



中國醫藥大學  
醫學研究所  
碩士學位論文

血清脫羧基凝血酶原及磷脂肌醇蛋白聚糖 3  
對肝細胞癌的診斷角色

DIAGNOSTIC ROLE OF SERUM  
DES- $\gamma$ -CARBOXY PROTHROMBIN AND GLYPICAN-3  
IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

指導教授：彭成元 助理教授

研究生：莊伯恒

中華民國九十六年七月

**摘要：**

**背景：**臨床常用的血清甲型胎兒蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)對肝癌的敏感度並不高，而腹部超音波檢查準確度也因檢查者而異。若可以發現有用的血清腫瘤標記，對肝癌的篩檢診斷大有幫助。最近報告血清脫羧基凝血酶原(Des- $\gamma$ -carboxy prothrombin, DCP) ELISA kit 可提高肝癌篩檢敏感度，另一種新的血清腫瘤標記磷脂肌醇蛋白聚糖 3 (Glypican-3, GPC3) ELISA kit 也已經上市。

**目的：**本臨床試驗在比較血清腫瘤標記甲型胎兒蛋白(AFP)、脫羧基凝血酶原(DCP)及磷脂肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)對肝癌診斷的敏感度。

**方法：**選取民國九十二年九月至九十五年八月間在中國醫藥大學附設醫院消化內科持續抽血及腹部超音波追蹤的 300 位病患的冷凍血清。其中慢性肝炎 100 位、肝硬化 80 位、肝癌有病理報告證實者 120 位。各組 B 型與 C 型肝炎病患各占一半。300 位病患皆有甲型胎兒蛋白(美國 DPC)、脫羧基凝血酶原(法國 Stago)檢驗，264 位病患(88%)加做磷脂肌醇蛋白聚糖 3(美國 BioMosaics)檢驗。Cut-off 值甲型胎兒蛋白為 20 ng/ml，脫羧基凝血酶原及磷脂肌醇蛋白聚糖 3 則依 ROC 曲線選定為 6 ng/ml 及 170 pg/ml，進一步分析數據。

**結果：**對肝癌診斷的診斷正確性、敏感度、特異度分別為甲型胎兒蛋白(AFP)：68.3%、47.5%、82.2%；脫羧基凝血酶原(DCP)：71%、39.2%、

92.2%及磷脂肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)：50.8%、52.3%、49.7%。三種指標至少有一陽性為 56.8%、79.8%、40.6%。三種腫瘤標記之中僅 DCP 能夠區分出肝癌與非肝癌( $P < 0.0001$ )，ROC 曲線下的面積 AFP 為 0.719(臨界值取 11.6 ng/ml)及 0.624(臨界值取 20 ng/ml)，DCP 為 0.676，GPC3 為 0.497，三者皆測為 0.765。顯示三者混合測試肝癌也可以增加敏感度。而且依照腫瘤的大小分成小於等於 2 公分、2 到 3 公分及大於 3 公分三組來檢視 DCP 偵測值，接近有統計意義( $P = 0.0566$ )，AFP 與 GPC3 則無。三種腫瘤標記與肝癌的分化(grading)與分期(CLIP 及 TNM)皆無明顯相關。

**結論：**血清腫瘤標記脫羧基凝血酶原(DCP)及磷脂肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)對肝癌診斷的敏感度並未優於常用的甲型胎兒蛋白(AFP)，但三者皆檢驗則可提高肝癌診斷敏感度至 79.8%。

## Abstract

**Background:** The serum alpha-fetoprotein (AFP) and abdominal sonography were commonly used for hepatocellular carcinoma (HCC) screening. However the sensitivity of serum AFP is around 50% and the abdominal sonography is operator- dependent. It would be helpful to find new useful serum tumor markers for HCC screening. Recent reports showed Des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP) was more sensitive to AFP in differentiation of HCC from non-tumor disease and had better effectiveness in detecting small HCC. Another serum marker glypican-3 (GPC3) also showed promising potential in the detection of HCC and was commercialized.

**Purpose:** We want to know the sensitivity of AFP and DCP and GPC3 in the detection of HCC.

**Methods:** Three hundred patients that were followed up at the gastrointestinal division of internal medical department of China Medical University Hospital were enrolled. One hundred have chronic hepatitis and 80 have cirrhosis and 120 have pathologically proven HCC. Half of each group were hepatitis

B and half hepatitis C related. All three hundred had AFP (DPC, USA) levels and underwent DCP (Stago, France) measurement, 264 (88%) had further GPC3 (BioMosaics, USA) measurement. The cut-off values of AFP were 20 ng/ml, and DCP, GPC3 were 6 ng/ml and 170 pg/ml respectively. We analyzed our data.

**Result:** The diagnostic accuracy, sensitivity, specificity for HCC were AFP: 68.3%、47.5%、82.2%、DCP : 71%、39.2%、92.2% and GPC3 : 50.8%、52.3%、49.7%。At least one positive were 56.8%、79.8%、40.6%。Only DCP in the three tumor markers could differentiate HCC from nontumor serum ( $P < 0.0001$ ) , AUROC curve AFP:0.719(cutoff 11.6 ng/ml) and 0.624(cutoff 20 ng/ml) , DCP:0.676 , GPC3:0.497 , either one :0.765。The screening sensitivity increased if we checked all three markers。DCP value differed between size  $\leq 2$ cm, 2-3cm and  $> 3$ cm ( $P = 0.0566$ ). All three markers have no relation to HCC grading, CLIP, or TNM score.

**Conclusion:** In the three serum tumor markers, DCP and GPC3 were no more sensitive than AFP in the detection of HCC. However the sensitivity increased to 79.8% if all three were measured in

the screening.



## 誌謝：

感謝三年來中國醫藥大學附設醫院鄭隆賓副院長、消化內科彭成元主任對於我在肝癌治療與研究的教導與指正，中國醫藥大學附設醫院消化內科同仁鄭庚申主任、徐章虎主任、賴學洲醫師、廖光福醫師、黃文信醫師、周仁偉醫師、馮俊龍醫師、蘇文邦醫師、湯惠玲組長、專科護理師詹美足、劉小瑩及肝病中心吳明芬在資料及檢體收集上的協助，中國醫藥大學醫學檢驗生物技術研究所鄭如茜老師及陳郁芬在ELISA kit選購及操作技術上的協助，以及中國醫藥大學生物統計中心吳宏達老師與林保萱在資料統計上的協助。

此研究龐大的經費來源一半是中國醫藥大學的補助，另一半由鄭隆賓副院長及彭成元主任籌措提供，非常感謝兩位對研究的支持。

醫院的工作繁重，胃鏡室值班加上頻繁的醫學研討會，研究的進度因為我的忙碌而延遲，感謝各位的體諒與協助我解決研究中所遭遇的困難，更感謝父母親對我疏於省親的包容與支持。

慚愧自己的延遲一年完稿，辜負了先師黃明哲主任的關心與督促，終究造成讓他等不到我畢業，無法實現出席口試的約定。

感謝大家的幫助，讓我精進成長！

莊伯恒 敬謝

中華民國九十六年七月三十日

目錄：

學位考試委員審定書影本

中、英文摘要	i
誌謝	vi
目錄	vii
(之一) 圖、表目錄	xi
(之二) 關鍵字及縮寫	xiii
論文正文	P1
第一章 前言	P1
第一節 研究背景	P1
(一) 肝癌發生率	P1
(二) 肝癌、慢性肝病及肝硬化皆為十大死因	P1
(三) 肝癌死亡年齡中位數後延	P1
(四) 罹患肝癌的危險因子	P2
(五) 慢性肝病及肝硬化罹患肝癌的機率	P2
(六) 肝癌病患的症狀	P2
(七) 肝癌的高復發率	P3
(七之一) 外科治療	P3
(七之二) 非外科治療	P4



(七之三) 肝內轉移與多中心性復發	P5
(八) 肝癌的治療選擇	P6
(九) 高危險群病患接受篩檢	P7
(十) 腹部超音波等影像檢查	P8
(十一) 腫瘤標記	P9
(十一之一) 甲型胎兒蛋白(AFP)	P10
(十一之二) 脫羧基凝血酶原(DCP, PIVKA-II)	P14
(十一之三) 磷脂肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)	P16
第二節 研究目的	P18
第二章 研究方法	P18
第一節 研究材料	P18
(一) 血清來源	P18
(二) 腫瘤標記之測量	P19
第二節 研究設計	P22
第三節 統計方法	P24
第三章 研究結果	P24
第一節 描述性統計分析	P24
(一) 年齡	P24
(二) 性別及肝癌大小	P24

(三) 肝癌與 CLIP 分期、TNM 分期、HCC 分化	P25
(四) 三種腫瘤標記與慢性肝炎、肝硬化及肝癌	P25
(五) 丙胺酸轉胺酶與慢性肝炎、肝硬化及肝癌	P27
(六) 血小板指數與慢性肝炎、肝硬化及肝癌	P27
(七) 肝癌組中 C 型肝炎與 B 型肝炎之不同	P27
(八) 肝癌併肝門靜脈栓塞	P28
第二節 推論性統計分析	P28
第四章 討論	P28
第一節 結果討論	P28
(一) 肝炎肝硬化肝癌三部曲的年齡	P28
(二) 肝癌的形成以組織發炎壞死的間接影響為主	P29
(三) 三種腫瘤標記的相關性	P30
(四) 甲型胎兒蛋白	P30
(五) 脫羧基凝血酶原	P31
(六) 磷脂肌醇蛋白聚糖 3	P34
(七) 肝癌併肝門靜脈栓塞	P37
第二節 其他相關性討論	P37
(一) 肝癌的肉眼分類	P37
(二) 肝癌的診斷標準	P38

(三) 肝癌的顯影劑影像學診斷	P40
(四) 肝癌的病理診斷	P41
(五) 肝癌的高度的異質性	P41
(六) AFP 或 DCP 陽性的肝癌何者預後較好無定論	P42
(七) C 型肝炎相關的肝癌較容易復發	P43
(八) 降低肝炎發炎程度防止肝癌復發	P44
第三節 研究限制	P45
第五章 結論與建議	P46
第一節 結論	P46
第二節 建議	P47
圖及表格	P48
參考文獻	P61
本校論文電子檔案上網授權書	P74



圖及表格目錄：

- 表 1-年齡、三種腫瘤標記、丙胺酸轉胺酶及血小板在慢性病毒性肝炎、肝硬化及肝癌三組之不同 P48
- 表 2-性別、慢性 B 型或 C 型肝炎、丙胺酸轉胺酶在慢性病毒性肝炎、肝硬化及肝癌三組之不同 P48
- 表 3-年齡、三種腫瘤標記、丙胺酸轉胺酶及血小板在慢性 B 型病毒相關的肝炎、肝硬化及肝癌三組之不同 P49
- 表 4-性別、丙胺酸轉胺酶在慢性 B 型病毒相關的肝炎、肝硬化及肝癌三組之不同 P49
- 表 5-年齡、三種腫瘤標記、丙胺酸轉胺酶及血小板在慢性 C 型病毒相關的肝炎、肝硬化及肝癌三組之不同 P49
- 表 6-性別、丙胺酸轉胺酶在慢性 C 型病毒相關的肝炎、肝硬化及肝癌三組之不同 P50
- 表 7-慢性 B 型或 C 型病毒相關的肝癌與年齡、三種腫瘤標記、丙胺酸轉胺酶、血小板及肝癌大小平均值 P50
- 表 8-肝癌與性別、大小、CLIP score、TNM score、HCC grading P51
- 表 9-肝門靜脈栓塞與年紀、三種腫瘤標記、肝癌大小的關係 P52
- 表 10 - 肝癌大小與三種腫瘤標記的關係 P52
- 表 11-三種腫瘤標記在偵測肝癌的準確度、敏感度、特异性及預測值 P53
- 表 12a - Pearson Correlation P54

- 表 12b - Spearman Correlation P54
- 表 13-Logistic Model (HCC vs other) P54
- 表 14-檢視 GPC3 用 EDTA 試管和 Heparin 試管儲存有何不同 P55
- 圖 1-三種腫瘤標記的相關性 P56
- 圖 2-AUROC curve (area under the receive operating characteristic curve) P57
- 圖 3-AFP 值在肝硬化、慢性肝炎及肝癌的盒鬚圖 P58
- 圖 4-DCP/PIVKA-II 值在肝硬化、慢性肝炎及肝癌的盒鬚圖 P58
- 圖 5-GPC3 值在肝硬化、慢性肝炎及肝癌的盒鬚圖 P59
- 圖 6-AFP 值在肝癌小於等於 2 公分、2 到 3 公分、大於 3 公分的盒鬚圖 P59
- 圖 7-DCP/PIVKA-II 值在肝癌小於等於 2 公分、2 到 3 公分、大於 3 公分的盒鬚圖 P60
- 圖 8-GPC3 值在肝癌小於等於 2 公分、2 到 3 公分、大於 3 公分的盒鬚圖 P60

關鍵字及縮寫：

慢性肝炎(chronic hepatitis, CH)

肝硬化(liver cirrhosis, LC)

肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)

腫瘤標記(tumor marker)

臨界值(cut-off value)

天門冬胺酸轉胺酶(aspartate aminotransferase, AST)

丙胺酸轉胺酶(alanine aminotransferase, ALT)

血小板(platelet, PLT)

甲型胎兒蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)

脫羧基凝血酶原(des-gamma-carboxy prothrombin, DCP) / (protein induced by vitamin K absence or antagonist II, PIVKA-II)

磷脂肌醇蛋白聚糖 3 (Glypican-3, GPC3)

肝門靜脈栓塞(portal vein thrombosis, PVT)

