

혈청 PIVKA-II 측정을 위한 개선된 효소면역측정법의 효용성 평가

Evaluation of a Modified Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Serum PIVKA-II Measurement

박창훈 · 서지영 · 김소영 · 제갈태영 · 강은숙

Chang-Hun Park, M.D., Ja-Young Seo, M.D., So Young Kim, M.T., Tae Young Jeagal, M.T., Eun-Suk Kang, M.D.

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine & Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: The serum des-gamma-carboxyprothrombin (protein induced by vitamin K antagonist-II, PIVKA-II) is a useful tumor marker in addition to alpha-fetoprotein for diagnosing primary hepatocellular carcinoma (HCC). In this study, we evaluated the laboratory performance of a modified ELISA method for PIVKA-II measurement adopting an automated ELISA processor in comparison with conventional manual method and investigated its diagnostic performance in patients with HCC.

Methods: The laboratory performance of modified ELISA using PIVKA-II ELISA kit (Sanko Junyaku Co., Japan) was evaluated using control materials (10, 25, 500, 1,000 mAU/mL) and 208 patient samples according to the CLSI guidelines. In 93 HCC patients and 88 disease controls (30 chronic hepatitis and 58 liver cirrhosis), ROC curve, sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were analyzed.

Results: Total and within-run CVs for middle, high and very high level samples were less than 10%, while those of low level samples were over 10% (12.6% and 11.7%, respectively). The modified ELISA showed an excellent linearity ($r > 0.99$) and low carryover rate (-0.14%). Although the correlation between the conventional and modified ELISAs was excellent ($r = 0.982$), there was a proportional deviation of PIVKA-II levels (y intercept: 0.621). With a cut-off of 30 mAU/mL, the sensitivity and specificity of PIVKA-II for the diagnosis of HCC were 58% and 92%, respectively.

Conclusions: PIVKA-II measurement by modified ELISA using an automated ELISA processor can improve the efficiency of laboratory in terms of turnaround time and labor intensiveness while maintaining reasonable sensitivity and specificity for the diagnosis of HCC.

Key Words: PIVKA-II, Alpha-fetoprotein, Immunoassay, Hepatocellular carcinoma

서 론

간세포암(hepatocellular carcinoma)은 한국인에서 발생하는 악성종양 중에서 남성에서는 네 번째로, 여성에서는 다섯 번째로 빈

도가 높으며, 예후가 불량한 암의 하나로 완전한 제거를 위해 수술 치료를 필요로 하는 질환이다. 미국의 경우 간세포암 환자의 10-20%만이 진단 시 완전한 수술적인 제거가 가능한 것으로 알려져 있다[1-3]. 따라서 간세포암의 발생빈도가 높은 위험인자를 가진 환자에서의 조기진단이 임상적으로 중요하다. 초음파촬영, 전산화단층촬영 및 자기공명영상과 같은 영상진단법이 간세포암의 검출에 유용하지만[4, 5], 결절성 간경변증에서 작은 크기의 종양은 검출이 매우 어려울 뿐 아니라 진단 비용도 많이 든다[4, 6]. 알파태아단백(alpha-fetoprotein, AFP)은 영상검사와 더불어 간암의 진단에 가장 널리 이용되어 온 혈청표지자이다. 그러나 기존의 보고들에서 예민도가 약 50-60%에 불과하며 종양의 크기가 작은 경우에는 더 낮은 것으로 알려져 있다[7]. 그리고 알코올간염, 바이러스간염 및 간경변과 같은 양성 간질환에서도 증가되어 특이도 역시 약 40-50%로 보고되어 조기 검출의 지표로 사용하기에는 한계가 있다 [7]. Protein induced by vitamin K absence or antagonist-II (PIVKA-

Corresponding author: Eun-Suk Kang, M.D.

Department of Laboratory Medicine & Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 50 Irwon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea

Tel: +82-2-3410-2703, Fax: +82-2-3410-2719, E-mail: eskang@skku.edu

Received: October 11, 2010

Revision received: June 20, 2011

Accepted: September 28, 2011

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2012, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ID)라고도 알려져 있는 des-gamma-carboxyprothrombin은 AFP와 더불어 간세포암의 조기진단을 위한 유용한 혈청표지자로 이용되어 왔다[8, 9]. PIVKA-II는 프로트롬빈의 비정상적인 합성 과정에서 생성되는 물질로, 정상적으로는 간에서 프로트롬빈 전구물질의 아미노산 말단(amino terminal)에 10개의 glutamic acid (Glu)가 비타민 K 의존 carboxylase에 의해 γ -carboxyglutamic acid (Gla)로 변환되는 과정을 통해 생성되나[10] 비타민 K 결핍이 있는 경우에는 10개의 Glu의 전부 또는 일부가 Gla로 변환되지 못하고 이상프로트롬빈이 혈액으로 분비될 수 있는데 이것을 PIVKA-II 라고 한다[11, 12]. 특히 간문맥을 침범하여 진행된 경우 대부분의 환자에서 PIVKA-II가 증가됨이 보고되어[13, 14] 빠르게 진행하거나 나쁜 예후를 나타내는 표지자로도 유용함이 제시되었다[15]. 그 이후 PIVKA-II는 간세포암 환자의 혈청표지자로 주목을 받아 왔으며 [12, 16] 초기 방사선동위원소 면역검사법이나 기존의 다클론항체를 사용한 효소면역측정법에 비해 단클론항체를 이용하여 민감도와 특이도를 높인 효소면역측정법으로 PIVKA-II를 측정하게 됨으로써 간세포암 검출에 더욱 유용하게 적용할 수 있음이 보고되었다[17].

