}^{2+}$  との結合能を有することにより、プロトロンビンとしての機能を発揮する。したがって、ビタミン K 欠乏状態や、プロトロンビン合成の場である肝の実質障害などでは Glu から Gla への転換がされ難く、Gla を欠くか、Gla の含量が少ない状態で前駆物質が血中に出現する<sup>14)15)</sup>。PIVKA-II はこの様なカルボキシル化が不十分な異常プロトロンビンの総称である。

以上より、これまで PIVKA-II の測定は乳児ビタミン K 欠乏性出血症の診断、治療の指標として用いられてきた<sup>16)</sup>。一方、Blanchard ら<sup>17)</sup> は、血中 PIVKA-II を RIA 法にて測定し、AH, LC において出現すると報告した。さらに Liebman ら<sup>9)</sup> は、同様の方法を用いて PIVKA-II を測定し HCC の 91% に PIVKA-II の出現を認め、これらの例における PIVKA-II 濃度

は、CH、転移性肝癌に比し、はるかに高濃度であることを報告した。本邦でも藤山ら<sup>16)</sup>は、Motohara ら<sup>16)</sup>が作製したモノクローナル抗体を用いた ELISA 法にて血漿中 PIVKA-II を測定し、HCC の 67% に PIVKA-II の出現を認め、PIVKA-II は HCC の腫瘍マーカーとして有用であるとしている。今回著者が使用した測定系 (E-1023) は、本原らが開発した ELISA の操作性、反応性に検討を加え開発されたものである<sup>7)</sup>。すなわち、ワーファリン長期服用患者の血漿から PIVKA-II を単離し、それを免疫したマウスの脾細胞を培養し、得られた細胞株の中から、正常プロトロンビンは全く交叉せず、しかも PIVKA-II とのみ特異的に反応性を有する抗体産生株を確立し、この抗体を測定系に用いている。

著者の E-1023 を用いた成績では、0.1AU/ml 以上を陽性とする、HCC 96 例中 58 例 (60%) に PIVKA-II 陽性を認め、また、高値例が多くみられた。一方、他疾患では LC 1%, CH 3%, AH 10%, FH 25%, PBC 33%, 他臓器悪性腫瘍 10% に陽性をみたが、いずれも、HCC に比し陽性率は低値であった。奥田ら<sup>18)</sup>も同じ測定系を用い、HCC の 57.7% に PIVKA-II 陽性を認めたが、LC では、検出されなかったとしている。また、松木ら<sup>19)</sup>は HCC 52%, LC 4%, CH 4% の陽性率を得ている。以上より HCC、LC、CH 等の慢性肝疾患に限って見た場合、本法による PIVKA-II 測定系は HCC に対する特異性に優れていると考えられた。

AFP の HCC 特異性と比較してみた場合、正常人の血清 AFP の上限が 10ng/ml であることより、仮に、10ng/ml をカットオフ値とすると、HCC の約 87% に AFP 陽性である一方、LC や CH でもおのおの 40%, 22% と比較的高度な陽性率を認め<sup>20)</sup>、カットオフ値 0.1AU/ml とした PIVKA-II の方がカットオフ値 10ng/ml とした AFP よりも慢性肝疾患中の HCC 特異性が高いと考えられる。また、AFP カットオフ値を HCC に特異性が高いと言われる 400ng/ml に設定すると、HCC の AFP 陽性率は 49% で、LC、CH ではおのおの 3%, 1% と報告されており<sup>20)</sup>、PIVKA-II はカットオフ値 400ng/ml とした AFP の HCC 特異性にはほぼ匹敵するものと考えられた。

HCC を 1 つの腫瘍マーカーのみで血清学的に診断することは現在のところ不可能であり、AFP とそれに対する相関度の低い腫瘍マーカーを組み合わせるにより、診断効率を高める試みがなされている<sup>21)</sup>。著者の経験した症例においては、HCC 96 例中 PIVKA-II 0.1AU/ml 以上の症例は 58 例 (60%) であったのに対し、AFP 400ng/ml 以上の症例は 35 例 (37%) であった。さらに、PIVKA-II 0.1AU/ml 以上あるいは AFP 400ng/ml 以上を示す HCC の割合は 72% であった点より考えると、PIVKA-II と AFP は互いに組み合わせに適した腫瘍マーカーといえる。