CLIP(Cancer of the Liver Italian Program)分期

TNM(Tumor-Node-Metastasis)分期

論文正文：

## 第一章 前言：

### 第一節 研究背景：

#### (一) 肝癌發生率：

肝癌，以肝細胞癌較常見，一般將肝細胞癌簡稱肝癌。不管在全世界或台灣，都是常見的惡性腫瘤之一。根據民國八十七年的癌症登記年報，肝癌是臺灣男性好發癌症的第一位，女性的第四位，其年齡標準化發生率分別為每十萬人口 45 人及 16 人[1]。

#### (二) 肝癌、慢性肝病及肝硬化皆為十大死因：

肝癌自民國 54 年起便佔男性惡性腫瘤死因中的第一位，在女性，則於民國 70 年後便高居第三位[2]，根據民國 90 年的死因登記資料，肝癌高居男性十大癌症死因的第一位，女性的第二位，在民國 95 年落居男性惡性腫瘤死因中的第二位，占 5.48%，略少於肺癌。而慢性肝病及肝硬化居民國 95 年台灣十大死因第七位，占 3.7%。男性十大主要死因標準化死亡率與九十四年年比較，以慢性肝病及肝硬化減少 12.6%為最多[2, 3]。

#### (三) 肝癌死亡年齡中位數後延：

民國 85 年肝癌死亡年齡中位數為 64 歲，男性 63 歲，女性 67 歲。

民國 95 年肝癌死亡年齡中位數為 67 歲，男性 65 歲，女性 71 歲，十年來死亡年齡中位數有後延趨勢。肝癌死因死亡年齡中位數男性比女性少 6 歲。而慢性肝病及肝硬化居民國 95 年台灣十大死因第七位，占 3.7%，死亡年齡中位數為 58 歲，男性 53 歲，女性 70 歲。在民國 85 年死亡年齡中位數為 58 歲，男性 54 歲，女性 66 歲，十年來女性死亡年齡中位數有後延趨勢[3]。

#### **(四) 罹患肝癌的危險因子：**

肝癌是少數有明確危險因子的腫瘤之一。台灣的成人肝癌病患百分之九十五以上肇因於慢性 B 型肝炎或 C 型肝炎感染，幼童的肝癌病患百分之百肇因於慢性 B 型肝炎。其他可能的病因及危險因子包括：黃麴毒素、含砷井水、大量酒精攝取、肝硬化、家族有肝癌病人及先天性肝臟疾病[2]。

#### **(五) 慢性肝病及肝硬化罹患肝癌的機率：**

慢性 B 型肝炎帶原者相較於未帶原者有 100 倍的相對危險性會得到肝癌，每年發生肝癌的機率約 0.46%[4]。慢性 B 型肝炎相關肝硬化的病患每年發生肝癌的比率約 2 到 6.6%。慢性 C 型肝炎的患者，肝癌大多發生於肝硬化的病患，每年發生肝癌的比率約 3 到 5%[5]。肝硬化不管任何原因每年發生肝癌的機率約 1-6%[4]。

#### **(六) 肝癌病患的症狀：**



肝癌病患在初期或小型肝癌約有 80% 是沒有症狀的。肝癌會朝血管或膽管侵犯甚至轉移到其他器官，等到病人出現食慾不振、體重減輕、全身虛弱、黃疸、腹部腫塊、發燒、腹痛、腹脹、腹瀉等症狀時，大多屬於大型、晚期肝癌了[2, 6]。

大部份症狀明顯的病人發現罹患肝癌時已無法有效根治治療，可能肇因於腫瘤太大、血管侵犯、肝內轉移或其他器官轉移，臨床上存活期大約只有數週到數個月。有症狀的肝癌病患若不接受治療，多會於 4 個月內過世，只有 1% 可以存活到 2 年[4, 7-9]。

### **(七) 肝癌的高復發率：**

肝癌的高復發率是接受根治性手術切除的病患無法提高存活率的主要原因，復發又分肝內轉移或多中心性復發，使得不管病患選擇根治性外科治療或姑息性非外科治療，兩者的長期治療存活率統計上並無顯著差異[10]。

#### **(七之一) 外科治療：**

日本大阪醫學中心Sasaki醫師統計417位肝癌患者經手術切除後，3、5及10年的無病存活率(disease-free survival)在慢性B型肝炎相關的肝癌為57%、54%、28%，而慢性C型肝炎相關的肝癌則只有40%、24%、12%，後者明顯較差( $P < 0.0001$ )[11]。日本島根醫科大學Nagasue醫師統計121位肝癌患者經手術切除後第1、2、3、4、5、

10年的復發率為22%、43%、62%、72%、75%及75% [12]。十年後東京大學Imamura醫師統計249位肝癌患者經手術切除後第1、2、3、4、5年的復發率為30.1%、51.6%、62.3%、68.9%及79.0%，而且有早期(二年內)與晚期(二到五年內)復發兩波高峰，早期復發被視為肝內轉移，危險因子有：未依照肝臟解剖構造切除(non-anatomical resection)、病理切片看到小血管侵犯、血清甲型胎兒蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)大於等於 32 ng/ml；晚期復發被視為是多中心性復發，危險因子有：較嚴重的活動性肝炎、多發性肝癌、肝癌的肉眼分類較侵犯性，其中強調B型或C型肝炎的感染種類不同並非危險因子，主要還是活動性肝炎的發炎程度[13]。但也有義大利Benvegna醫師等報告兩種不同型態的肝癌各有其危險因子，結節型(nodular type)肝癌年齡平均66.2歲，與肝硬化中肝炎的發炎程度較有相關，與B型或C型肝炎的感染不同無相關，而浸潤型(infiltrative type)肝癌患者較年輕，年齡平均59.5歲，與B型肝炎的感染較有相關，可能是HBV DNA嵌合直接造成肝癌生成[14, 15]。

### **(七之二) 非外科治療：**

非外科治療方面，義大利Pampili醫師等研究111位肝硬化合併肝癌，接受多次經皮酒精注射的患者，觀察到3年及5年存活率為62%及41%，各種因子中只有治療前AFP大於14 ng/ml ( $P < 0.006$ )，丙胺酸

轉胺酶(alanine aminotransferase, ALT) 大於75 IU/L ( $P < 0.04$ ), 天門冬胺酸轉胺酶(aspartate aminotransferase, AST) 大於80 IU/L ( $P < 0.009$ )(亦即肝炎的發炎程度), 血小板小於 $92 \times 10^9/L$  ( $P < 0.02$ ) 及治療後6個月AFP大於13.3 ng/ml ( $P < 0.003$ ), 肝癌在另一肝小葉(segment)復發等因子會降低存活率( $P < 0.04$ ) [16]。

### (七之三) 肝內轉移與多中心性復發：

台灣大學陳培哲醫師用南方墨點分析法(southern blotting)分析慢性B型肝炎相關的肝癌患者術後再發肝癌與第一次切下的肝癌的細胞同源性(clonality), 發現其中三分之二的再發肝癌細胞中的HBV DNA嵌入的位置、形式與原發肝癌細胞不同, 屬於多中心性復發[17]。

日本大垣市立醫院Kumada等醫師直接以臨床病理上肝癌分化程度區分112位小於2公分的肝癌病患, 經手術切除或經皮純酒精注射治療後復發的肝癌性質, 術後第1、3、5年的復發率為23.7%、64.5%及76.1%, 肝內轉移與多中心性復發的比率為50.9% (29位)及49.1% (28位), 其中慢性B型肝炎相關肝內轉移50% (9/18位), 多中心性復發5.6% (1/18位), 共55.6% (10/18位); 慢性C型肝炎相關肝內轉移22.7% (20/88位), 多中心性復發29.5% (26/88位), 共52.3% (46/88位); 其他非B非C者有多中心性復發16.7% (1/6位)[18]。

因此肝癌患者不管接受外科根除治療或非外科治療後, 仍需定期

以影像檢查及抽血以腫瘤標記追蹤，才能早期發現復發並治療

[19-22]。

#### (八) 肝癌的治療選擇：

肝癌的治療以手術切除或換肝為首選。大部分無法接受根治性手術的患者都接受非外科姑息性局部治療，其中包括肝動脈化學栓塞治療(transarterial chemoembolization, TACE)、經皮純酒精注射(percutaneous ethanol injection, PEI)、無線電射頻燒灼(radiofrequency ablation, RFA)、微波凝固治療(microwave coagulation therapy, MCT)、冷凍治療(cryotherapy)、雷射治療(Laser therapy)及高强度聚焦超音波治療(High Intensity Focused Ultrasound, HIFU, 海扶刀)，姑息性局部治療和手術治療的5年存活率事實上相差不大[12, 13, 23]，而且其中局部治療的技術已經進步到小於3公分的肝癌也有超過90%的根除率。台灣大學黃冠棠教授研究76位肝癌1或2顆，皆小於3公分的病患隨機接受手術根除(38位)或經皮酒精注射(38位)的治療結果，平均追蹤37.7個月，發現兩組病患的腫瘤復發率(12/38及11/38)及存活率並無統計差別，治療後1到5年的存活率各為：97.4%、91.3%、88.1%、88.1%、81.8%(手術)與100%、100%、96.7%、92.1%、46%(酒精注射)；治療後1到5年的無腫瘤存活率各為：89.5%、71.3%、60.9%、56.2%、48.2%(手術)

與 76.1%、64.5%、49.1%、44.6%、44.6%(酒精注射)。表示手術切除及經皮酒精注射都可以是第一線的治療選擇[10, 24]。肝癌局部治療中，無線電射頻燒灼優於經皮酒精注射的效果，是局部治療的首選，國內各家醫院也大多可以執行，可減少術次、減少住院天數、可做出安全範圍降低局部殘存復發率、併發症差不多，但皆無法防止他處肝內復發及遠處轉移、長庚醫院林錫銘醫師報告 3 年存活率 74%比 50%[25]、東京大學 Shiina 醫師報告 4 年存活率 74%比 57%[26]，但有較高的穿刺路徑腫瘤皮下轉移散播機率(0.9%-1.5%比 0.05%~0.1%)[27-29]。

#### (九) 高危險群病患接受篩檢：

世界衛生組織於 1968 年對篩檢疾病是否符合成本效益分析 (Cost- Effectiveness Analysis) 定有 10 項標準，肝癌篩檢符合其中的 9 項，另一項有關診斷與治療應與全部醫療支出平衡則還有爭議 [30, 31]。在肝癌發生率較低的區域做肝癌篩檢並不符合經濟效益，但是在肝癌發生率較高的區域，針對年紀超過 40 歲的高危險群患者做篩檢，就可見到經濟效益[30, 32]。

高危險群病患接受定期檢查 (surveillance, periodic checkup) 每年發現肝癌的比率約 0.8 到 4.1%[4, 33]。雖然病患藉由篩檢 (screening) 或定期檢查發現的肝癌，比未接受定期檢查的病患，有

較小的腫瘤、較高的可切除率[33]，存活率比有症狀的肝癌病患要好[30]。但是縱然有定期檢查發現小肝癌，許多肝癌事實上在一診斷時就無法切除，或者經過所謂的早期切除或經皮酒精注射治療，5年的死亡率仍然超過50%[4, 30, 33]。大阪大學 Tanaka 醫師統計 660 位慢性病毒性肝炎病患，接受定期檢查，追蹤 19 個月，發現 22 位罹患肝癌(3.3%)，也只有 12 位(55%)能接受手術切除[33]。

目前肝癌篩檢最常被使用的方式就是血清甲型胎兒蛋白(alpha-fetoprotein,  $\alpha$ FP, AFP)及腹部超音波的檢查[32, 34-37]。

#### (十) 腹部超音波等影像檢查：

以腹部超音波的檢查篩檢慢性 B 型肝炎帶原者與肝硬化患者的敏感度各為 71% 及 78%，特異度 93%，陽性預測值各為 14% 及 73%，最主要的問題在於每個檢查操作者的認定及專心程度不一致[38-40]。定期檢查的間隔約 6 個月[4]，乃是根據台灣大學許金川教授的報告，平均倍增時間為 117 天，31 位倍增腫瘤中有 17 位 AFP 也增高，最快速生長的腫瘤由 1 公分長到 3 公分花了 5 個月[41, 42]。

肝硬化及增生節結在放射影像學檢查下不容易與肝癌區分，香港皇家自由醫院 Fung 醫師等，系統性地搜尋 997 篇有關偵測肝癌最佳的影像學檢查，發現沒有一種影像學檢查是最好的。在開刀取出肝臟

比對與未開刀比對兩組比較，肝癌偵測率各為：灰階腹部超音波 4%-58%比 34%、Levovist 顯影劑腹部超音波未開刀組 95%、快速螺旋電腦斷層 53.8%-71%比 80%-95%、碘化油電腦斷層 7%-58%比 66%、動脈相門脈血管攝影電腦斷層(CTAP)開刀組 85%、動脈相門脈血管攝影電腦斷層(CTAP)與肝動脈電腦斷層(CTHA)未開刀組 89%、無顯影劑核磁共振未開刀組 48%-63%、Gadolinium 顯影劑核磁共振 52.6%-76.9%比 75%-94%、MnDPDP 顯影劑核磁共振未開刀組 81%、SPIO 顯影劑核磁共振未開刀組 78%-92%、血管攝影開刀組 4%-67%[43]。有些檢查費用很高，又具有侵襲性，都不是很理想的肝癌偵測工具，仍然需要用血清腫瘤標記輔助診斷。

#### (十一) 腫瘤標記：

理想中的腫瘤標記(tumor marker)能有效鑑別出良性與惡性腫瘤，最方便取得的方式應該是抽血，以不會太貴的試劑偵測血清中的蛋白質，可以用於大規模篩檢[44]。其結果要能測得早期癌症、癌症的復發以及預測對治療的反應，但是目前所使用的 AFP 敏感度不高，仍然有待開發更好的腫瘤標記[45]。