최근까지 본원에서는 PIVKA-II를 ELISA 원리를 이용한 수기면역측정법(이하 수기법)으로 측정해 왔다. 일반적인 진단용 ELISA법과는 달리 PIVKA-II 측정 시에는 예민도를 높이기 위해 혈청과 항체 간 반응시간이 최소 24시간 소요되며 이후 과정을 포함하여 전체 검사시간은 약 48시간이 소요되었다. 또한 검사간 재현성을 위해 검사자의 숙련도가 필요할 뿐 아니라 검사 과정에 인력 소모가 많아 증가하는 검사건수에 대한 검사의 효율성에 문제가 제기되었다. 최근에는 시약제조사인 Sanko Junyaku사에서 동일한 조성의 시약을 사용하면서 반응시간 및 온도와 같은 검사조건을 변경하고 교반(shaking) 조건을 추가하여 자동효소면역분석기(EP-ONE, Sanko Junyaku Co., Tokyo, Japan)에서 단시간에 측정이 가능하도록 고안된 개선된 효소면역측정법(이하 자동분석법)을 제시하였다. 그러나 두 방법 간 수행능이나 검사값을 비교한 연구는 없어 저자들은 자동분석법을 이용한 PIVKA-II 검사를 임상에 적용하기에 앞서 변경된 검사조건에 수행능력과 기존 수기법과의 상관성을 평가하였으며, 임상검체를 대상으로 새로이 도출한 판정기준치(cut-off)를 적용하여 AFP와 함께 측정된 결과가 간세포암의 진단에 유용함을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 검체

2008년 12월부터 2개월 동안 PIVKA-II가 의뢰된 208개의 환자 검체와 농도별 표준항원 대조물질(10, 25, 500, and 2,000 mAU/

mL)을 이용하여 자동분석법의 수행능을 평가하였으며, 본원에서 2009년 3월부터 9월까지 임상적 및 병리학적으로 새로이 진단된 간세포암 환자 93명과, 질환대조군으로는 치료를 받은 적이 없는 간경변증으로 진단된 58명과 만성 B 혹은 C형 간염 및 보균자 30명을 대상으로 간세포암 진단에서의 유용성을 평가하였다. 간세포암, 간경변증 그리고 간염 환자의 성비(M:F)는 각각 1:0.1, 1:0.5, 1:0.6이었고($P=0.012$, Chi-square), 나이는 각각 29-80세(중간값 55세), 37-85세(중간값 53세), 31-74세(중간값 51세)이었다($P=0.540$, T-test). 간세포암의 종양이 단발성인 환자는 60예(64.5%), 다발성인 환자는 33예(35.5%)이었다. 단발성 종양의 장경은 3 cm 미만이 24예(40.0%)이었고, 3 cm 이상이 36예(60.0%)이었다.

2. 방법

간동맥 화학색전술 실시 전에 혈액을 채취하여 혈청을 즉시 분리하고 검사 실시 전까지 영하 70°C로 보존하였다가 해동하여 측정하거나 또는 즉시 측정하였다. 혈청 AFP는 화학발광면역법(AD-VIA® Centaur AFP assay, Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA)으로 측정하였다. PIVKA-II는 수기법과 교반기능이 포함된 자동효소면역분석기를 이용한 자동분석법으로 시행하였다. 두 방법에서 동일하게 단클론항체를 포함한 ELISA 키트(Hai-catch PIVKA-II, Sanko Junyaku Co.)를 사용하였다. 검사는 모두 제조회사의 지침대로 시행되었다.

1) 수기법

(1) 항 PIVKA II 단클론항체가 부착된 컵에 반응용해액(정상 토끼 혈청 10%가 포함된 0.05 mol/L tris-aminomethane buffer)과 각 농도의 표준항원액(decarboxylated prothrombin), 음성대조 검체 희석액(0.1 w/v% bovin albumin solution) 그리고 환자 검체를 각각 분주한다.

(2) 밀봉 후 wet chamber에 넣고 2-10°C에서 16-24시간 반응시킨다.

(3) 세정액(0.01% polyoxyethylene-sorbitan monolaurate)으로 3회 세척 후, 효소표지항체(horseradish peroxidase conjugated anti-human prothrombin antibody) 분주 후 실온에서 다시 1시간 반응시킨다.

(4) 다시 3회 세척 후 기질액(Oxydol)을 분주하고 10분 배양 후 500과 2,000 mAU/mL 표준항원액, 음성대조 검체희석액 그리고 검체 반응컵의 흡광도를 405 nm에서 측정한다.

(5) 계속 배양을 시행하여 기질액 주입 후 60분 되었을 때 반응정지액(2 mmol/L sodium azide)을 분주하고 10, 25, 500 mAU/mL 표준항원액, 음성대조 검체희석액 그리고 검체 반응컵의 흡광도를 405 nm에서 재차 측정한다.

(6) (4)과정을 통해 측정된 표준항원액(500, 2,000 mAU/mL)의 흡

광도에서 검체희석액의 흡광도를 뺀 값으로 표준곡선을 작성한다.

(7) (5)과정을 통해 측정된 표준항원액(10, 25, 500 mAU/mL)의 흡광도에서 검체희석액의 흡광도를 뺀 값으로 표준곡선을 작성한다.

(8) 501 mAU/mL 이상 2,000 mAU/mL 이하의 검체에 대해서는 (6)과정에서 작성된 표준곡선을 사용하고 10 mAU/mL 이상 500 mAU/mL 이하의 범위에 속한 검체에 대해서는 (7)과정에서 작성된 표준 곡선을 사용하여 검체의 농도를 산정한다.