HCC の腫瘍径と PIVKA-II 出現に関しては、腫瘍径 3cm 以下で 31%, 3~5cm で 77%, 5cm 以上で 64% に PIVKA-II 陽性を認め、2cm の症例では 1 例のみ陽性例がみられたがその値は 0.11AU/ml と低値陽性であった。したがって、今回の検討では PIVKA-II は最小肝癌での陽性率および感度は低いが、腫瘍径が 3cm を超える HCC の診断能においては優れていると考えられた。

HCC 以外の 19 例で PIVKA-II 陽性例がみられ、なかには 8AU/ml を超す高値例もみられたが、これらの偽陽性例のほと

んどが閉塞性黄疸、PBC などの胆汁うっ滞例、ワーファリン服用患者であった。この理由として、胆汁うっ滞時の十二指腸での胆汁酸不足によるビタミン K の吸収障害や、ワーファリン服用によるビタミン K の作用不足によると考えている。また、胆汁うっ滞時では PIVKA-II と総ビリルビン値とは相関はみられず、高度の黄疸があるにもかかわらず PIVKA-II 陰性例もみられた。このことは、胆汁うっ滞時には、HCC でみられる PIVKA-II と Gla 含量の類似した PIVKA-II がみられ、E-1023 による測定系に反応することもあるが、胆汁うっ滞の程度や十二指腸での胆汁酸量によっては、HCC と Gla 含量の異なる PIVKA-II が出現している可能性があり、この場合には本測定系には反応しないことによると考えている。

HCC における PIVKA-II のビタミン K 感受性についてはこれまで種々推測されてきたが、未だ明らかな結論が得られていないのが現状である。Liebman ら<sup>9)</sup>はビタミン K 10mg を 2 日間静注し 7 日後に PIVKA-II を RIA 法にて測定した結果、ビタミン K 欠乏患者は PIVKA-II の低下をみる一方、HCC 患者においては明らかな変動はみられなかったとしている。Shah ら<sup>22)</sup>は rat の HCC 移植実験から、HCC の PIVKA-II はビタミン K に非感受性であると報告している。

著者は今回、HCC で出現する PIVKA-II と胆汁うっ滞にて出現する PIVKA-II がビタミン K 投与による反応性にて鑑別し得るか否かを検討するため PIVKA-II 陽性の HCC 例と、PIVKA-II 陽性 PBC 黄疸例にビタミン K<sub>2</sub>30mg 7 日間あるいは 28 日間点滴静注した結果、HCC 例、PBC 黄疸例ともに PIVKA-II の低下を認め、7 日間投与例では、その変化率は HCC、PBC、ともほぼ同様であった。また、28 日間投与例では、今回検索しえた症例全例が陰性化を認めた。以上より、ビタミン K<sub>2</sub>30mg 点滴静注時の反応性によって、HCC での PIVKA-II と胆汁うっ滞時の PIVKA-II とを鑑別することは困難であり、ビタミン K<sub>2</sub> 静注時、特に長期投与時の PIVKA-II の評価には注意を要すると考えられた。

Liebman ら<sup>9)</sup>の報告と結果が異なることに関しては、彼らは 10mg 2 日間の投与に対し、著者は 30mg 7 日間あるいは 28 日間と投与総量に差があること、さらに、投与後の PIVKA-II 測定時期が彼らは 7 日後であるのに対し、著者は投与直後であるため、彼らの報告では HCC 患者にビタミン K 投与前後で PIVKA-II に変化はないものの、PIVKA-II がいったん低下した後、さらに再上昇した時点で測定したことによる可能性も考えられる。