宮崎大學 Kanmura 等醫師使用表面強化雷射解吸電離飛行質譜技術(Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization

Time-of-Flight Mass Spectrometry, SELDI-TOF/MS)的蛋白質晶片來找新的腫瘤標記，更快，更多資訊，只需少量的血，但還在實驗室階段[46]。

同一種腫瘤標記在用來篩檢和用來診斷的判讀值應當不同。篩檢值異常才會引起注意，接受進一步檢查，因此臨界值(cut-off value)降低，可以提高敏感度，但犧牲了特異度，增加偽陽性率。若提高臨界值，可以提高特異度，但犧牲了敏感度[4]。

#### (十一之一) 甲型胎兒蛋白(AFP)

甲型胎兒蛋白(alpha-fetoprotein,  $\alpha$ FP, AFP)屬於  $\alpha$ -1 球蛋白，是一個分子量 70 千道耳吞的單鏈糖蛋白，分子結構包含 591 個胺基酸及 4% 碳水化合物，由第四對染色體長臂(4q11-q13)基因調控，在人類胎兒的肝臟、卵黃囊及胃腸道等處，由中胚葉起源的細胞(Mesoderm-derived cells)所合成分泌，半衰期 5 到 7 天[47]。可經由胎兒的腎臟排入尿液、羊水，並通過胎盤進入母體血液中。在正常妊娠時，胎兒血清之 AFP 濃度於妊娠第一期，約 12-14 週達到最高，而母體血清中之濃度於 28-32 週間達到最高值。如果羊水或母體血清中 AFP 超過正常範圍，需考慮母親多次懷孕或胎兒發育異常；諸如：神經管缺陷、先天性腎病變、腹壁缺陷、腸道閉鎖、死胎、胎兒窘迫等等，懷有唐氏症兒 Down syndrome 或愛華氏綜合症三染色體 18



(Edward's Syndrome Trisomy 18)之孕婦其血液中 AFP 則偏低。AFP 雖是一項非特異指標，但對產前評估胎兒健康狀態甚具臨床價值，是幫助檢查胎兒異常的一項篩檢工具。AFP 在正常成人血清中雖低，但仍測得到。

1963 年 Abelev 等人首先發現老鼠的肝癌會製造甲型球蛋白 (Alpha - Globulin)[48]，次年俄國人 Tatarinov 發現人類肝癌病患也會產生胎兒甲型球蛋白 (Embryo -Specific Alpha - Globulin)[49]，四十多年以來 AFP 一直被用於篩檢肝癌的血清腫瘤標記，但敏感度也一直受爭議[4, 50, 51]。在 1990 年代有三篇設計完善的研究，以 AFP 篩檢肝癌顯示敏感度 39% 到 64%，特異度 76% 到 91%，陽性預測值 9% 到 32%[38, 39, 52]。2001 年義大利 Trevisani 等比較 170 位肝癌和 170 位慢性肝病者，選擇 AFP 篩檢值 20 ng/ml 來預測肝癌，敏感度與準確度有最佳平衡，各為 60%與 90%。這表示要想從慢性肝病、肝硬化的病患中以 AFP 大於 20 ng/ml 來預測肝癌，警示應啟動進一步放射線檢查，會發生 40%肝癌病患因為 AFP 小於 20 ng/ml 而沒有啟動進一步放射線檢查，導致延誤診斷[53]。

一般取篩檢值 20 ng/ml 以上要懷疑有肝癌[53]。約 75%的進行性肝癌其血清 AFP 值高於正常值，但是急、慢性病毒性肝炎合併嚴重壞死性發炎、肝硬化、肝臟損傷、孕婦、睪丸癌等患者，其血中 AFP

值也會上升到 10 到 500 ng/mL 甚至 1000 ng/mL 卻不是肝癌[54]。急性慢性肝炎患者，其血中 AFP 常隨著肝細胞壞死後再生而升高，其高峰往往在轉胺酶的高峰之後，其升高程度間接地反應肝細胞壞死(橋聯壞死，Bridging Hepatic Necrosis)後的再生能力，因此常被用來作為病理變化及病程預後的參考，可能與肝臟幹細胞(橢圓細胞，oval cell)有關[55, 56]。雖然在慢性肝炎的病患也可能出現 AFP 高達 2520 ng/ml 的情況[56]，在其他惡性腫瘤及非癌肝病只有 0.8% 病患的 AFP 會高於 400 ng/ml[57]，因此肝癌的 AFP 診斷值通常設定為 400 ng/ml，門檻低於 1974 年設定的 500 ng/ml[58]。

臨床上若診斷出肝癌時 AFP 已經升高，也可用 AFP 來評估治療效果，追蹤有無復發或轉移[59]。大約 40% 左右的肝癌病人其 AFP 值仍小於 20 ng/ml [53]，若未加做腹部超音波的檢查也無法察知有小型肝癌，因此以 AFP 單獨作為肝癌篩檢的工具並不恰當。這也是 Sherman 批評 McMahon 自從 1980 年代中期在地廣人稀的阿拉斯加單獨使用 AFP 作為肝癌篩檢的工具，未加做腹部超音波的檢查的做法仍不適當的原因，他們以濾紙上乾燥的血滴(室溫可以保存一個月以上[60])檢驗 AFP 濃度，陽性才後送到安克拉治進一步檢查，雖然號稱敏感度 94.1%，特異度 99.9%，但發現的可能都是晚期肝癌[61-63]。

AFP 的表現特性不因慢性 B 型或 C 型肝炎的感染不同而有差異

[53]。比較五篇研究分析 AFP 與慢性 C 型肝炎相關的肝癌的關係，發現取 AFP 值大於 20  $\mu\text{g/L}$ ( $\text{ng/ml}$ )為篩檢標準，敏感度只有 41% 到 65%，準確度有 80% 到 94%；取 AFP 值大於 200  $\mu\text{g/L}$  為篩檢標準，則敏感度只有 20% 到 45%，準確度有 99% 到 100%[64]。若混入其他原因造成的肝癌(慢性 C 型肝炎相關的肝癌約占 50%，混入慢性 B 型肝炎相關或酒精性肝硬化相關)分析，則 1158 位病患中有 46% AFP 值小於 20  $\text{ng/ml}$ ，36% AFP 值介於 21 到 400  $\text{ng/ml}$ ，18% AFP 值大於 400  $\text{ng/ml}$ ，取 AFP 值大於 20  $\text{ng/ml}$  為篩檢標準，敏感度只有 54%[65]。

以免疫組織染色染肝癌組織的 AFP 表現，染色強度及總面積與血清中 AFP 值有相關[66]。早期報告血中 AFP 值與肝癌細胞組織型態無關，但同一位病患的 AFP 與腫瘤持續變大、切除後復發與轉移有正相關[59]。後續報告肝癌屬於分化不良的患者，血中 AFP 值較高[57]。AFP 值大於 400  $\text{ng/ml}$  與肝癌分化不良(Edmonson score)有正相關[65]。

AFP-L3 則是 AFP 的一種糖型(glycoform)。AFP 與凝集素(lectin)中的小扁豆凝集素(lens culinaris agglutinin, LCA)結合力不同可分成的三種不同的糖型：AFP-L1、AFP-L2 及 AFP-L3。AFP-L3 能和小扁豆凝集素結合，故直稱 Lens culinaris agglutinin reactive AFP。AFP-L3 診斷肝癌的敏感度 36%到 96%，特異度 53%到 94%[67]，雖然

有報告指出以 AFP-L3 在 AFP 中所佔比率升高大於 10%，比單一 AFP 值有較高的診斷能力[68]。但考慮到 AFP-L3 若在 AFP 小於 18 ng/ml 的情況下，會有 92%測不到而沒有數據值(non-detectable or non-reportable value)[67]，且只能將血清郵寄到美國 Wako 公司檢測，提供數據值，報價很高，若又是很多測不到數據值，在研究經費有限的情況下，我們放棄 AFP-L3 的研究。

### (十一之二) 脫羧基凝血酶原(DCP, PIVKA-II)

脫羧基凝血酶原(des- $\gamma$ -carboxy prothrombin, DCP或protein induced by vitamin K absence or antagonist II, PIVKA-II)是異常凝血酶原。凝血酶原(Prothrombin)是一個分子量72千道耳吞的糖蛋白，是倚賴維生素K的血漿凝血因子，由肝臟製造，含有一個天門冬醯胺(asparagine)糖基複合物。凝血酶原的前驅物的胺基端結構域(NH<sub>2</sub>-terminal domain)包含10個麩胺醯胺(glutamine)的醯胺殘基(amide group)，在維他命K存在或是它由肝細胞粗糙內質網排出時，其醯胺殘基會接受 $\gamma$ 羧化( $\gamma$ -carboxylation)而形成活性凝血酶原。當凝血酶原不正常時，其中的部分或全部10個麩胺醯胺殘基(glutamic acid residues)都不會被作用，稱為脫羧基凝血酶原(des- $\gamma$ -carboxy prothrombin, DCP)或通過維生素K缺乏或拮抗劑誘

導的蛋白質(protein induced by vitamin K absence or antagonist II, PIVKA-II, 異常凝血酶原), 半衰期40到72小時[69, 70]。肝癌組織因為基因缺損不能合成羧基化凝血酶原, 以致血清中出現此種異常凝血酶原, 不具有凝血功能[71]。PIVKA II的缺點是血液中維生素K低下的病人即使沒有肝細胞癌也能出現陽性反應, 長期阻塞性黃疸、肝內膽汁鬱積維生素K低下、服用Warfarin、維生素K及某些抗生素都會影響到PIVKA II的正確度[70, 72, 73]。

Liebman等於1984年首度報告以多株抗體進行放射免疫分析(Radioimmunoassay, RIA)發現肝癌病患有較高的血清PIVKA-II濃度[74]。其後PIVKA-II就被當成肝癌的血清腫瘤標記之一, 因為慢性肝炎與肝硬化的病患血清PIVKA-II很少升高, 對肝癌較有特異性, 但敏感度極低, 尤其是小肝癌, 變成和AFP一樣無法偵測出早期肝癌[75-77]。其後以血清酵素免疫分析法(Enzymeimmunoassay, EIA或Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)發展出新一代高敏感度分析組(high-sensitive assay kit)[78], 就有了比較好的偵測效果[79-83]。目前的臨界值設為40 mAU/ml (1 arbitrary unit 等於1  $\mu$ g/ml凝血酶原), 各篇報告的敏感度有48% 到62%, 特異度有81% 到98%, 正確性有59% 到84%[70, 84-91]。相對於這些文章中的AFP敏感度有40% 到54%, 特異度有88% 到97%, 並不遜色。研究報告DCP陽性

的肝癌比DCP陰性的肝癌有更高比率的肝內轉移、門靜脈侵犯、肝靜脈侵犯、包膜侵犯[74, 92-95]及較差的存活率[72]。

因為DCP與AFP彼此都不相關，兩者的敏感度也都不太好，義大利Grazi報告將兩者混合測試能提高準確度，DCP及AFP的敏感度、特異度及準確度分別為:53.3% ,88.1% ,71.1%與54.9% ,97.4% ,76.6%，兩者合測為74.2% ,87.2% ,80.9%[88]，其他的報告也有提高肝癌偵測敏感度、特異度的效果[72, 91, 96]。將DCP與AFP-L3混合測試也能提高肝癌偵測敏感度[97]。

### (十一之三) 磷脂肌醇蛋白聚糖3 (GPC3)

磷脂肌醇蛋白聚糖 3(Glypican-3 , GPC3)是硫酸乙醯肝素糖蛋白(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)的一個成員，分子量 69 仟道耳吞，分子結構包含 580 個胺基酸，調控基因 GPC3 位於 X 染色體長臂(Xq26.1)[98]。它藉由糖基化磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidylinositol)共價結合而錨定在細胞表面。硫酸乙醯肝素糖蛋白(HSPG)廣泛存在於哺乳動物的細胞表面，主要有兩大類：一類屬於穿越膜的蛋白聚糖，稱為粘結蛋白聚糖(syndecan)，已發現有 4 種，共同構成一個家族；另一類是通過與糖基磷脂酰肌醇共價結合而錨定在細胞表面，稱為磷脂肌醇蛋白聚糖(glypican)，已發現有 6 種，共同構成一個家族[99-101]。Glypican-4 與 Glypican-6 可以在

成人肝臟中找到[102, 103]。

台灣大學許輝吉教授發現 GPC3 mRNA 可在 74.8% 的原發及復發性肝癌上測得，但正常肝臟中只有 3.2% 測得到。在肝癌組織中 GPC3 mRNA 比 AFP 更容易測得(88%比 55%)，在小於 3 公分的肝癌又更明顯(77%比 43%)[104]。瑞士 Zhu 醫師發現 75% 的肝癌有 GPC3 mRNA 的過度表現，但在局部增生性結節(focal nodular hyperplasia)及肝硬化中並沒有，因此推論 GPC3 應該是一個能夠區分良性及惡性肝組織的標記[105]。韓國 Sung 醫師進一步以免疫組織染色研究發現 72% 的肝癌細胞株陽性，但正常肝臟及良性肝病變則沒有[106]。以血清酵素免疫分析法研究發現 40% -53% 的肝癌病患血清陽性，而健康捐血者及慢性肝炎病患則沒有，加拿大 Capurro 醫師報告 20 位慢性肝炎相關的肝硬化只有一位血清呈陽性，日本 Nakatsura 醫師檢測 13 位肝硬化，34 位慢性肝炎及 60 位健康捐血者皆呈陰性[107, 108]。