2) 자동분석법

수기법과 동일한 ELISA kit 및 시약을 사용하였다. 검사의 전체 단계는 수기법과 유사하나 자동분석법에서는 표준항원액 2,000 mAU/mL를 사용하지 않고 희석하여 1,000 mAU/mL를 사용한다. (2)과정에서 570 rpm의 속도로 15분간 그리고 다시 360 rpm으로 15분간 교반하여 반응시킨다. (3)과정에서는 40분간 반응시킨다. (4)과정에서 흡광도를 측정하지 않고 (5)과정에서 모든 표준항원액과 검체희석액 그리고 검체의 흡광도를 측정한다. 전 과정이 3시간 이내에 종료되고 자동효소면역분석기에서 자동으로 진행된다.

3) 정밀도

임의로 정의한 저농도(40 mAU/mL 미만), 중간농도(40-90 mAU/mL), 고농도(90-499 mAU/mL), 극고농도(500 mAU/mL 이상)에 해당하는 혼합 혈청(pooled serum)을 대상으로 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline EP5-A2를 참고하여[18] 각 농도군에 대해 10일 동안 1일 2회, 각 회당 2번씩 반복 측정하여 검사차례내 변이계수(within-run CV)와 총 변이계수(total CV)를 구하였다.

4) 직선성

CLSI guideline EP6-A를 참고하여[19] 2,000 mAU/mL 표준항원액을 검체희석액으로 1:2로 희석하여 고농도(1,000 mAU/mL)의 물질을 조제하여 사용하였다. 희석액과 고농도의 물질을 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4의 비율로 검체 혼합하였고, 각각 제조된 농도물질을 4회씩 반복 측정하여 직선성을 평가하였다.

5) 검체 간 상호오염도

고농도(965 mAU/mL, 751 mAU/mL, 563 mAU/mL)와 저농도(35 mAU/mL, 31 mAU/mL, 29 mAU/mL)로 제조한 혼합혈청을 이용하여 검체 간 상호오염도(carryover)를 평가하였다. CLSI guideline EP10-A2에 따라 고농도 검체 4회 연속 측정 후 저농도 검체를 4회 연속 측정하고 검체 간 상호오염도를 다음 식에 의하여 구하였다.

$$\text{Carryover (\%)} = \frac{L1 - (L3+L4)/2}{(H3+H2)/2 - (L3+L4)/2} \times 100$$

6) 방법 간 비교

저농도(17-38 mAU/mL) 52검체, 중간농도(40-89 mAU/mL) 24검체, 고농도(102-468 mAU/mL) 22검체 그리고, 극고농도(512-726 mAU/mL) 6검체를 대상으로 CLSI guideline EP9-A2를 참고하여 [20] 시행하였다. 검사는 수기법의 결과를 바탕으로 농도별 검체군을 분류한 뒤 자동분석법으로 5일 이상에 걸쳐 시행하였다.

7) AFP와 PIVKA-II의 간세포암 진단을 위한 한계점(cut-off) 평가

질환 대조군으로 간염과 간경변증으로 진단된 환자를 대상으로 간세포암 환자에 대한 Receiver operating characteristic (ROC) 곡선 분석을 시행하였다. CLSI guideline GP10-A를 참고하여[21] ROC 곡선을 분석하였고 곡선 아래 영역(the area under the curve, AUC)과 95% 신뢰구간(confidence interval, CI)을 확인하였다. AFP와 PIVKA-II의 조합은 로그 변환 후 로지스틱 회귀모형을 이용하여 ROC 곡선 분석을 시행하였다. 적절한 민감도와 특이도를 고려하여 AFP와 PIVKA-II의 간경변증과 간세포암을 감별하기 위한 한계점을 확인하였고 이를 바탕으로 AFP와 PIVKA-II 조합 시 민감도와 특이도를 평가하였다.

8) 통계학적 분석

PIVKA-II의 직선성과 상관성은 Pearson 상관성검사, 선형회귀모델 그리고 Bland-Altman plot을 이용하였다. 혈청표지자의 진단 및 임상적 특성에 따른 측정치 간의 평균은 Shapiro-Wilk의 정규성검정과 Levene의 등분산검정을 시행하고 결과에 따라 독립 표본 T검정(Independent samples T-test) 혹은 Mann-Whitney U 검정, Kruskal-Wallis 검정으로 평가하였다. 유의수준은 0.05 미만으로 정하였다. 분석통계프로그램은 윈도우용 PASW Statistics 17.0과 Medcalc® version 11.5.1.0을 사용하였다. ROC 곡선 분석과 민감도, 특이도, 양성예측도(positive predictive value, PPV), 음성예측도(negative predictive value, NPV)는 분석통계프로그램 R 2.10.1을 사용하였다.

결 과

1. 정밀도

환자 검체군을 이용한 PIVKA-II의 검사차례 내 변이계수는 저농도군을 제외한 항목들에서는 모두 10% 이내의 결과를 보였다. 각 농도군에서 검사차례 내 변이계수와 총 변이계수는 저농도군에서 12.6%와 11.7%, 중간농도군에서 7.1%와 6.9%, 고농도군에서 6.8%와 7.1%, 극고농도군에서 6.7%와 6.6%이었다(Table 1).