以上、HCC の腫瘍マーカーとして PIVKA-II 測定時には、血液生化学検査や画像診断上、あるいは背景因子として、胆汁うっ滞の有無、ワーファリン服用の有無、ビタミン K 投与の有無を調べておく必要があり、これらの影響を除外することにより、PIVKA-II の HCC 特異性がさらに向上すると考えられる。

高感度法を用いた PIVKA-II 微量測定による検討では、健常者のレベルは全例 0.008AU/ml 未満の検出限界以下であった。E-1023 を用いた従来の方法では 0.1AU/ml をカットオフ値としているが、今回このカットオフ値を約 10 倍下回る測定系でも健常人血漿では検出されないという成績から、健常人の PIVKA-II はさらに低いか、血中には存在しない可能性も考えられる。また、本法による PIVKA-II 値が健常人と各種肝疾患群との間ではっきり区別できる成績は AFP や carcinoembr-

ytic antigen (CEA) をはじめとする他の腫瘍マーカーとは大きく異なる点である。

また、HCC を含む諸種疾患全体では、高感度法で測定しカットオフ値を 0.008AU/ml に設定した場合、E-1023 で測定した場合と比較すると、HCC で新たに 5 例に PIVKA-II が検出され、陽性率は 54% から 63% に向上した。一方、CH、AH では陽性率に変化はないものの、LC、PBC、他臓器悪性腫瘍でも各々 4 例、1 例、1 例と新たな陽性例が出現し、高感度法による測定は疑陽性率も高まる傾向がみられるため、一般臨床的には 0.1AU/ml をカットオフとした E-1023 による測定で充分であると思われた。

しかしながら高感度法にて始めて陽性となった HCC 5 例についてみると、5 例中 4 例は AFP が 20ng/ml 以下の低値であったこと、5 例中 1 例が腫瘍径 2cm の小肝癌であったこと、さらにエタノール局注療法に反応し、E-1023 にて PIVKA-II 陰性化後も臨床経過を反映し、微量測定にて PIVKA-II が変動した HCC がみられたこと、手術前後で微量測定による PIVKA-II が変動した HCC がみられたことなどより、高感度法による PIVKA-II 微量測定の有用性がうかがわれる。

一方、高感度法にて閉塞性黄疸あるいは肝内胆汁うっ滞例での陽性例が若干みられた点に関しては、E-1023 による測定で得られた結果と同様に、ビタミン K の吸収障害による PIVKA-II の低値出現の可能性が考えられる。また LC 例で高感度法による陽性例が増加した点に関しては、陽性例は肝予備能不良な黄疸例であったことより、随伴する肝実質障害による PIVKA-II 出現の可能性を考えているが、このことは HCC の腫瘍マーカーとしての問題点が残る。しかしながら閉塞性黄疸や肝内胆汁うっ滞の有無、肝予備能に留意しながら PIVKA-II 微量測定を行うことは、PIVKA-II 低値あるいは低値化した HCC の経過観察、さらには、肝予備能良好といわれる HCC ハイリスクグループでの HCC スクリーニングに利用しうる可能性が推測され、今後、E-1023 による測定と、症例により微量測定の併用が有用と思われた。

TZR-110 は目黒ら<sup>9)</sup>により基礎的検討と臨床応用がなされた PIVKA-II 測定キットである。抗プロトロンビン抗体はプロトロンビンと抗原抗体反応をおこすが、PIVKA-II に対しても同様の反応性を示す。一方、プロトロンビンはバリウム塩に吸着されるが PIVKA-II は吸着されない。TZR-110 はこの点を利用し、抗ヒトプロトロンビン抗体を感作させたラテックス粒子と、プロトロンビンを吸着除去した被検体とのラテックス凝集反応により PIVKA-II を半定量するものである。

著者の TZR-110 を用いた成績では、HCC で比較的高い陽性率が得られたが、E-1023 での測定結果に比し、LC、CH、での陽性率が高くなる傾向がみられ、HCC 診断における特異性は劣ると考えられた。