GPC3 與 AFP 彼此不相關，診斷肝癌的敏感度各為 53% 與 54%，兩者混合測試肝癌也可以增加敏感度至 82%，卻未降低特異度[108]。

東京大學 Hippo 等人檢測 69 位肝癌，38 位肝硬化及 96 位健康者，觀察到 GPC3 的胺基端(NH<sub>2</sub>-terminal)在 Arg<sup>358</sup> 和 Ser<sup>359</sup> 之間與錨定於細胞膜的羧基端(COOH-terminal)斷離，胺基斷端可以釋放溶解到血液中(soluble GPC3, sGPC3)而被偵測到，選擇 sGPC3 篩檢

值 2 ng/ml，敏感度 51%，特異度 90%，AFP 篩檢值 20 ng/ml，敏感度 55%，特異度 90%。AFP 與可溶性 GPC3 不相關，兩者皆測可將敏感度提升到 72%[109]。因此 GPC3 應該是值得進一步研究的血清腫瘤指標。

## 第二節 研究目的：

本臨床試驗在比較血清腫瘤標記甲型胎兒蛋白(AFP)、脫羧基凝血酶原(DCP)及磷脂肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)做為篩檢的工具對肝癌診斷的敏感度及特異度，期望能早期發現肝癌，病患能早期接受治療。

## 第二章 研究方法：

### 第一節 研究材料：

#### (一) 血清來源：

選取民國九十二年九月至九十五年八月間在中國醫藥大學附設醫院消化內科就診追蹤的 300 位慢性 B 或 C 型病毒性肝炎相關病患的冷凍血清。每位病患於抽血時皆簽署抽血同意書，抽出的血液皆冷凍於攝氏負 80 度的冰箱中。其中慢性病毒性肝炎 100 位、肝硬化 80 位、肝癌有病理報告證實者 120 位。各組 B 型與 C 型肝炎相關病患各占一半，排除同時有慢性 B 及 C 型病毒感染的患者、未證實為慢性 B 或 C 型病毒性肝炎患者、酗酒患者及抽血時正在服用維他命 K 的患者。慢性 B 或 C 型病毒性肝炎 300 位病患皆有甲型胎兒蛋白(AFP，美國



DPC)、脫羧基凝血酶原(DCP, 法國 Stago)檢驗, 264 位病患(88%)加做磷脂肌醇蛋白聚糖 3(GPC3, 美國 BioMosaics)檢驗。

## (二) 腫瘤標記之測量:

AFP 使用 IMMULITE® AFP, 為美國 Diagnostic Products Corporation (DPC) 的產品, 由中國醫藥大學附設醫院使用 IMMULITE® 2000 全自動化學發光免疫分析儀判讀。

DCP 使用 Asserachrom®, 為法國 Diagnostica Stago 的產品, 使用中國醫藥大學醫學檢驗生物技術研究所的分光光度計 (spectrophotometry) 判讀。

GPC3 使用 GPC3®, 為美國 BioMosaics 的產品, 使用中國醫藥大學醫學檢驗生物技術研究所的分光光度計判讀。

DCP/PIVKA-II ELISA 的檢測類型為三明治法(sandwich), 步驟如下:

1. 每個微量盤(MicroPlates)有 96 個微小孔(microwell), 已經先行鋪覆上老鼠的 F(ab')<sub>2</sub> 斷片單株抗體(anti-PIVKA-II), 抗體對人體脫羧基凝血酶原(PIVKA-II, P1-2B9)有特異性, 對原始的凝血酶原(prothrombin)不會反應。
2. 加入待測血清檢體, 檢體中若含有待測之 PIVKA-II, 則其會與塑膠孔盤上的單株抗體進行專一性鍵結。

3. 洗去多餘待測檢體。
4. 加入兔子連結有呈色酵素(山葵過氧化氫酶 horseradish peroxidase, HRP)的抗凝血酶原免疫球蛋白 (anti-II peroxidase)，可與 PIVKA-II 分子其他抗原決定基(antigenic determinant 或 epitope)結合。
5. 洗去多餘未鍵結二次抗體。
6. 加入發色體的受質：這個酶與抗體的結合最後在過氧化尿素(Urea Peroxide)催化下與鄰苯二胺(ortho-phenylenediamine, OPD)結合。
7. 洗去多餘檢體。
8. 以硫酸(sulfuric acid, sulphuric acid)終止反應。
9. 以微量盤偵測系統(Microplate Reader, ELISA Reader)用主波長 490 nm 讀取吸光值(Optical Density, O.D. 值)。

GPC3 ELISA 的檢測類型為三明治法(sandwich)，使用兩種 GPC3 的專一抗體。欲測試的血清或標準試液必須各化驗一次 (duplicate)，同一塊微量盤測試時必須同時畫出標準曲線。檢測步驟如下：

1. 第一種抗體先行固定在所購買的微量盤上的微小孔，kit 必須儲存於 2°C-8°C，使用時取出 kit 在室溫下回溫 1 小時。
2. 血清中不再加入樣品稀釋緩衝液稀釋。

3. 將欲測試的血清及 GPC3 標準試液加入微小孔，在 4°C 下孵育過夜 (12-18 小時<sup>December 5, 2006 版</sup>)。
4. 洗去多餘待測檢體。
5. 加入第二種對抗原專一之非放射性核酸標示抗體(biotinylated detector antibody)(二次抗體)，在 4°C 下孵育過夜(12-18 小時<sup>December 5, 2006 版</sup>)。
6. 洗去多餘未鍵結二次抗體。
7. 加入與呈色酵素(山葵過氧化氫酶 horseradish peroxidase)連結的鏈抗生物素蛋白(streptavidin)，可與標示抗體結合。在室溫下孵育半小時<sup>December 5, 2006 版</sup>。
8. 洗去多餘檢體。
9. 加入發色體的受質：四甲基聯苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)。無色的 TMB 在過氧化物酶的作用變成藍色物質。在室溫下孵育半小時<sup>December 5, 2006 版</sup>。
10. 以硫酸(sulfuric acid, sulphuric acid)終止反應。無色的 TMB 在過氧化物酶的作用變成藍色物質，再加入硫酸終止反應劑呈黃色。
11. 以分光光譜儀(Spectrophotometer)用波長 450 nm 及 550 nm 讀取吸光值(Optical Density , O. D. 值)。

區別肝癌與其他兩種非肝癌疾病的臨界值(Cut-off value)，甲

型胎兒蛋白(AFP)依照文獻慣例為 20 ng/ml[53]，脫羧基凝血酶原(DCP)及磷脂肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)則依 ROC 曲線選定 6 ng/ml 及 170 pg/ml，進一步分析數據。

## 第二節 研究設計：

本研究採橫斷式個案對照研究(cross-sectional case control study)，只選取與慢性 B 或 C 型病毒性肝炎有關的肝癌病患為研究對象，排除單純酒精性肝炎或合併慢性 B 與 C 型病毒性肝炎患者。肝癌病患多需經歷長期的慢性 B 或 C 型病毒性肝炎或進一步有肝硬化之後被診斷出來。慢性 B 或 C 型病毒性肝炎組或肝硬化組病患於追蹤一年後以超音波影像檢查及血清甲型胎兒蛋白(AFP)排除無罹患肝癌的可能性之後，再選取病患一年前的冷凍血清分析，但因並非所有肝癌病患都是長期於本院追蹤的患者，故肝癌組病患只收取肝癌穿刺生檢時或手術前的冷凍血清分析。

每位病患皆有甲型胎兒蛋白(AFP)檢測值，其冷凍血清再加做脫羧基凝血酶原(DCP)及磷脂肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)檢驗，由於經費的受限，我們只抽樣 264 位(88%)病患做 GPC3。未做者 36 位(12%)分布於慢性病毒性肝炎 11 位(其中 B 型肝炎肝組，肝指數(丙胺酸轉胺酶，ALT)異常但 AFP 正常 3 位，ALT 異常且 AFP 異常 3 位；C 型肝炎組，ALT 正常及 AFP 正常 2 位，ALT 異常但 AFP 正常 2 位，ALT 異常且 AFP

異常 1 位);肝硬化組 14 位(其中 B 型肝炎組 6 位,C 型肝炎組 8 位);  
肝癌組 11 位(其中 B 型肝炎組,尚無肝硬化 2 位,已有肝硬化 4 位;  
C 型肝炎組,已有肝硬化 5 位)。

慢性 B 或 C 型病毒性肝炎病患為血液 HBsAg 陽性或 anti-HCV 陽性的病患,ALT 及 AFP 正常或異常,且追蹤一年以上為收案標準。肝硬化組病患則以慢性 B 或 C 型病毒性肝炎患者臨床無併發症但腹部超音波檢查有瀰漫性肝實質病變分數 8 分以上(達肝硬化標準)與血液中血小板偏低(小於 14 萬)或臨床併發肝性腦病變、腹水、食道靜脈曲張(或有出血)、自發性細菌性腹膜炎,且追蹤一年以上為收案標準。肝癌病患則皆有病理切片肝癌的分化(grading)報告(依 Edmondson 與 Steiner 分類法),且依照 CLIP(Cancer of the Liver Italian Program)及 TNM(Tumor-Node-Metastasis)分期。

50 位慢性 B 型病毒性肝炎病患中包括 10 位追蹤過程中 ALT 正常及 AFP 正常;20 位 ALT 異常(介於 1 倍到 18.6 倍 ALT 正常上限)但 AFP 正常;20 位 ALT 異常(介於 1 倍到 49.5 倍 ALT 正常上限)且 AFP 異常。50 位慢性 C 型病毒性肝炎病患中包括 10 位追蹤過程中 ALT 正常及 AFP 正常;30 位 ALT 異常(介於 1 倍到 55.7 倍 ALT 正常上限)但 AFP 正常;10 位 ALT 異常(介於 2 倍到 8.4 倍 ALT 正常上限)且 AFP 異常。

肝內纖維化的評估以肝組織切片經特殊染色(如 Masson

Trichrome)後在顯微鏡下觀察肝炎及纖維化的程度。本院採取的評估方式為 METAVIR 分級系統。肝內纖維化分成 F0 到 F4 五個等級。F0 表示肝內完全沒有纖維化，F1 表示只有在肝門脈區有纖維化，F2 表示在肝門脈區有纖維化且併有少量中隔狀纖維，F3 表示有中隔狀纖維且形成橋狀連結，F4 表示已達肝硬化。

### 第三節 統計方法：

以 excel 與 SPSS 登錄病患資料，與中國醫藥大學生物統計中心合作，以 one-way ANOVA、Chi-Square test、Pearson Correlation 與 Spearman Correlation 分析整理結果。

## 第三章 研究結果：

### 第一節 描述性統計分析：

#### (一) 年齡：

300 百位病患中，肝癌及肝硬化組別平均年齡為 61 歲及 58 歲，比慢性 B 或 C 型病毒性肝炎組的 45 歲要年長。其中肝癌在 C 型肝炎組平均年齡為 66 歲要比 B 型肝炎組的 56 歲大 10 歲。肝硬化在 C 型肝炎組平均年齡為 62 歲要比 B 型肝炎組的 53 歲大 9 歲。慢性病毒性肝炎在 C 型肝炎組平均年齡為 49 歲要比 B 型肝炎組的 41 歲大 8 歲(表 1、3、5)。

#### (二) 性別及肝癌大小：

肝癌病患中有 73% 是男性，在 B 型肝炎組有 78% 是男性，C 型肝炎組有 67% 是男性。男性病患的比率在慢性病毒性肝炎組為 59%，肝硬化組為 55%，肝癌組則升到 73%，顯示男性病患依然較容易罹癌肝癌 ( $p=0.023$ ) (表 2、4、6)。

肝癌大小平均 4.1 公分，B 型肝炎相關與 C 型肝炎相關的肝癌大小平均各為 4.3 公分與 4 公分。肝癌大小的比例，小於等於 2 公分占 23.3%、2 到 3 公分占 25.8% 及大於 3 公分占 50.8%。B 型肝炎相關與 C 型肝炎相關在肝癌小於等於 2 公分、2 到 3 公分及大於 3 公分三組的比例各為 23.3%、18.3%、58.3% 與 23.3%、33.3%、43.3%。(表 7、8)

### (三) 肝癌與 CLIP 分期、TNM 分期、HCC 分化：

肝癌病患的 CLIP 分期，0 分到 2 分占 83.3%，3 到 6 分占 16.7%。肝癌病患的 TNM 分期，1 分到 2 分占 76.7%，3 分到 4 分占 23.3%。肝癌的分化(grading)，1 級到 2 級占 55.8%，3 級到 4 級占 44.2%(表 8)。

### (四) 三種腫瘤標記與慢性肝炎、肝硬化及肝癌：

三種腫瘤標記與肝癌的分化(grading)與分期(CLIP 及 TNM)皆無明顯相關(表 8)。

三種腫瘤標記之中僅 DCP 能夠區分出肝癌與非肝癌( $P<0.0001$ )

(表 1)，ROC 曲線下的面積(area under the receiver operating characteristic curve) AFP 為 0.719(臨界值取 11.6 ng/ml)及 0.624(臨界值取 20 ng/ml)，DCP 為 0.676，GPC3 為 0.497，三者合測為 0.765。顯示三者混合測試肝癌也可以增加敏感度，AFP 雖然已有 40 多年歷史，依然有其診斷能力 (圖 2、3)。

依照肝癌的大小分成小於等於 2 公分、2 到 3 公分及大於 3 公分三組來檢視三種腫瘤標記，只有 DCP 的偵測值接近有統計意義 (P=0.0566)，AFP 與 GPC3 則無。但實際上 DCP 取臨界值 6 ng/ml，肝癌小於等於 2 公分只有 10.7% (3/28)陽性、2 到 3 公分有 38.7% (12/31)陽性、大於 3 公分有 49.2% (30/61)陽性。AFP 取臨界值 20 ng/ml，肝癌小於等於 2 公分有 32.1% (9/28)陽性、2 到 3 公分有 48.4% (15/31)陽性、大於 3 公分有 54.1% (33/61)陽性。GPC3 取臨界值 170 pg/ml，肝癌小於等於 2 公分有 46.4% (13/28)陽性、2 到 3 公分有 39.3% (11/28，3 人未測)陽性、大於 3 公分有 60.4% (32/53，8 人未測)陽性(表 10)。