Table 1. Precision of serum PIVKA-II measurement by modified ELISA method

	Low	Middle	High	Very high
Mean (mAU/mL)	18	38	202	751
SD (mAU/mL)	2	3	14	50
Within CV (%)	12.6	7.1	6.8	6.7
Total CV (%)	11.7	6.9	7.1	6.6

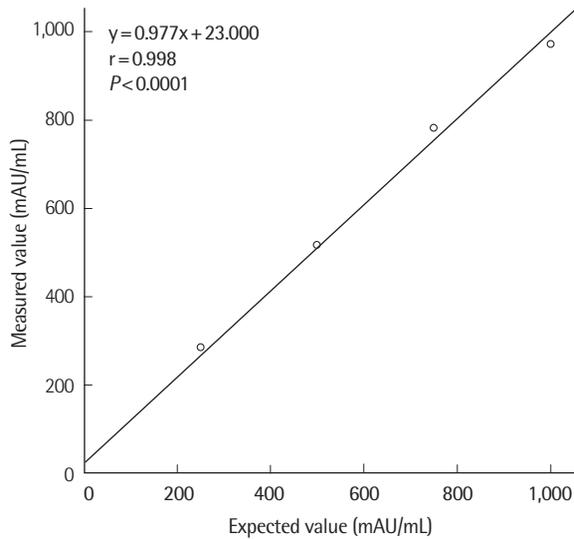


Fig. 1. Linearity of PIVKA-II measurement by modified ELISA method.

2. 직선성

검체희석액과 고농도의 정도관리물질을 일정한 비율로 희석하여 측정된 결과의 선형회귀모델은 Fig. 1과 같았고 $y = 0.977x + 23.000$ 수식을 만족하는 상관계수(r)는 0.998로 우수한 직선성을 보였다 ($P < 0.0001$).

3. 검체 간 상호오염도

고농도와 저농도의 혼합혈청을 이용하여 반복 측정된 결과는 H1, H2, H3, H4가 각각 772 mAU/mL, 735 mAU/mL, 735 mAU/mL, 718 mAU/mL이었고, L1, L2, L3, L4가 각각 32 mAU/mL, 31 mAU/mL, 33 mAU/mL, 33 mAU/mL였으며, 계산식에 의한 검체 간 상호오염도는 -0.14%였다.

4. 수기법 및 자동분석법 간 비교

저농도, 중간농도, 고농도, 극고농도 검체가 50%, 23%, 21%, 6%로 분포하는 104개의 검체로 수기법과 변경된 자동분석법 간의 상관성을 평가한 결과, 선형회귀모델은 Fig. 2와 같았으며 $y = 0.621x + 8.283$ 수식을 만족하는 상관계수(r)는 0.982로 우수한 직선성을 보였다 ($P < 0.0001$). 하지만 수기법에 비해 자동분석법을 이용한 측정치는 낮은 소견을 보여주었다($y = 0.621x + 8.283$) (Fig. 3).

Table 2. Levels of AFP and PIVKA-II in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma patient groups

	LC (N=58)			HCC (N=93)		
	Mean*	SD	Median	Mean*	SD	Median
AFP (ng/mL)	36.2	91.3	7.7	8,188.6	32,720.7	32.2
PIVKA-II (mAU/mL)	20	14	17	164	304	32

*The mean level of AFP and PIVKA-II between patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma was significantly different ($P = 0.018$, $P < 0.0001$, Independent T-test).

Abbreviations: LC, liver cirrhosis; HCC, hepatocellular carcinoma.

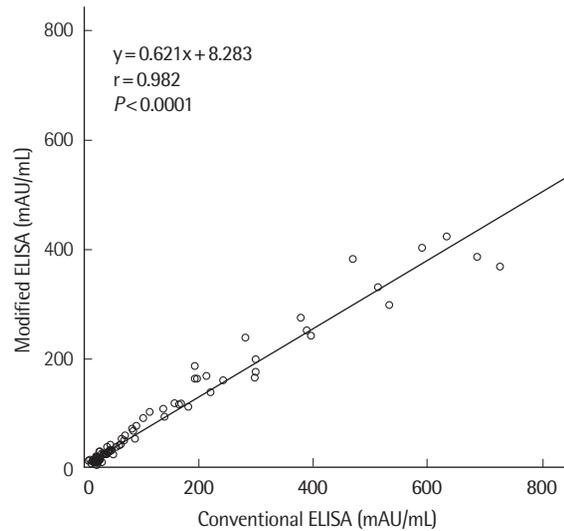


Fig. 2. Comparison of the PIVKA-II value between conventional and modified ELISA methods.

5. 간세포암 진단의 유용성 평가

AFP 중간값은 간염 환자군에서 2.9 ng/mL (범위 1.3-43.3 ng/mL), 간경변증 환자군에서 7.7 ng/mL (1.31-570.0 ng/mL), 간세포암 환자군에서 32.2 ng/mL (1.6-200,000.0 ng/mL)이었다. 혈청 PIVKA-II 중간값은 간염, 간경변증과 간세포암 환자군에서 각각 20 mAU/mL (범위 12-35 mAU/mL), 17 mAU/mL (3-92 mAU/mL)와 32 mAU/mL (7-1,200 mAU/mL)이었다(Table 2). 단일 종괴를 가진 간세포암 환자에서 종괴의 크기에 따라 세 군(3 cm 미만, 3-5 cm, 5 cm 이상)으로 분류하여 각 크기에 따른 두 검사값의 유의성을 비교해 보았다. 각 군 간 비교 시 PIVKA-II 값은 간경변증과 각 간세포암군 간 통계적으로 유의한 차를 보였으며($P = 0.038$), 간세포암군 내에서는 3 cm 미만과 5 cm 이상군 간 유의한 차가 관찰되었으나($P = 0.023$) 종양 크기에 따른 단계적 군 간 비교에서는 통계적으로 유의한 차를 보이지 않았다(Fig. 4A). 그러나 종괴 크기에 따라 나눈 세 군을 동시에 비교 시 통계적으로 유의한 차를 보였다($P = 0.020$, Kruskal-Wallis 검정) (Table 3). 반면 AFP는 각 군 간 비교 시 간경변증과 간세포암군 내에서는 3 cm 미만, 3-5 cm 군 간 유의한 증가를 보이지 않았으며(Fig. 4B), 전체 군 비교 시에도 종양 크기에 따