最後に HCC における血中 PIVKA-II の上昇機序に関してであるが、奥田ら<sup>20)</sup>は各種癌由来細胞株培養上静中の PIVKA-II を測定した結果、ヒト肝癌培養細胞からの PIVKA-II の産生を報告し、その機序として HCC でのプロトロンビン前駆体の産生亢進にともなうビタミン K サイクルおよび、 $\gamma$ -カルボキシル化反応系の不均衡によると推測した。加えて、著者の成績においては、HCC で特異的に高値を示したこと、臨床経過や治療経過を反映し、化学療法にて低下した例や、エタノール局注療法や手術により陰性化した例がみられたことは HCC 自体によ

る PIVKA-II 産生を間接的に推定させる。しかし、これらは HCC の存在が原因となって、二次的に非癌肝細胞の PIVKA-II 産生が増加する可能性を完全に否定するものではなく、今後の検討を要するものと思われた。さらに、今回の検討では高感度法による PIVKA-II 微量測定にて、HCC および肝予備能不良な LC で PIVKA-II が検出されたことより、これまでの測定法で血中 PIVKA-II には反映されなくても組織レベルでは HCC や LC 組織で PIVKA-II の産生が亢進している症例も存在することが考えられ、これらの生検組織を用い PIVKA-II の存在を免疫組織学的に検討する必要がある。南野<sup>20)</sup>は HCC の吸引肝生検組織を用い組織 PIVKA-II 染色を行った結果、細小肝癌 23 例では E-1023 による血中 PIVKA-II 陽性は 1 例であったが、組織 PIVKA-II 染色陽性は 9 例みられたと報告している。この様に血中 PIVKA-II 陰性ながら組織 PIVKA-II 染色陽性例がみられることは、少なくとも、HCC 組織にて産生される PIVKA-II が存在すること、さらには、著者が行った PIVKA-II 微量測定にて始めて診断される HCC が存在しうることを組織学的に支持しているものと思われる。

## 結 論

健常人および HCC を含む各種肝疾患患者、他の悪性腫瘍患者にて、E-1023、高感度法、ラテックス凝集法の 3 法を用い、血漿中 PIVKA-II を測定し以下の結果を得た。

1. E-1023 による測定では 0.1AU/ml をカットオフとすると、健常人全例が陰性で、HCC において各種慢性肝疾患、他の悪性腫瘍に比しより高率に陽性を認め、より高値を示した。
  2. HCC では、AFP 値と PIVKA-II 値 (E-1023) とは明らかな相関を認めず、AFP 低値の例でも高率に PIVKA-II 陽性を示した。さらに両者併用により HCC の診断率が向上した。
  3. 閉塞性黄疸や肝内胆汁うっ滞のみみられる症例ではビタミン K の吸収障害が原因と考えられる PIVKA-II 上昇例がみられた。又、ビタミン K<sub>2</sub> 静注により HCC 例、胆汁うっ滞例ともに PIVKA-II の低下がみられた。
  4. 高感度法による微量測定では、健常人全例が 0.008AU/ml 未満の低値を示し、E-1023 に比し、HCC での陽性率が高まり、AFP 低値例や小肝癌を含めた新たな陽性例がみられたが、胆汁うっ滞例や肝予備能不良な肝硬変例での陽性例も増加した。
  5. 高感度法による測定では、E-1023 にて判定不能な HCC の臨床経過を反映した症例もみられた。
  6. ラテックス凝集法による測定では、E-1023 での測定結果に比し、LC や CH での陽性率が高くなる傾向がみられた。
- 以上の結果から、E-1023 による PIVKA-II 測定は、胆汁うっ滞の有無、ビタミン K 投与の有無に留意する必要があるが、HCC の腫瘍マーカーとして有用であり、さらに、高感度法による微量測定の併用は、肝予備能を考慮する必要はあるが、PIVKA-II 低値の HCC の診断や臨床経過観察に有用性が増すものと考えられた。また、ラテックス凝集法による測定では、E-1023 での測定に比し、HCC 診断における特異性は劣ると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を賜りました溝浦雅