對肝癌診斷的診斷正確性、敏感度、特異度分別為甲型胎兒蛋白 (AFP)：68.3%、47.5%、82.2%；脫羧基凝血酶原(DCP)：71%、39.2%、92.2%及磷脂肌醇蛋白聚糖 3(GPC3)：50.8%、52.3%、49.7%。三種指標至少有一陽性為 56.8%、79.8%、40.6%(表 11)。



AFP 與 GPC3 在考慮母群體以 Pearson correlation 檢測發現有正相關 0.444( $p < 0.05$ )；AFP 與 DCP 在不考慮母群體以 Spearman correlation 檢測發現有正相關 0.215( $p < 0.05$ ) (表 12、圖 1)。

#### (五) 丙胺酸轉胺酶與慢性肝炎、肝硬化及肝癌：

肝發炎指數丙胺酸轉胺酶(ALT)在慢性病毒性肝炎組雖有包括了健康未發炎者但平均仍較高，肝硬化組次之，肝癌組發炎指數最低，可能意味著時間更久，肝損傷程度更嚴重。肝癌組中 C 型肝炎組的肝發炎指數(平均 89.35 IU/L)仍高於 B 型肝炎組(平均 54.72 IU/L) (表 1、3、5)。

#### (六) 血小板指數與慢性肝炎、肝硬化及肝癌：

血小板指數在肝硬化組最低，肝癌組平均則在正常值的下限，顯示肝硬化組的血小板破壞較嚴重，但肝癌組中 C 型肝炎組(57.6%異常，平均 134.59)可能比 B 型肝炎組(48.3%異常，平均 158.63)更嚴重(表 1、3、5)。

#### (七) 肝癌組中 C 型肝炎與 B 型肝炎之不同：

肝癌組中 C 型肝炎組與 B 型肝炎組有意義的差別在於年齡與肝功能 ALT。肝癌在 C 型肝炎組比 B 型肝炎組年齡大 10 歲，ALT 在 C 型肝炎組(平均 89.35 IU/L)高於 B 型肝炎組(平均 54.72 IU/L)。其他在三種腫瘤標記及平均腫瘤大小均無明顯差異(表 7)。

## (八) 肝癌併肝門靜脈栓塞：

肝癌組全部 120 位，其中 8 位有肝門靜脈栓塞(portal vein thrombosis, PVT，一般指腫瘤栓塞侵犯)，三種腫瘤標記均無法區分，只有大小有顯著差異，顯示腫瘤愈大愈容易有門靜脈侵犯(表 9)。

### 第二節 推論性統計分析：

性別、年紀、血小板指數及肝炎指數對 AFP、DCP 及 GPC3 三種腫瘤標記勝算比差別不大，對指數值影響不大(表 13)。

## 第四章 討論：

### 第一節 結果討論：

#### (一) 肝炎肝硬化肝癌三部曲的年齡：

300 百位病患中，肝癌及肝硬化組別平均年齡為 61 歲及 58 歲，比慢性 B 或 C 型病毒性肝炎組的 45 歲要年長，顯示仍是有肝癌三部曲的發病病程。其中肝癌在 C 型肝炎組平均年齡為 66 歲要比 B 型肝炎組的 56 歲大 10 歲。肝硬化在 C 型肝炎組平均年齡為 62 歲要比 B 型肝炎組的 53 歲大 9 歲。慢性病毒性肝炎在 C 型肝炎組平均年齡為 49 歲要比 B 型肝炎組的 41 歲大 8 歲。這兩種肝炎都是經血液，針扎等傳染，慢性 B 型肝炎常見經由母體垂直傳染，生下來就被傳染了，而慢性 C 型肝炎可能更晚才感染，故 B 型肝炎組的平均年齡較低。

民國 95 年肝癌死亡年齡中位數為 67 歲，男性 65 歲，女性 71 歲，

男性比女性少 6 歲。而慢性肝病及肝硬化患者死亡年齡中位數為 58 歲，男性 53 歲，女性 70 歲，男性比女性少 7 歲。我們的數據顯示罹患肝癌平均年齡為 61 歲，罹患肝硬化平均年齡為 58 歲。我們的肝癌病患經治療後要多活 6 年，不太容易。肝癌治療的效果依台大黃冠棠教授的報告，肝癌 1 或 2 顆，皆小於 3 公分的病患隨機接受手術根除 (38 位) 或經皮酒精注射 (38 位)，治療後 5 年的存活率各為 81.8% (手術) 與 46% (酒精注射) [10, 24]。可能我們的肝癌篩檢降低了肝癌診斷年齡，而肝硬化病患相對屬於較末期的患者。

## (二) 肝癌的形成以組織發炎壞死的間接影響為主：

肝癌的產生方式一般分成兩種路徑：直接肝癌生成 (de novo) 或由分化不良的結節中生成。可以是病毒本身的直接影響或組織發炎壞死 (necroinflammation) 導致肝硬化的間接影響。但以往認為病毒本身的直接影響，在 B 型肝炎病毒有因為是 DNA 病毒的 HBV DNA 嵌合 (integration) 及 HBx 蛋白等的刺激影響，而 C 型肝炎病毒是 RNA 病毒，沒有 DNA 嵌合，只有 core 蛋白的刺激影響。因此應該有一族群的慢性 B 型肝炎患者容易跳過組織發炎壞死致肝硬化階段而直接因 HBV DNA 嵌合而產生肝癌。而 C 型肝炎相關的肝癌幾乎都有肝硬化，表示 C 型肝炎病毒大多是間接引起肝癌 [2]。我們的這些數據不足以解釋 B 型肝炎病毒 DNA 嵌合這個族群的存在，顯示肝癌的形成仍以組織發炎壞死的間

接影響為主，Beasley醫師1981年在台灣的研究有慢性B型肝炎帶原者在30歲前得到肝癌的機率是可以忽略(negligible)的結論[4, 110]。

### (三) 三種腫瘤標記的相關性：

在考慮母群體以 Pearson correlation 檢測發現 AFP 與 GPC3 有正相關  $r=0.444(p<0.05)$ ，假設 GPC3 是肝臟中的肝門區的源祖細胞 (progenitor cell)，在 AFP 之外所製造的另一個癌胚胎蛋白 (oncofetal protein)，假設肝癌生成 (hepatocarcinogenesis) 的原因是源祖細胞增生 [111]，則這個結果合理。在不考慮母群體以 Spearman correlation 檢測發現 AFP 與 DCP 有正相關  $r=0.215(p<0.05)$ 。

### (四) 甲型胎兒蛋白：

甲型胎兒蛋白 (AFP) 是一種癌胚胎抗原 (oncofetal antigen)。它是在一些胚源細胞腫瘤 (germline tumor) 內被釋放，例如畸胎瘤 (teratoblastoma)，睪丸癌和卵巢癌 (testicular and ovarian carcinomas)，肝細胞癌以及肝臟疾病如肝硬化，肝炎，肝臟壞死。義大利 Farinati 醫師報告 AFP 大於 400 ng/ml 與肝癌分化不良 (Edmonson score) 有正相關 [65]。我們的數據顯示三種腫瘤標記與肝癌的分化 (grading) 與分期 (CLIP 及 TNM) 皆無明顯相關 (表 8)。肝癌小於等於 2 公分有 32.1% (9/28) AFP 陽性、2 到 3 公分有 48.4% (15/31)

AFP 陽性、大於 3 公分有 54.1% (33/61) AFP 陽性。AFP 有較好的 ROC 曲線下的面積，AFP 為 0.719(臨界值取 11.6 ng/ml)及 0.624(臨界值取 20 ng/ml)，DCP 為 0.676，GPC3 為 0.497，顯示 AFP 雖然歷史悠久，依然有其診斷能力，與義大利 Trevisani 與台北榮總霍德義醫師的報告相似[53, 112]，與 Sherman 的看壞 AFP 有不同[61]。

#### (五) 脫羧基凝血酶原：

DCP目前文獻上常使用兩家公司的產品：日本Eisai的MonoP-II<sup>®</sup>以及法國Stago的Asserachrom<sup>®</sup> PIVKA-II。Eisai的MonoP-II<sup>®</sup>屬於傳統型，敏感度較低，改良後為Eitest PIVKA-II kit[113]，目前已經推出更新一代化學螢光反應(Chemiluminescence)Kit：LUMIPULSE<sup>®</sup> PIVKA-II，但必須有其特定的LUMIPULSE<sup>®</sup>機器判讀；Asserachrom<sup>®</sup> PIVKA-II只需使用一般分光光度計判讀，也是我們選擇購買的原因。

德國Lamerz等醫師比較兩者在區分惡性與良性肝病的能力，在敏感度、特異度、陽性預測值、陰性預測值分別為Eisai的MonoP-II<sup>®</sup>：78.6%、90%、0.92、0.70(臨界值0.09 AU/ml)與Stago的Asserachrom<sup>®</sup>：77.9%、90%、0.93、0.70(臨界值0.8 ng/ml)，都比AFP的58.4%、91%、0.92、0.55(臨界值45 ng/ml)要好，MonoP-II<sup>®</sup>和Asserachrom<sup>®</sup>的kit敏感度差不多[114]。

美國Volk等醫師研究84位肝癌與169位肝硬化患者，發現DCP在

區分肝癌與肝硬化的敏感度與特異度為86%及93%，明顯優於AFP或AFP-L3，但若將患者分成肝癌高危險群與低危險群，則DCP，AFP，AFP-L3三種血清腫瘤標記的敏感度在肝癌高危險群都降低了[67]，這個結論與義大利Trevisani等的報告相仿，以AFP診斷肝癌，在沒有慢性B或C型肝炎感染的族群比較適用[53]。

台灣大學蔡順隆等醫師於1990年發表使用ELISA的方式檢測肝癌病患血漿中DCP的發現，21位小於3公分的肝癌有47.6% DCP上升、18位3到5公分的肝癌有66.7% DCP上升、68位大於5公分的肝癌則有67.6% DCP上升，DCP對肝癌的診斷略遜於AFP，但可以相輔相成[84]。

台北市立醫院王朝欣等醫師使用日本Eisai公司改良的Eitest PIVKA-II kit研究61位肝癌、32位慢性肝炎及34位肝硬化病患，發現區分出肝癌的能力，DCP比AFP更靈敏(77%比59%)，DCP與肝癌大小的相關性比AFP佳，也更能找出小肝癌，肝癌小於等於2公分有50%DCP陽性、2到3公分有66.7% DCP陽性、大於3公分則100% DCP陽性[81]。

但是日本岡山大學Nakamura等人用Eisai公司改良的Eitest PIVKA-II kit或Sanko Junyaku公司的電化學冷光免疫分析法(electrochemiluminescence immunoassay) Picolumi PIVKA-II kit 檢測1377位肝癌及355位慢性肝炎及肝硬化病患，發現肝癌患者DCP與AFP平均值各為60 mAU/mL及34 ng/mL，非肝癌患者各為18 mAU/mL

及3 ng/mL。DCP與AFP的敏感度及特異度分別58%、97%及62%、93%。AUROC值在DCP與AFP各為0.812及0.887( $p < 0.0001$ )。在小於3公分的肝癌，DCP的AUROC值明顯小於AFP的值( $p < 0.0001$ )，DCP與AFP的敏感度各為41%與55%，在大於5公分的肝癌，DCP的AUROC值明顯大於AFP的值( $p < 0.0001$ )，DCP與AFP的敏感度各為95%與78%，因此認為小肝癌的診斷AFP比DCP好，大肝癌的診斷DCP比AFP好[115]，與台北市立醫院王朝欣醫師的結論相反。

我們用法國 Stago 公司的 Asserachrom® PIVKA-II kit 偵測 300 位病患，DCP 取臨界值 6 ng/ml，對肝癌診斷的診斷正確性、敏感度、特異度分別為 71%、39.2%、92.2%，而德國 Lamerz 等使用 Stago Asserachrom® 區別良性與惡性肝病的敏感度及特異度分別 77.9%及 90%(臨界值 0.8 ng/ml)[114]。我們的數據顯示肝癌小於等於 2 公分只有 10.7% (3/28) DCP 陽性、2 到 3 公分 38.7% (12/31) DCP 陽性、大於 3 公分 49.2% (30/61) DCP 陽性，在小於 3 公分的肝癌，DCP 的敏感度為 25.4%(15/59)。比同為台灣的研究，台北市立醫院王朝欣等醫師報告的肝癌小於等於 2 公分有 50%DCP 陽性、2 到 3 公分有 66.7% DCP 陽性、大於 3 公分則 100% DCP 陽性[81]要差。比起日本岡山大學 Nakamura 等醫師的報告，在小於 3 公分的肝癌，DCP 與 AFP 的敏感度各為 41%與 55%，我們的數據為 25.4%(15/59)與 40.7%(24/59)

也較差。或許 Stago 的 Asserachrom® PIVKA-II 敏感度與日本 Eisai 傳統型的 MonoP-II® 相當，敏感度可能較低，不及 Eisai 的 LUMIPULSE® PIVKA-II kit 的偵測能力、使用一般分光光度計比色法與免疫化學冷光系統判讀力不同、儲存血清的誤差、操作程序不熟練都有可能。