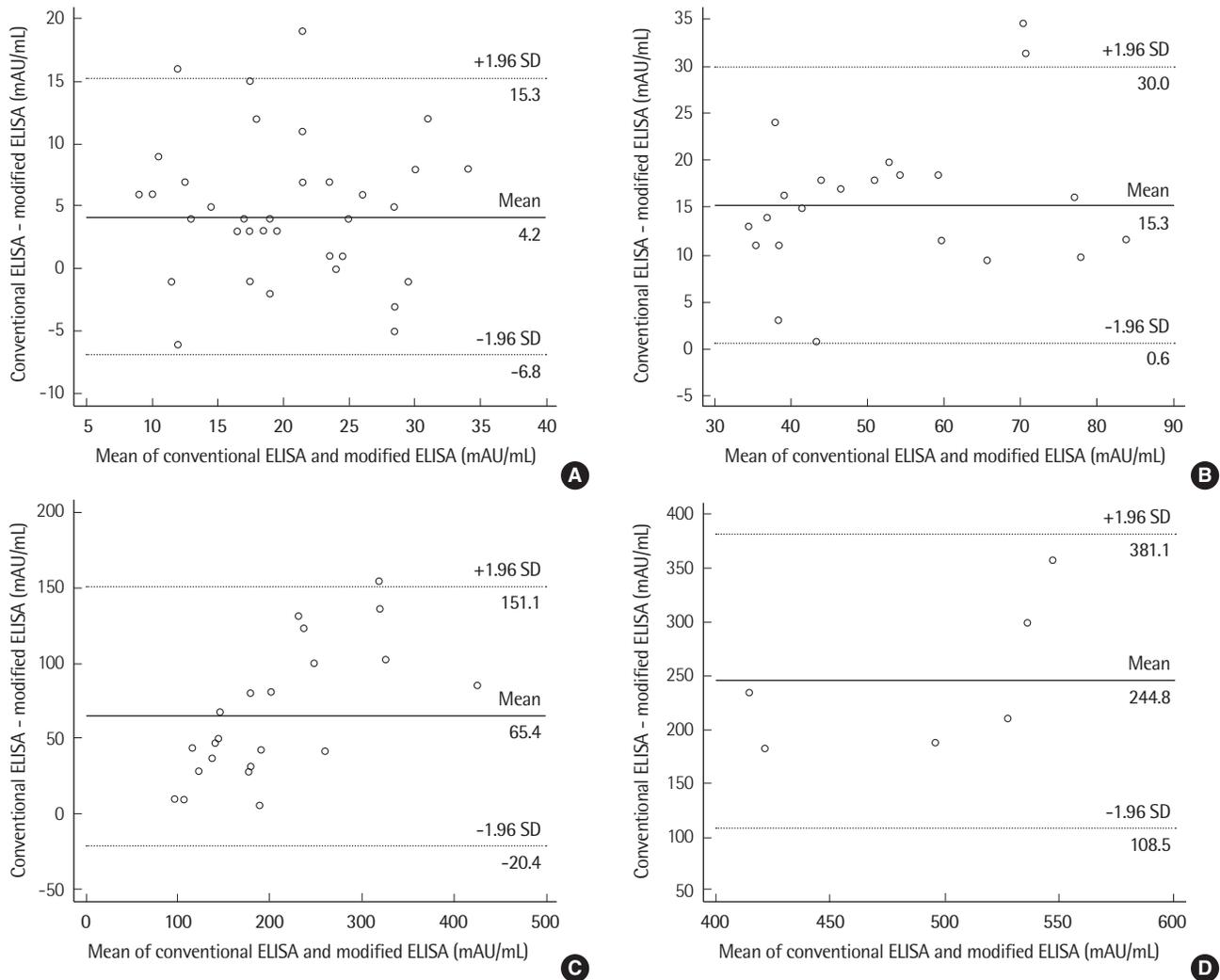


Fig. 3. Bland-Altman plots of low group (A), middle group (B), high group (C), very high group (D) of serum PIVKA-II between conventional and modified ELISA methods.

른 유의한 차이가 없었다($P=0.106$, Kruskal-Wallis 검정) (Table 3). 단일종괴와 다수종괴의 존재에 따른 PIVKA-II 값의 분포는 유의한 차이가 없었다(결과 미제시).

혈청 AFP와 PIVKA-II에 대한 ROC 분석 결과에서 AUC는 각각 0.757 (95%CI 0.692-0.823)과, 0.801 (95%CI 0.731-0.860)이었다. AFP와 PIVKA-II의 합시 곡선 아래 영역은 0.854 (95%CI 0.799-0.908)이었다(Fig. 5). 이를 근거로 현재 널리 알려진 진단기준치인 AFP 20.0 mAU/mL와 PIVKA-II 40 mAU/mL을 포함하여 PIVKA-II 값의 단계적 변화에 따른 단독 및 두 검사를 동시 적용한 경우의 진단적 민감도, 특이도, PPV, NPV를 도출하였으며 이를 Table 4에 정리하였다.