志講師に心から感謝致します。併せて、本研究遂行に多大の御協力を戴きました金沢大学第一内科第二研究室の諸先生方に深く感謝致します。  
なお、本論文の要旨は、第74回日本消化器病学会総会(1988年、仙台)において発表した。

## 文 献

- 1) Olson, J. P., Miller, L. L. & Troup, S. B.: Synthesis of clotting factors by the isolated perfused rat liver. *J. Clin. Invest.*, **45**, 690-701 (1966).
- 2) Stenflo, J., Ferunlund, P., Egan, W. & Roepstorff, P.: Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71**, 2730-2733 (1974).
- 3) Nelsestuen, G. L., Zytokovicz, T. H. & Howard, J. B.: The mode of action of vitamin K: identification of  $\gamma$ -carboxy glutamic acid as a component of prothrombin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 6347-6350 (1974).
- 4) Sperling, R., Furie, B. C., Blumenstein, M., Keyt, B. & Furie, B.: Metal binding properties of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid: implications for the vitamin K-dependent blood coagulation proteins. *J. Biol. Chem.*, **253**, 3898-3906 (1978).
- 5) Liebman, H. A., Furie, B. C., Tong, M. J., Blanchard, R. A., Lo, K.-J., Lee, S.-D., Coleman, M. S. & Furie, B.: Des- $\gamma$ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **310**, 1427-1431 (1984).
- 6) 藤山重俊, 森下愛文, 坂口 治, 赤星玄夫, 白奥博文, 相良勝郎, 佐藤辰男, 本原邦彦, 松田一郎: モノクローナル抗体を用いて測定した異常プロトロンビン (PIVKA-II) の肝細胞癌における臨床的検討. *医学のあゆみ*, **134**, 1107-1109 (1985).
- 7) 榎木 徹, 渡辺啓裕, 下水流保範, 難波裕三郎, 守本富昭, 本原邦彦, 松田一郎: モノクローナル抗体とポリクローナル抗体とを用いたサンドイッチ EIA (Enzyme Immunoassay) 法による PIVKA-II 測定試薬キットの開発と測定条件の検討. *臨床免疫*, **18**, 479-492 (1986).
- 8) 目黒 崇, 宮地良和, 山田兼雄: 異常プロトロンビン (PIVKA-II) の検出の簡易法の試みと臨床応用での検討. *血管と脈管*, **13**, 211-214 (1982).
- 9) 山田兼雄, 目黒 崇, 宮地良和: 多施設における PIVKAL テストによる PIVKA-II の測定成績. *診療と新薬*, **22**, 1408-1414 (1985).
- 10) Fair, D. S. & Marljar, R. A.: Biosynthesis and secretion of Factor VII, protein C, protein S, and protein C inhibitor from a human hepatoma cell line. *Blood*, **67**, 64-70 (1986).
- 11) Deyashiki, Y., Nishioka, Y., Takahashi, K., Kosaka, Y. & Suzuki, K.: Evaluation of des- $\gamma$ -carboxy prothrombin as a marker protein of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **64**, 2546-2551 (1989).
- 12) Yoshikawa, Y., Sakata, Y., Toda, G. & Oka, H.: The acquired vitamin K-dependent  $\gamma$ -carboxylation deficiency in hepatocellular carcinoma involves not only prothrombin, but also protein C. *Hepatology*, **3**, 524-530 (1988).
- 13) Olson, R. E.: The function and metabolism of vitamin K. *Annu. Rev. Nutr.*, **4**, 282-302 (1984).
- 14) Suttie, J. W.: Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 459-477 (1985).
- 15) Ono, M., Ohta, H., Ohhira, M., Sekiya, C. & Namiki, M.: Measurement of immunoreactive prothrombin precursor and vitamin-K-dependent gamma-carboxylation in human hepatocellular carcinoma tissues: Decreased carboxylation of prothrombin precursor as a cause of des-gamma-carboxyprothrombin synthesis. *Tumor Biol.*, **11**, 319-326 (1990).
- 16) Motohara, K., Kuroki, Y., Kan, H., Endo, F. & Matsuda, I.: Detection of vitamin K deficiency by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for circulating abnormal prothrombin. *Pediatr. Res.*, **19**, 354-357 (1985).
- 17) Blanchard, R. A., Furie, B. C., Jorgensen, M., Kruger, S. F. & Furie, B.: Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 242-248 (1981).
- 18) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 橋本悦子, 小幡 裕: 肝細胞癌における異常プロトロンビン PIVKA-II の産生に関する臨床的および実験的研究. *肝臓*, **27**, 1697-1702 (1986).
- 19) 松木康彦, 三田村圭三, 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*, **28**, 1073-1078 (1987).
- 20) Sawabu, N. & Hattori, N.: Serological tumor markers in hepatocellular carcinoma, *In* K. Okuka(ed.), *Neoplasmas of the Liver*, 1st ed., p227-233, Springer-Verlag, New York, 1987.
- 21) 小黒 仁, 青柳 豊, 斉藤 敦, 五十嵐健太郎, 鈴木康史, 上村朝輝, 朝倉 均: 肝細胞癌診断における AFP, PIVKA-II, シアリル Le<sup>x</sup>-i 抗原 (SLX), CA-50, および Dupan-2 の臨床的意義. *肝臓*, **30**, 1589-1595 (1989).
- 22) Shah, D. V., Engelke, J. A. & Suttie, J. W.: Abnormal prothrombin in the plasma of rats carrying hepatic tumors. *Blood*, **69**, 850-854 (1987).
- 23) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 古川みどり, 小幡 裕: 肝細胞癌における異常プロトロンビン PIVKA-II の産生に関する検討. *肝臓*, **29**, 47-51 (1988).
- 24) 南野隆一: 肝細胞癌における PIVKA-II の免疫組織化学的検討. *肝臓*, **32**, 775-781 (1991).