#### (六) 磷脂肌醇蛋白聚糖 3：

GPC3 目前只有美國 BioMosaics 公司有商業化 Kit，我們的數據顯示取臨界值 170 pg/ml 為肝癌小於等於 2 公分有 46.4% (13/28) GPC3 陽性、2 到 3 公分有 39.3% (11/28，3 人未測) GPC3 陽性、大於 3 公分有 60.4% (32/53，8 人未測) GPC3 陽性。在小於 3 公分的肝癌，GPC3 的敏感度為 42.9%(24/56)。

GPC3 藉由糖基化磷脂醯肌醇(glycosyl- phosphatidylinositol) 共價結合而錨定在細胞表面。假定 GPC3 是肝臟中的肝門區的源祖細胞(progenitor cell)，在 AFP 之外所製造的的另一個癌胚胎蛋白 (oncofetal protein)，假設肝癌生成(hepatocarcinogenesis)的原因是源祖細胞增生[111]，則 GPC3 釋放於血中的濃度與肝癌組織染色濃度或總面積應該與 AFP 一般呈現相關[66]。

GPC3 的胺基端(NH<sub>2</sub>-terminal)在 Arg<sup>358</sup> 和 Ser<sup>359</sup> 之間與錨定於細胞膜的羧基端(COOH-terminal)斷離，胺基斷端(40kD)可以釋放



溶解到血液中而被偵測到，Hippo 等所用的抗體(A1836A)可以辨識胺基端[109]。Capurro 和 Filmus 則認為他們所用的抗體(1G12)可以辨識羧基端(COOH-terminal)，而且免疫組織染色和血清檢體同樣有效[116]。肝癌細胞既然有過度表現 GPC3 mRNA，則 GPC3 所斷離的可溶部分應該也會高，我們研究所得到的卻是敏感度及特異度皆低。

BioMosaics 公司的操作手冊前後期版本上有將欲測試的血清及 GPC3 標準試液加入微小孔，及加入第二種對抗原專一之非放射性核酸標示抗體，在室溫下孵育 2 小時(April 10, 2006 版)或在 2°C-8°C 下孵育過夜(4°C，12-18 小時，December 5, 2006 版)的不同，是否 kit 穩定度不夠不得而知，我們在實驗操作時仍採用其新版本，在冰箱 4°C 下孵育過夜。另外操作手冊提到到該 ELISA kit 只曾以 heparin 管儲存的血清操作，不曾試過其他種抗凝血劑。因為我們用 EDTA 管儲存血清，可能造成結果有誤差，但是我們也臨時抽了 4 位肝癌病患(其中非 B 非 C 肝硬化肝癌一位、B 型肝炎相關肝癌一位、C 型肝炎相關肝癌一位、B 型加 C 型肝炎相關肝癌一位)及 2 位健康研究生的 heparin 管血清冷凍後測試，所測得的結果 Heparin 管與 EDTA 管相關性皆不大(表 14)。

人類 X 染色體長臂 GPC3 基因的缺損突變會造成 Simpson- Golabi- Behmel 過度生長症候群，磷脂肌醇蛋白聚糖 3 無法與胰島素樣生長因

子-2(insulin-like growth factor-2, IGF-2)形成複合體，無法控制胚胎中胚層組織的生長，男性發病，在出生的前後，組織過度生長，臉像牛頭犬般粗糙，下巴與舌頭微凸，身材高大，幼年時期就容易出現腫瘤及臟器、骨骼的異常[117]。

美國Grozdánov等以老鼠實驗證實GPC3是肝臟中的肝門區的肝母細胞(hepatoblast)，即肝臟中的源祖細胞(progenitor cell)，在AFP之外所表現的另一個癌胚胎蛋白(oncofetal protein)，與胚胎發育及器官生成有關，在老鼠胚胎第13天到第16天的表現最高，到出生前又慢慢遞減，出生三週後肝臟中就測不到。若肝臟損傷造成肝臟中的源祖細胞活化，則會同時表現AFP與GPC3。肝臟中的星狀細胞(Hepatic Stellate Cell)位於源祖細胞旁，但並不具有GPC3的表現，推測源祖細胞以GPC3當做受體接收星狀細胞的訊息[111]。雖然肝癌生成(hepatocarcinogenesis)的原因到底是成熟肝細胞轉化(transformation)或源祖細胞增生還有爭議，有很多證據顯示肝癌來自成熟肝細胞的癌化，但Grozdánov等的老鼠實驗顯示GPC3是肝臟中的源祖細胞的一個標記，出現於早期的肝癌組織[118]，法國Wang等人也發現GPC3比AFP在偵測肝硬化相關的肝癌，敏感度更高，可能是肝癌生成的早期腫瘤標記[119]。但GPC3如何從癌細胞表面斷裂，分泌到細胞中，半衰期多久？仍有待進一步研究。

## (七) 肝癌併肝門靜脈栓塞：

美國紐約 Schwartz 醫師等分析 390 位肝癌切除的病患，發現 22 位小於 2 公分的肝癌有 77%沒有血管侵犯，18%有顯微鏡下血管侵犯，5%有巨觀血管侵犯；44 位大於 10 公分的肝癌則 16%沒有血管侵犯，84%有顯微鏡下血管侵犯，64%有巨觀血管侵犯[120]。久留米大學 Kojiro 教授則統計慢性 C 型肝炎相關，小於 2 公分的肝癌，37 位不清晰結節型中有 5%有顯微鏡下門靜脈侵犯，69 位清晰結節型中有 27%有顯微鏡下門靜脈侵犯[121]。皆顯示了肝癌越大越容易有門靜脈侵犯。

### 第二節 其他相關性討論：

#### (一) 肝癌的肉眼分類：

肝癌的肉眼分類基本上沿用 1901 年提出的 Eggel 分類：結節型 (Nodular，邊界清楚)、巨大型 (Massive，佔據整個左肝或右肝，邊界不清楚或不規則) 及瀰漫型 (Diffuse，小小顆的腫瘤遍佈整個肝臟) 三大類。結節型最常見，又分單顆型 (Single nodular) 及多發型 (Multi-nodular)。日本肝癌研究會則進一步將結節型又分成單純結節型 (simple nodular type)、單純結節併結節外生長 (simple nodular type with extranodular growth)、融合多顆結節型 (confluent multiple type)[122]。浸潤型 (infiltrative type) 則是指邊緣不清楚，不規則，以浸潤方式侵入周圍之正常組織，容易侵

犯門靜脈，容易誤診[6]。

## (二) 肝癌的診斷標準：

臨床上篩檢發現的肝癌的診斷需要依賴其他影像診斷及病理組織的最後確認。目前較常被引用的肝癌診斷標準，是根據2000年歐洲肝臟研究會(European Association for the Study of the Liver, EASL)的結論報告。首先就是肝腫瘤穿刺生檢細胞或病理報告，其次若沒有病理報告，則對於肝硬化的病患兩種情況可以診斷肝癌：第一，依放射線報告：局部腫瘤大於2公分，有高度動脈血管供應，於腹部超音波、高速顯影劑電腦斷層、核磁共振造影及血管攝影四種影像檢查中有至少兩種偵測得到；第二，依放射線與血清AFP報告：局部腫瘤大於2公分，有高度動脈血管供應，於腹部超音波、高速顯影劑電腦斷層、核磁共振造影及血管攝影四種影像檢查中有任一種偵測得到，加上血清AFP大於400 ng/ml[123]。2005年美國肝臟研究會(American Association for the Study of Liver Disease, AASLD)的肝癌處理指導方針則將肝硬化病患接受腹部超音波檢查的結果更細分為局部腫瘤小於1公分，建議每3到4個月追蹤。1到2公分的腫瘤，則三種動態影像檢查(高速顯影劑電腦斷層、顯影劑超音波、核磁共振造影)中，有兩種是典型高度動脈血管供應(動脈相快速顯影，門脈相快速流失)的，當成肝癌治療。只有一種是典型高度動脈血管供應，

或兩種是不典型高度動脈血管供應的情況，則依然需要肝腫瘤穿刺生檢切片檢查。大於2公分的腫瘤，則只需一項動態影像檢查，若是典型高度動脈血管供應或血清AFP大於200 ng/ml，當成肝癌治療；若是不典型高度動脈血管供應，則依然需要肝腫瘤穿刺生檢切片檢查 [24]。

選擇血清甲型胎兒蛋白(AFP)大於400 ng/ml當做肝癌診斷標準的補強方式是根據對慢性病毒性肝炎引起的肝硬化與肝癌的臨床研究[53, 61, 64, 124-126]。美國Hu醫師分析357位慢性C型肝炎但無肝癌的病患，發現AFP大於等於10 microg/L在慢性C型肝炎的發生率有23.0%，包括肝纖維化0到II級、肝纖維化III級與肝纖維化IV級分別為15.3% (28/183)、24.5% (25/102)與42.0% (29/69)[127]。墨西哥Arrieta醫師統計193位肝癌與74位肝硬化的病患資料發現，血清AFP大於200 ng/ml與大於400 ng/ml的特異度皆達100%，但敏感度分別只有36%與20.2%。但若有AFP未達200 ng/ml卻每月增高7 ng/ml，則敏感度可增加到71.4%，特異度也達100%[128]。取AFP大於20 ng/ml的肝癌診斷臨界值敏感度為60%[53]，由於AFP大於400 ng/ml的肝癌診斷值敏感度並不好，2005年美國肝臟研究會的肝癌處理指導方針已將AFP診斷值降低到200 ng/ml，肝癌診斷敏感度只有22%[24]。

根據美國 HALT-C 臨床試驗(Hepatitis C Antiviral Long-term Treatment Against Cirrhosis Trial) 發現1145 位接受治療的慢性 C 型肝炎患者有 191 位(16.6%)AFP 值大於 20 ng/ml，且平均值在肝硬化組比橋連壞死組(bridging fibrosis)要高(22.5 比 11.4 ng/mL， $P < 0.0001$ )。影響 AFP 值增高的因子有肝病的較嚴重程度、女性及黑人種族。且在治療後 AFP 值隨著肝病的嚴重程度改善而下降 [129]，這個現象久留米醫學中心 Murashima 醫師也有相同的報告 [130]。在 1145 位病患中發現有 6 位有肝癌，其中 3 位(50%)AFP 值大於 20 ng/ml [129]。

### (三) 肝癌的顯影劑影像學診斷：

Dynamic CT及MRI對肝癌均具有很好的診斷能力，但是Dynamic CT對大於2公分的肝癌具有85%以上的正確診斷率，對於2公分以下的微小肝癌其正確診斷率則小於50%，其主要原因為小於2公分的肝癌大部分為分化良好的肝癌，缺少動脈血流，故在CT或MRI影像上可能因腫瘤太小而偵測不到，或在早期動脈相因缺少動脈血流而沒有強化顯影(enhancement)，因此無法作出正確診斷。

血管攝影可以依據血流的多寡或特定影像而判定腫瘤屬性，但其敏感性(sensitivity)比 CT 及 MRI 低。但它可提供外科醫師計劃手術

的相關資訊，甚至可順便進行栓塞與局部化學治療。但由於侵襲性較其他影像檢查大，所以通常是外科醫師手術前評估或已準備進行栓塞與局部化學治療時施行。

腹部超音波也可以靠注射靜脈顯影劑增加偵測敏感度，但顯影劑在台灣尚未被核准使用。

#### **(四) 肝癌的病理診斷：**

上述影像診斷都只是間接性診斷，唯有病理切片或抽吸細胞學檢查可以直接取得病灶組織，達到最高的準確性。可惜部份患者會拒絕、已有腹水、黃疸或出血傾向，或是患者無法配合憋氣，病灶所在位置難以切取。

#### **(五) 肝癌的高度的異質性：**

肝癌有高度的異質性(heterogenicity)，義大利 Benvegna 醫師等報告慢性 B 型或 C 型病毒性肝炎引起的肝癌型態並不一致，慢性 B 型病毒性肝炎有較多的浸潤型(infiltrative type)，男性較多，年齡較低[14, 15]。以 DNA 分析慢性 B 或 C 型病毒性肝炎引起的肝癌，基因表現大不相同，表示兩者事實上是不同的疾病，但血清 AFP，DCP 及 GPC3 等腫瘤標記的陽性率在兩者之間沒有差異[131, 132]。

## (六) AFP 或 DCP 陽性的肝癌何者預後較好無定論：

即使是同一位病患，相鄰的兩個肝癌也能有不同的 AFP 或 DCP 表現。日本久留米大學病理科分析 68 位外科切除的小於 3 公分的單顆肝癌，以免疫組織染色分析肝癌組織，有 50%DCP 陽性，而 31%AFP 陽性，顯示 DCP 對小型肝癌的專一度較高( $P < 0.05$ )。16 位患者的肝癌同時有 DCP 及 AFP 陽性，其中 8 位的腫瘤有纖維組織(fibrous septum)將 DCP 及 AFP 陽性區域分隔開，而且依照肝癌組織分化，分化良好的 15 個肝癌有 2 個 DCP 陽性，分化良好且有結節中結節現象(nodule - in -nodule)的 12 個肝癌有 6 個 DCP 陽性；分化良好的肝癌都是 AFP 陰性，中等程度分化的 40 個肝癌有 16 個 AFP 陽性(40%)，中等程度分化且有節結中節結現象的 12 個肝癌有 3 個 AFP 陽性。DCP 及 AFP 組織陽性比率與血清中陽性比率有正相關，且在兩者血清皆陰性時，DCP 組織陽性比率比 AFP 高。AFP 組織陽性的肝癌比起 AFP 組織陰性的肝癌，腫瘤較大、較易有門靜脈侵犯、肝內轉移、高 Ki-67 指數及較低的無復發存活率，因此推論 AFP 組織陽性的肝癌比起 AFP 組織陰性且 DCP 陽性的肝癌生物表現較惡性[69]。這一篇報告比較接近台北市立醫院王朝欣醫師的報告[81]，而和以往的觀察不同，先前報告 DCP 陽性的肝癌比 DCP 陰性的肝癌有更高比率的肝內轉移、門靜脈侵犯、肝靜脈侵犯、包膜侵犯[74, 92-95]及較差的存活率[72]。