고찰

현재 간세포암의 조기 검출을 위한 혈청표지자의 발견 및 평가

Table 3. Serum levels of biomarkers according to the size of hepatocellular carcinoma

		LC	<3 cm*	3-5 cm*	>5 cm*	P value [†]
		(N=58)	(N=45)	(N=21)	(N=27)	
AFP (ng/mL)	Mean	36.2	87.2	385.0	37,551.0	0.106
	SD	91.3	123.2	1,116.5	70,325.1	
	Median	7.7	32.2	20.8	113.0	
PIVKA-II (mAU/mL)	Mean	20	69	183	238	0.020
	SD	14	116	319	393	
	Median	17	25	39	550	

*Size of solitary nodule in hepatocellular carcinoma was indicated. If there were multiple nodules, the size of the largest nodule was indicated; [†]Statistical significance based on Kruskal-Wallis test was defined, if P value was <0.05. Abbreviation: LC, liver cirrhosis.

는 계속되고 있다. 혈청표지자로서 가장 이상적인 것은 간경변증과 같은 전암성 질환과 달리 간세포암에서만 증가되는 것이다. 이

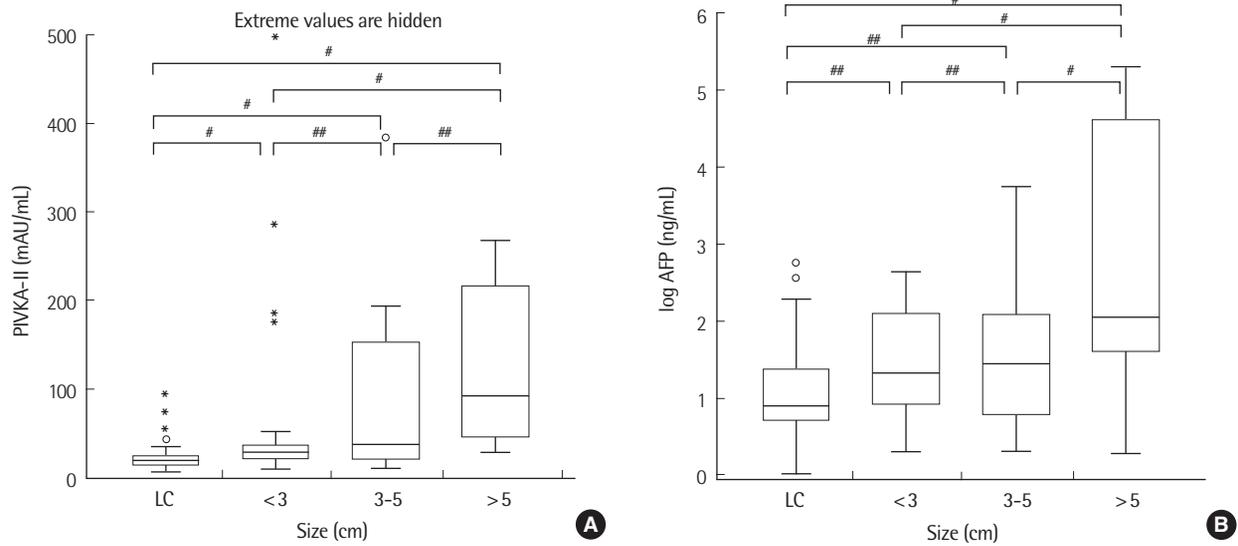


Fig. 4. Box plots comparing serum levels of biomarkers according to the size of HCC. For AFP, the log data are presented in order to accommodate the wide range. The box refers to the 25th and 75th percentile values with a line indicating the median levels, whereas the interquartile range extends outside the box. The mean of three groups, according to different size of tumor, is significantly different for PIVKA-II ($P=0.020$, Kruskal-Wallis test) (A) but not for AFP ($P=0.106$, Kruskal-Wallis test) (B). Statistical significance between two different groups are indicated with symbols (# if $P<0.05$, ## if $P\geq 0.05$, Independent T test or Mann-Whitney U test). Data (box plots); Mild outliers (circles); Extreme outliers (asterisk).

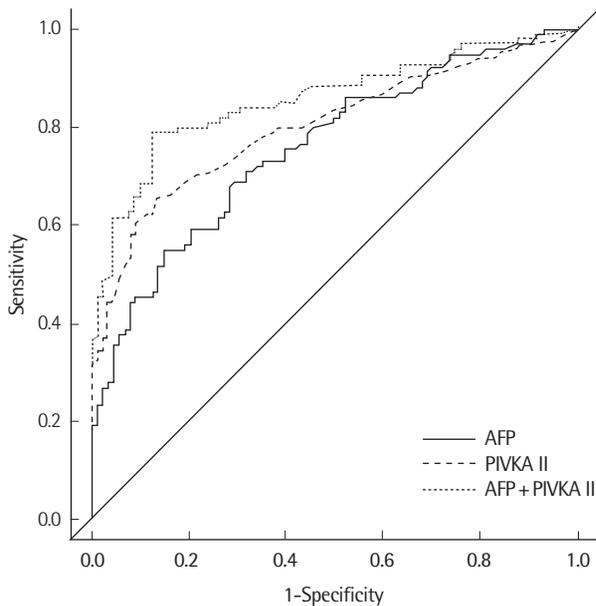


Fig. 5. ROC curve evaluating cases with hepatocellular carcinoma and cirrhosis. The area under the curve is shown with its 95% confidence intervals.

것을 목표로 최근 발견된 혈청표지자는 PIVKA-II 외에도 Glypican-3 (GP-3), Squamous Cell Carcinoma Antigen-1 (SCCA-1), Golgi Protein 73 (GP73), *Lens culinaris* agglutinin-reactive AFP (AFP-L3), human hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor-1 등이 있다[22, 23]. 혈청표지자에 대한 평가에서 기존의

Table 4. Performance of PIVKA-II according to different cut-off values and its combination with AFP in the diagnosis of hepatocellular carcinoma

Marker	Cut-off	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
AFP* (ng/mL)	20	57	80	75	64
PIVKA-II (mAU/mL)	40	45	96	91	62
	35	47	94	90	63
	30	58	92	89	68
	25	66	86	84	70
AFP* and PIVKA-II	40	45	94	96	37
	35	49	94	96	39
	30	62	89	94	44
	25	70	89	95	50

*Cut-off of AFP was fixed at 20 ng/mL.