**Evaluation of a Plasma PIVKA-II Assay Including Microestimation in Hepatocellular Carcinoma** Ryoyo Ohmizo, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **101**, 536—546 (1992)

**Key words** hepatocellular carcinoma, PIVKA-II, ELISA method, high sensitive method, latex agglutination method

#### **Abstract**

Plasma levels of abnormal prothrombin, defined as a protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-II), were measured in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and other conditions. Three methods of measurement were used: enzyme-linked immunosorbent assay (E-1023), a high sensitive method using an Avidin-Biotin system, and latex agglutination. Using E-1023, 58 of 96 (60%) patients with HCC had a level  $\geq 0.1$  AU/ml, whereas the positivity rate was very low in patients with liver cirrhosis (1%) and chronic hepatitis (3%), and zero in normal controls. There was no significant correlation between PIVKA-II and  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) levels, and 69 of 96 (72%) patients with HCC showed positive results when these proteins were measured in combination. In patients with HCC, vitamin K<sub>2</sub> injection induced a reduction in the PIVKA-II level, as it does in patients with cholestasis. By the high sensitive method, all normal controls showed values below the cut-off level, 0.008 AU/ml, while 33 of 52 (63%) patients with HCC were positive. Compared with the results obtained by E-1023, the positivity rate of PIVKA-II in patients with HCC increased, and a patient with small HCC was positive for PIVKA-II when the high sensitive method was used. Although the positivity rate in patients with cholestasis or liver cirrhosis was also higher, the high sensitive method was useful in evaluating the clinical course in some patients. By the latex agglutination method, 21 of 37 (56%) patients with HCC had a level  $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ , but the positivity rate was higher than the results by E-1023 in patients with liver cirrhosis or chronic hepatitis. In conclusion, PIVKA-II measured by E-1023 in combination with the high sensitive method seems to be useful as a tumor marker of HCC. Specificity for diagnosis of HCC by the latex agglutination method was considered to be lower than that by E-1023.