九州大學 Suehiro 醫師研究 72 位肝癌小於 6 公分手術切除病患的預後因子，發現 DCP 比起 AFP 有較低的敏感度但有較高的特異度，兩者都測對診斷肝癌有幫助。DCP 陽性的肝癌比 DCP 陰性的肝癌有更高比率的肝內轉移、門靜脈侵犯、肝靜脈侵犯、包膜侵犯，而無復發存活率也較低。肝癌以 AFP 陽性或陰性區分則無此差異。因此推論 DCP 陽性是預測肝內轉移及預後不佳的因子，需要術後密切追蹤復發情況[92]。

#### **(七) C型肝炎相關的肝癌較容易復發：**

大阪大學 Sasaki 等醫師統計 417 位肝癌經根治性手術的病患，66 位(15.8%)為 B 型肝炎相關，351 位(84.2%)為 C 型肝炎相關，術後 3 年、5 年、10 年的無病存活率在 B 型肝炎相關的肝癌為 57%、54%、28%；C 型肝炎相關的肝癌為 40%、24%、12%，明顯 C 型肝炎相關的肝癌容易復發( $P = 0.0001$ )[11]。雖然東京大學 Imamura 醫師統計 249 位肝癌患者經手術切除後的復發率，強調 B 型或 C 型肝炎的感染種類不同並非晚期(二到五年內)復發的危險因子，主要還是活動性肝炎的發炎程度[13]。但也有義大利 Benvegna 醫師等報告 401 位肝硬化病患，接受平均 84.8 個月的定期腹部超音波檢查，77 位(19.2%)發現肝癌，累積 5 年及 10 年的發生率為 10% 及 27.5%。C 型肝炎相關肝硬化病患的肝癌年發生率在最初 5 年為 2%，超過 10 年則增加到 4%，相對於 B 型肝炎相關肝

硬化病患的肝癌年發生率在最初5年為2%，超過10年則降低到0%[15]。兩種不同型態的肝癌各有其危險因子，結節型(nodular type)肝癌年齡平均66.2歲，與肝硬化中肝炎的發炎程度較有相關，與B型或C型肝炎的感染不同無相關，而浸潤型(infiltrative type)肝癌患者較年輕，男性居多，年齡平均59.5歲，與B型肝炎的感染較有相關，可能是HBV DNA直接造成肝癌生成[14, 15]。

#### (八) 降低肝炎發炎程度防止肝癌復發：

臨床治療上慢性C型肝炎相關的肝癌患者手術後接受干擾素治療，可以降低其晚期(二到五年內)復發[133, 134]，但在混有慢性B型肝炎感染的患者，這個降低組織發炎壞死的治療效果就不見了，推測是B型肝炎病毒DNA嵌合對肝癌生成的影響，另一方面可能是干擾素治療慢性B型肝炎的效果本來就比較差[135]。慢性B型肝炎患者的肝臟雖然在肝癌及非肝癌區有找到HBV DNA嵌合，可是可能是機率性不規則插入，以致HBV DNA嵌合相對於組織發炎壞死對肝癌生成的比率沒有特別高，但是一但減少組織發炎壞死，它的影響就顯現出來了。將來慢性C型肝炎相關的肝癌經過干擾素及雷巴威林治療後，肝炎的發炎程度減少，復發率反而比慢性B型肝炎相關的肝癌少，可能可以扭轉Sasaki醫師的報告[11]。而如何能降低慢性B型肝炎相關的肝癌治療後復發則有待努力。

### 第三節 研究限制：

本研究採橫斷式個案對照研究(cross-sectional case control study)，抽血收案的時機慢性 B 或 C 型病毒性肝炎組或肝硬化組病患選取病患一年前的冷凍血清分析，於追蹤一年後以超音波影像檢查及血清 AFP 排除無罹患肝癌的可能性之後確認。肝癌組病患只收取肝癌穿刺生檢時或手術前的冷凍血清分析，因肝癌病患可能是外院轉診的患者，未必有病患一年前的冷凍血清，無法做到個案追蹤式的研究，這是臨床上尚無法克服的。

肝硬化指肝臟有全面性的纖維化與肝內結節形成，診斷的確立宜以腹腔鏡加上肝穿刺生檢最為精確。腹腔鏡可以直接觀察肝臟表面的硬化結節以及肝門脈高壓的一些證據，例如肝表面的淋巴小水泡，肝鎌狀韌帶(falciform ligment)，網膜及胃腸道漿膜上的血管鬱血以及皮腫大。肝穿刺生檢則取出肝組織觀察肝炎存在與否，纖維化的程度及結節形成。臨床上不可能每位病患皆接受此項侵襲性的檢查，本研究的肝硬化則採用臨床症狀、抽血及影像檢查報告而歸類[136]。HALT-C 臨床試驗取一般抽血數據，以公式預測肝硬化： $\log \text{odds} = -5.56 - 0.0089 \times \text{platelet} (\times 10^3/\text{mm}^3) + 1.26 \times \text{AST/ALT ratio} + 5.27 \times \text{INR}$  推算，有一半的正確率[137]。最近也有用非侵襲性的低頻震波肝實質硬度測量(transient elastography, fibroscan)來評

估肝硬化，與 METAVIR 分數有相關， $r$  值 0.73( $p < 0.0001$ ) [138, 139]。

## 第五章 結論與建議：

### 第一節 結論

肝癌是少數有明確危險因子的腫瘤之一。高危險群病患應接受篩檢及定期檢查以期發現早期小肝癌，早期接受治療。

篩檢的方式要病患能接受，最好兼具高敏感度與高特異度。在現有的資源下，採用血清腫瘤標記做為篩檢的工具仍是最簡便的方法。影像學檢查中則以腹部超音波最便宜，非侵襲性，無放射線污染，適合做為篩檢的工具。

不管是以影像學檢查或血清腫瘤標記偵測肝癌，要將肝癌從慢性肝炎，肝硬化的高危險群病患中找出來，敏感度比起母群體是一般非高危險群病患要差，合併使用才能增加敏感度。AFP，DCP，GPC3 這三種腫瘤標記的基因突變各不相同，皆可以用免疫組織染色法於肝癌組織切片呈陽性反應，腫瘤標記再釋出於血中而可以被偵測到。理論上合併三種腫瘤標記篩檢肝癌應可以增加敏感度，我們的結果是 AFP 與兩種新血清腫瘤標記 DCP 與 GPC3 的試劑敏感度都不高，三種皆測劑敏感度提高到 79.8%。或者是腫瘤標記的血清中含量不穩定，或者是 DCP 與 GPC3 的試劑技術上仍不穩定，尚待進一步研究。

我們期待新一代的試劑出現，也寄望這些血清腫瘤標記都能敏感的偵測到肝癌治療後的復發，並因血清陽性反應可以反推組織切片呈陽性反應的關係，進一步成為標靶藥物治療反應的監測。

**第二節 建議**在偏遠地區不容易做腹部超音波篩檢，可以用 AFP、DCP、GPC3 這三種腫瘤標記合測，敏感度可提高到 80%，適合於高危險群地區做篩檢，與腹部超音波檢測率相當。



圖及表格：

表 1-年齡、三種腫瘤標記、丙胺酸轉胺酶及血小板在慢性病毒性肝

炎、肝硬化及肝癌三組之不同

	CH (100 人)	LC (80 人)	HCC (120 人)	P-value <sup>1</sup>	P-value <sup>2</sup>
Age	44.79±11.58	57.71±10.16	60.74±12.47	<0.0001	<0.0001
DCP	4.86±1.65	4.18±2.92	39.94±97.01	<0.0001	<0.0001
GPC3	242.22±167.66	221.86±218.63	220.91±157.89	0.6646	0.2405
AFP	30.06±189.03	24.34±48.31	3330.61±20822.39	0.1061	<0.0001
ALT	269.64±386.50	99.69±111.89	72.03±64.73	<0.0001	<0.0001
PLT	194.95±60.45	105.86±45.60	146.71±83.74	<0.0001	<0.0001

1:One-Way ANOVA; 2: Kruskal-Wallis Test; 3:CH, chronic hepatitis; 4:LC, liver cirrhosis; 5:HCC, hepatocellular carcinoma; 6.DCP: des-gamma-carboxy prothrombin 或稱 protein induced by vitamin K absence or antagonist II, PIVKA-II; 7 GPC3: Glypican-3; 8 AFP: alpha-fetoprotein; ALT: alanine aminotransferase; PLT: platelet

表 2-性別、慢性 B 型或 C 型肝炎、丙胺酸轉胺酶在慢性病毒性肝炎、

肝硬化及肝癌三組之不同

	CH (100 人)	LC (80 人)	HCC (120 人)	P-value
性別				
男	59 (59.0%)	44 (55.0%)	87 (72.5%)	0.0230
女	41 (41.0%)	36 (45.0%)	33 (27.5%)	
慢性 B 或 C 肝				
B	50 (50.0%)	40 (50.0%)	60 (50.0%)	1.0000
C	50 (50.0%)	40 (50.0%)	60 (50.0%)	
PLT 異常				
正常	67 (82.7%)	17 (26.2%)	56 (47.1%)	<0.0001
異常	14 (17.3%)	48 (73.9%)	63 (52.9%)	

Chi-Square test

表 3-年齡、三種腫瘤標記、丙胺酸轉胺酶及血小板在慢性 B 型病毒  
相關的肝炎、肝硬化及肝癌三組之不同

	CH (50 人)	LC (40 人)	HCC (60 人)	P-value <sup>1</sup>	P-value <sup>2</sup>
Age	40.92±12.16	53.45±9.72	55.87±13.49	<0.0001	<0.0001
DCP	4.80±1.83	3.75±0.94	49.03±116.74	0.0018	<0.0001
GPC3	217.50±132.97	228.41±231.65	203.59±122.58	0.7717	0.7829
AFP	54.35±266.39	30.03±63.96	5328.33±28031.48	0.2066	<0.0001
ALT	358.32±418.26	100.25±141.95	54.72±45.94	<0.0001	<0.0001
PLT	201.30±63.02	107.38±41.45	158.63±99.85	<0.0001	<0.0001

1:One-Way ANOVA 2: Kruskal-Wallis Test

表 4-性別、丙胺酸轉胺酶在慢性 B 型病毒相關的肝炎、肝硬化及肝  
癌三組之不同

	CH (50 人)	LC (40 人)	HCC (60 人)	P-value
性別				
男	38 (76.0%)	27 (67.5%)	47 (78.3%)	0.4585
女	12 (24.0%)	13 (32.5%)	13 (21.7%)	
PLT 異常				
正常	36 (83.7%)	8 (27.6%)	31 (51.7%)	<0.0001
異常	7 (16.3%)	21 (72.4%)	29 (48.3%)	

Chis-Square test

表 5-年齡、三種腫瘤標記、丙胺酸轉胺酶及血小板在慢性 C 型病毒  
相關的肝炎、肝硬化及肝癌三組之不同

	CH (50 人)	LC (40 人)	HCC (60 人)	P-value <sup>1</sup>	P-value <sup>2</sup>
Age	48.66±9.62	61.98±8.79	65.62±9.14	<0.0001	<0.0001
DCP	4.92±1.47	4.61±4.00	30.84±72.00	0.0036	0.0002
GPC3	266.39±194.24	214.90±207.38	237.91±185.78	0.5085	0.2363
AFP	5.76±5.33	18.64±23.87	1332.89±8978.38	0.3809	<0.0001
ALT	180.96±332.91	99.13±72.16	89.35±75.69	0.0443	0.1101
PLT	187.76±57.39	104.64±49.24	134.59±61.86	<0.0001	<0.0001

1:One-Way ANOVA 2: Kruskal-Wallis Test

表 6-性別、丙胺酸轉胺酶在慢性 C 型病毒相關的肝炎、肝硬化及肝癌三組之不同

	CH (50 人)	LC (40 人)	HCC (60 人)	P-value
性別				
男	21 (42.0%)	17 (42.5%)	40 (66.7%)	0.0134
女	29 (58.0%)	23 (57.5%)	20 (33.3%)	
PLT 異常				
正常	31 (81.6%)	9 (25.0%)	25 (42.4%)	<0.0001
異常	7 (18.4%)	27 (75.0%)	34 (57.6%)	

Chi-Square test

表 7-慢性 B 型或 C 型病毒相關的肝癌與年齡、三種腫瘤標記、丙胺酸轉胺酶、血小板及肝癌大小平均值

	HCC	HCC (120 人)		P-value <sup>1</sup>	P-value <sup>2</sup>
		B 肝(60 人)	C 肝(60 人)		
Age	60.74±12.47	55.87±13.49	65.62±9.14	<0.0001	<0.0001
DCP	39.94±97.01	49.03±116.74	30.84±72.00	0.3066	0.9498
GPC3	220.91±157.89	203.59±122.58	237.91±185.78	0.2571	0.2421
AFP	3330.61±20822.39	5328.33±28031.48	1332.89±8978.38	0.2966	0.3680
ALT	72.03±64.73	54.72±45.94	89.35±75.69	0.0031	<0.0001
PLT	146.71±83.74	158.63±99.85	134.59±61.86	0.1169	0.2926
Size	4.14±3.33	4.30±3.33	3.99±3.35	0.6158	0.2818