Abbreviations: PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

AFP와 PIVKA-II가 가장 유용한 것으로 보고되고 있다[22-24].

PIVKA-II의 측정으로 가장 널리 쓰이고 있는 방법은 ELISA를 이용한 효소면역측정법으로 가장 민감한 것으로 보고되고 있다[25]. 최근 간세포암 조기 진단을 위한 PIVKA-II의 검사건수는 나날이 증가하고 있다. 기존의 널리 사용되어 온 수기법은 최소 24시간 이상의 반응시간이 필요하고 반응과 반응 간 검체 및 시약의 세척과 분주로 인해 검사자의 지속적인 개입이 불가피하다. 하지만 자동 효소면역분석기를 이용한 자동분석법은 반응시간의 개선으로 검사시간이 약 3시간으로 단축되었으며, 혈청검체를 검사 플레이트에 분주한 뒤 장비에 장착하면 전과정의 자동으로 처리되므로 당일검사가 가능하며, 인력활용도 용이하게 되었다. 정밀도를 살펴보

면 저농도를 제외한 중간농도, 고농도, 극고농도군의 검사차레 내 변이계수와 총변이계수가 모두 8% 미만이었다. 저농도군에서 검사차레 내 변이계수와 총변이계수는 각각 12.56%, 11.65%로 10% 이상이었으나, 저농도군은 14-20 mAU/mL, 중간농도군은 36-41 mAU/mL 범위로 기존검사 한계점이 40 mAU/mL 미만인 것을 감안하면 검사결과의 임상판단에 크게 영향을 주지 않을 것으로 생각된다. 상관성 평가에서는 의뢰된 검체의 수기법 검사의 결과를 바탕으로 저농도 검체의 비율과 중간농도 이상의 검체 비율을 고루 선별하여 검사하였다. 상관성은 상관계수(r)에서 0.98 이상의 결과를 보여 양호한 상관관계를 가지는 것으로 확인되었으나 수기법에 비해 자동분석법을 이용한 측정치는 저농도군에서 18.7%, 중간농도군에서 26.0%, 고농도군에서 27.5%, 극고농도군에서 39.9% 정도 낮은 측정값을 보여주었다. 본원에서의 상관식은 $y = 0.621x + 8.283$ 로, 자동효소면역분석기를 이용한 단축된 방법에서 기존 측정치보다 유의하게 낮은 값을 보인 것은 PIVKA-II 검사의 검출 민감도가 반응시간에 많은 영향을 받음을 시사하는 소견이다. 그러므로 아무리 동일한 시약을 사용한다 하더라도 반응조건이 변경되는 경우에는 본 연구와 같은 체계적인 평가가 필요하며, 또한 동일한 상황에 있는 검사실 간의 비교를 통해 변경된 조건이 검사실 간 변이를 조장하지 않는 안정된 조건임을 검증할 필요가 있을 것으로 생각된다.

현재 많이 쓰이는 효소면역측정법을 이용한 경우 40 mAU/mL을 진단기준치로 정하고 있다[17, 26, 27]. 본원 역시 이를 진단기준치로 적용하고 있으며, 예민도 45.2%, 특이도 95.5%로, 기존 보고들[17, 26, 27]에서 민감도 53-77%, 특이도 74-92%로 보고한 것에 비해 민감도는 조금 낮고, 특이도는 높은 결과를 보였다. 본 연구에서의 결과를 근거로 ROC 곡선 분석 결과, 한계점을 30 mAU/mL로 새롭게 설정하여 적용하였을 때는 민감도 58%, 특이도 92%로 역시 기존보고와 유사한 우수한 결과를 보였다(Table 4). PIVKA-II는 AFP에 비해 특이도가 높으며, 간세포암의 크기나 종양의 진행과 관련이 있는 것으로 보고되어 AFP과 동시에 사용할 경우 간세포암 진단 시 유용하며 종양진행의 지표로도 이용될 수 있는 것으로 알려져 있다[27]. 본 연구에서도 단일 종양의 경우 크기와 혈청 PIVKA-II 농도의 증가가 일부 관련이 있었고 AFP (한계점 20 ng/mL)와 PIVKA-II (한계점 30 mAU/mL)를 동시에 적용한 경우 간세포암 진단의 민감도 52%, 특이도 89%의 결과를 얻을 수 있었다.

결론적으로, 동일 시약을 사용하나 자동분석법을 도입하여 PIVKA-II 검사를 시행하는 것은 검사실의 효율과 임상만족도를 향상시키는 데 효과적이었으나, 평가를 통해 검사방법 간 차이를 확인하고 검증하는 것은 중요할 것으로 생각되었다. 또한 새롭게 도출한 진단기준치를 적용하여 AFP과 PIVKA-II를 동시 측정할 경우 진단적 성능을 향상시킬 수 있었다.

요 약

배경: 혈청 des-gamma-carboxyprothrombin (protein induced by vitamin K absence or antagonist-II, PIVKA-II)은 간세포암의 진단에 있어 alpha-fetoprotein (AFP)과 함께 이용되는 유용한 혈청표지자이다. 저자들은 최근 자동효소면역분석기를 사용하여 시간과 과정을 단순화한 PIVKA-II 측정법을 기존의 수기법과 비교하여 평가하고 간세포암 진단 시 유용성을 확인하고자 하였다.

방법: 농도별 표준항원 control 물질(10, 25, 500, 1,000 mAU/mL)과 208개의 환자 검체로 PIVKA-II ELISA kit (Sanko Junyaku Co., Japan)을 사용하여 CLSI 가이드라인에 따라 자동분석법의 성능을 평가하였다. 간세포암 진단의 유용성 평가를 위해 치료받지 않은 간세포암 환자 93명과 질환 대조군으로 간경변증 환자 58명과 만성간염 환자 30명을 대상으로 ROC 곡선 분석, 간세포암 진단을 위한 민감도, 특이도 및 양성 예측도와 음성 예측도를 구하였다.

결과: 자동분석법을 사용한 혈청 PIVKA-II의 측정 시 총 변이계수와 검사차레 내 변이계수는 저농도군에서 각각 12.6%와 11.7%를 보인 것을 제외하고는 모든 항목에서 10% 이내의 결과를 보였다. 농도 1,000 mAU/mL까지 상관계수(r) 0.99 이상의 우수한 직선성이 관찰되었으며 검체 간 상호오염도는 -0.14%였다. 수기법과 자동분석법과의 상관성은 상관계수(r) 0.982의 양호한 상관관계를 보였으나 y 절편값이 0.621로 비례오차를 보였다. 자동분석법으로 측정된 PIVKA-II에서 양성 기준점을 30 mAU/mL로 설정하였을 때 간암진단의 민감도는 58% 그리고 특이도는 92%이었다.

결론: 자동효소면역분석기를 사용한 PIVKA-II 측정법은 간암 진단에 우수한 민감도와 특이도를 유지하면서, 검사시간을 단축시켜 검사실 효율 증대와 임상적 편리성을 개선하는 데 유용할 것으로 생각되었다.

참고문헌

1. Wilson JF. Liver cancer on the rise. *Ann Intern Med* 2005;142:1029-32.
2. Bosch FX, Ribes J, Díaz M, Cléries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004;127(S):S5-16.
3. National Cancer Informaion Center. <http://www.cancer.go.kr/cms/statistics/incidence/index.html#1> (Updated on Dec 2011).
4. Ikeda K, Saitoh S, Koida I, Arase Y, Tsubota A, Chayama K, et al. A multivariate analysis of risk factors for hepatocellular carcinogenesis: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 1993;18:47-53.
5. Hirai K, Aoki Y, Majima Y, Abe H, Nakashima O, Kojiro M, et al. Magnetic resonance imaging of small hepatocellular carcinoma. *Am J Gas-*

- troenterol 1991;86:205-9.
6. Okuda K. Hepatocellular carcinoma: recent progress. *Hepatology* 1992; 15:948-63.
 7. Sherman M. Alphafetoprotein: an obituary. *J Hepatol* 2001;34:603-5.
 8. Weitz IC and Liebman HA. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review. *Hepatology* 1993; 18:990-7.
 9. Nomura F, Ohnishi K, Tanabe Y. Clinical features and prognosis of hepatocellular carcinoma with reference to serum alpha-fetoprotein levels. Analysis of 606 patients. *Cancer* 1989;64:1700-7.
 10. Larson AE and Suttie JW. Vitamin K-dependent carboxylase: evidence for a hydroperoxide intermediate in the reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:5413-6.
 11. Suttie JW. Recent advances in hepatic vitamin K metabolism and function. *Hepatology* 1987;7:367-76.
 12. Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, et al. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1984;310:1427-31.
 13. Koike Y, Shiratori Y, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M, et al. 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.
 14. Hagiwara S, Kudo M, Kawasaki T, Nagashima M, Minami Y, Chung H, et al. Prognostic factors for portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2006;41:1214-9.
 15. 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.
 16. Fujiyama S, Morishita T, Sagara K, Sato T, Motohara K, Matsuda I. Clinical evaluation of plasma abnormal prothrombin (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1986;33:201-5.
 17. Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, Saito A, Hayashi N, Watanabe K, et al. Measurement of serum levels of des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma by a revised enzyme immunoassay kit with increased sensitivity. *Cancer* 1999;85:812-8.
 18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline-second edition. CLSI document EP5-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
 19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach; approved guideline. CLSI document EP6-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
 20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline-second edition. CLSI document EP9-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
 21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Assessment of the clinical accuracy of laboratory tests using receiver operating characteristic (ROC) Plots; approved guideline. CLSI document GP10-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 1995.
 22. Marrero JA and Lok AS. Newer markers for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127(S):S113-9.
 23. Beale G, Chattopadhyay D, Gray J, Stewart S, Hudson M, Day C, et al. AFP, PIVKAI, GP3, SCCA-1 and follistatin as surveillance biomarkers for hepatocellular cancer in non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease. *BMC Cancer* 2008;8:200.
 24. Marrero JA, Feng Z, Wang Y, Nguyen MH, Befeler AS, Roberts LR, et al. Alpha-fetoprotein, des-gamma carboxyprothrombin, and lectin-bound alpha-fetoprotein in early hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2009;137:110-8.
 25. von Kries R, Shearer MJ, Widdershoven J, Motohara K, Umbach G, Göbel U. Des-gamma-carboxyprothrombin (PIVKA II) and plasma vitamin K1 in newborns and their mothers. *Thromb Haemost* 1992;68: 383-7.
 26. Wang CS, Lin CL, Lee HC, Chen KY, Chiang MF, Chen HS, et al. Usefulness of serum des-gamma-carboxy prothrombin in detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:6115-9.
 27. Park TH, Park TS, Kim HH, Lee EY, Son HC, Kim SH. Combination assay of serum PIVKA-II and alpha-fetoprotein in primary hepatocellular carcinoma. *Korean J Clin Pathol* 2001;3:215-21.