1:One-Way ANOVA 2: Wilcoxon Rank-Sum Test



表 8-肝癌與性別、大小、CLIP score、TNM score、HCC grading

	HCC(120 人)		P-value
	B 肝(60 人)	C 肝(60 人)	
性別			
男	47 (78.3%)	40 (66.7%)	0.1524
女	13 (21.7%)	20 (33.3%)	
Size			
<=2cm	14 (23.3%)	14 (23.3%)	0.1394
2-3cm	11 (18.3%)	20 (33.3%)	
>3cm	35 (58.3%)	26 (43.3%)	
CLIP			
0	10 (16.7%)	18 (30.0%)	0.1359
1	24 (40.0%)	23 (38.3%)	
2	12 (20.0%)	13 (21.7%)	
3-6	14 (23.3%)	6 (10.0%)	
TNM			
1	16 (26.7%)	19 (31.7%)	0.4273
2	27 (45.0%)	30 (50.0%)	
3-4	17 (28.3%)	11 (18.3%)	
HCC grading			
1-2	29 (48.3%)	38 (63.3%)	0.0980
3-4	31 (51.7%)	22 (36.7%)	

Chis-Square test

表 9-肝門靜脈栓塞與年紀、三種腫瘤標記、肝癌大小的關係

	肝門靜脈栓塞 (PVT)		P-value	P-value <sup>2</sup>
	沒有(111 人)	有(8 人)		
Age	61.05±12.66	55.13±8.56	0.1960	0.0816
DCP	41.02±99.53	29.29±63.05	0.7437	0.3813
GPC3	217.85±161.73	271.72±100.69	0.3568	0.0815
AFP	2754.05±20681.66	11743.68±23696.25	0.2418	0.0031
ALT	73.09±66.73	50.00±13.30	0.0053	0.4575
PLT	141.67±75.38	217.88±153.33	0.2047	0.0867
腫瘤大小	3.93±3.00	7.31±5.84	0.0051	0.0798

表 10 - 肝癌大小與三種腫瘤標記的關係

	肝癌大小			P-value	P-value <sup>2</sup>
	<=2 cm	2-3 cm	>3 cm		
Age	57.61±15.55	60.06±8.96	62.52±12.31	0.2129	0.2673
DCP	10.63±29.30	27.03±70.42	59.95±122.08	0.0566	0.0022
GPC3	175.17±92.00	213.46±177.50	249.00±170.47	0.1292	0.1372
AFP	95.18±240.69	2662.87±12494.20	5155.07±27808.98	0.5593	0.0967
ALT	71.39±59.17	88.29±67.03	64.07±65.47	0.2382	0.1069
PLT	132.48±62.66	127.29±51.98	162.89±100.92	0.0936	0.2791

1:One-Way ANOVA 2: Wilcoxon Rank-Sum Test

表 11-三種腫瘤標記在偵測肝癌的準確度、敏感度、特異度及預測值

groups	Case number	AFP		DCP		Case number	GPC3		all (264)	
		20 ng/mL		6 ng/ml			170 pg/ml		20 / 6 / 170	
	300	Positive	Negative	Positive	Negative	264	Positive	Negative	Positive	Negative
hepatitis	100	12	88	11	89	89	47	42	49	40
Cirrhosis	80	20	60	3	77	66	31	35	43	23
HCC	120	57	63	47	73	109	57	52	87	22
Overall accuracy		68.3 (205/300)		71 (213/300)			50.8 (134/264)		56.8 (150/264)	
sensitivity		47.5 (57/120)		39.2 (47/120)			52.3 (57/109)		79.8 (87/109)	
specificity		82.2 (148/180)		92.2 (166/180)			49.7 (77/155)		40.6 (63/155)	
Positive prediction rate		64 (57/89)		77 (47/61)			42.2 (57/135)		48.6 (87/179)	
Negative prediction rate		70.1 (148/211)		69.4 (166/239)			59.7 (77/129)		74.1 (63/85)	

Overall accuracy = (TP+TN) / (TP+FP+TN+FN);

Sensitivity = TP/(TP+FN);

Specificity = TN/(FP+TN);

Positive predictive value = TP/(TP+FP);

Negative predictive value = TN/(FN+TN);

TP = true positive;

TN = true negative;

FP = false positive;

FN = false negative.

表 12a - Pearson Correlation

	AFP	DCP / PIVKA II	GPC3
AFP	1	0.031	0.444*
DCP / PIVKA II		1	0.050
GPC3			1

\*:P-value<0.05

表 12b - Spearman Correlation

	AFP	DCP / PIVKA II	GPC3
AFP	1	0.215*	0.070
DCP / PIVKA II		1	-0.075
GPC3			1

\*:P-value<0.05

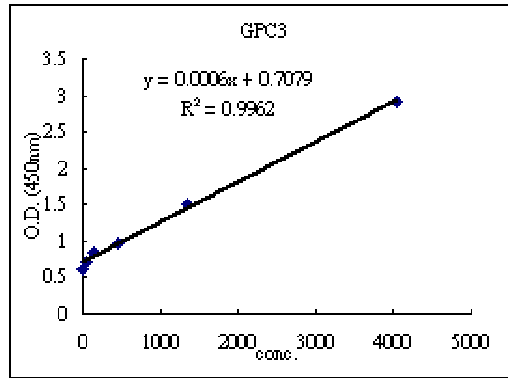
表 13-Logistic Model (HCC vs other)\*

	Model 1	Model 2	Model 3
AFP	1.003 (1.001~1.005)	—	—
DCP/ PIVKA-II	—	1.187 (1.067~1.320)	—
GPC3	—	—	1.000 (0.999~1.002)
Sex(Male vs Female)	0.351 (0.187~0.659)	0.442 (0.236~0.829)	0.363 (0.193~0.682)
Age(year)	1.077 (1.049~1.106)	1.070 (1.042~1.099)	1.069 (1.042~1.096)
PLT(正常 vs 異常)	1.359 (0.745~2.479)	1.602 (0.870~2.949)	1.370 (0.752~2.498)
ALT(>=40 vs <40)	2.940 (1.439~6.008)	2.671 (1.298~5.496)	2.836 (1.384~5.811)

\* Odds Ratio (CI)

表 14-檢視 GPC3 用 EDTA 試管和 Heparin 試管儲存有何不同

conc. (pg/ml)	O. D. (450nm)
0	0.623
16.67	
50	0.723
150	0.841
450	0.965
1350	1.513
4050	2.917



	O. D. (450nm)			GPC3 conc.			AFP ng/ml	METAVIR size number (cm)
	serum	EDTA-plasma	Heparin-plasma	serum	EDTA-plasma	Heparin-plasma		
normal student	0.311	0.368	0.331	80.5	223	130.5		
林廖**(HCC 2/4)	0.471	0.457	0.418	480.5	445.5	348	1065	A0F0 8.7 3
謝鄭**(HCC 2/4)	0.279	0.381	0.323	0.5	255.5	110.5	16.6	cirrhosis 3 1
戴** (HCC 2/4)	0.283	0.379	0.263	10.5	250.5	-39.5	254	A1F4 2 3
陳** (HCC 2/4)	0.368	0.416	0.311	223	343	80.5	47.4	A1F4 8.7 3
陳** (沒有離心)		0.396	0.346		293	168		
陳** (11287)		0.432			383			

圖 1-三種腫瘤標記的相關性

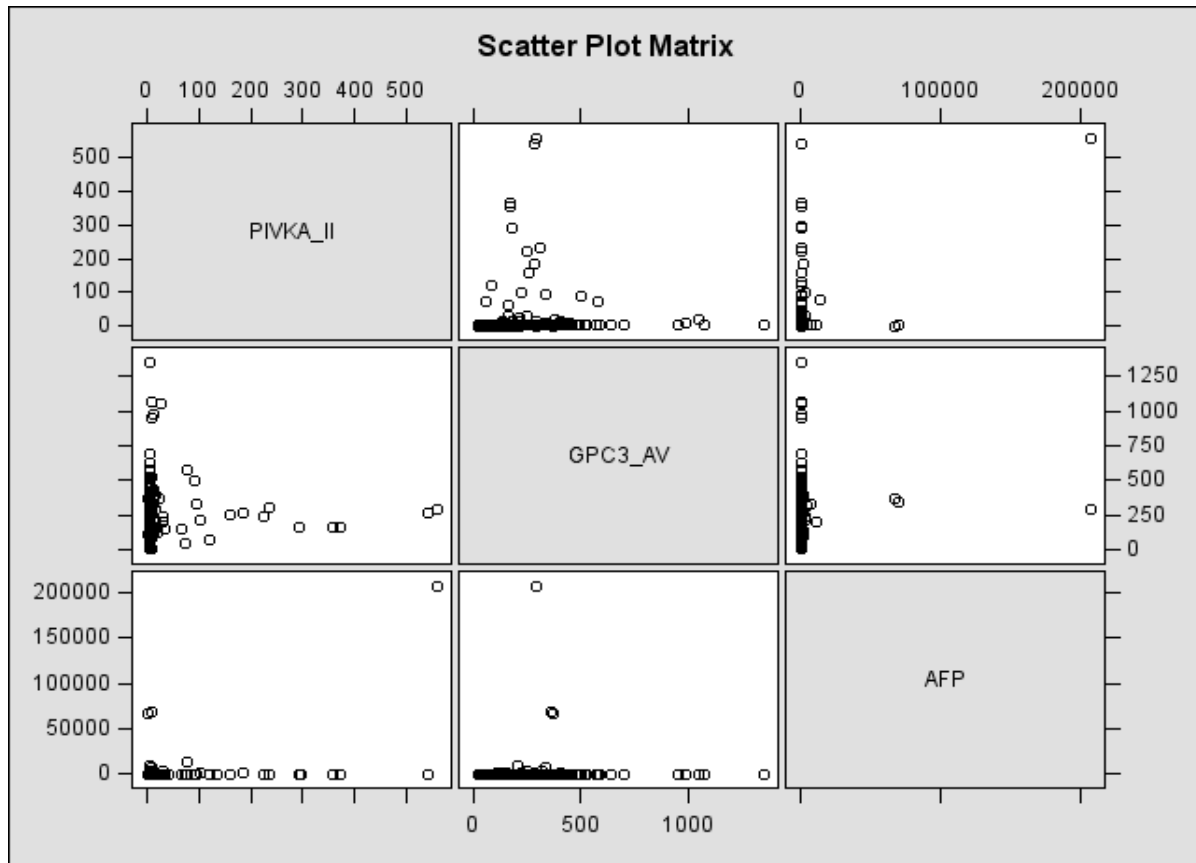


圖 2-AUROC curve (area under the receive operating characteristic curve)

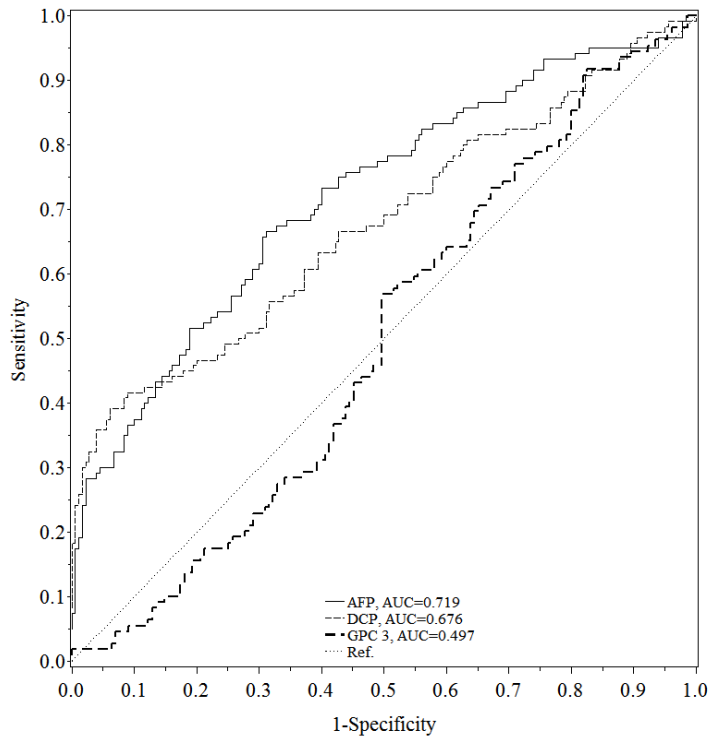


圖 3-AFP 值在肝硬化、慢性肝炎及肝癌的盒鬚圖

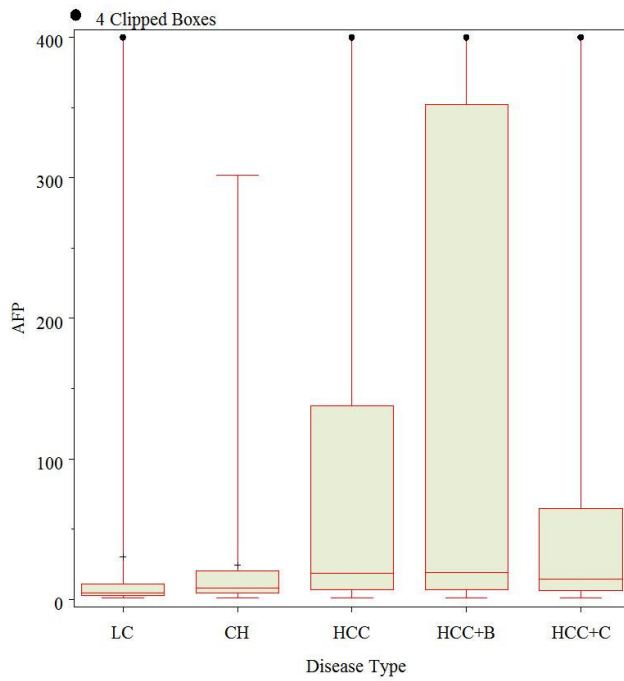


圖 4-DCP/ PIVKA-II 值在肝硬化、慢性肝炎及肝癌的盒鬚圖

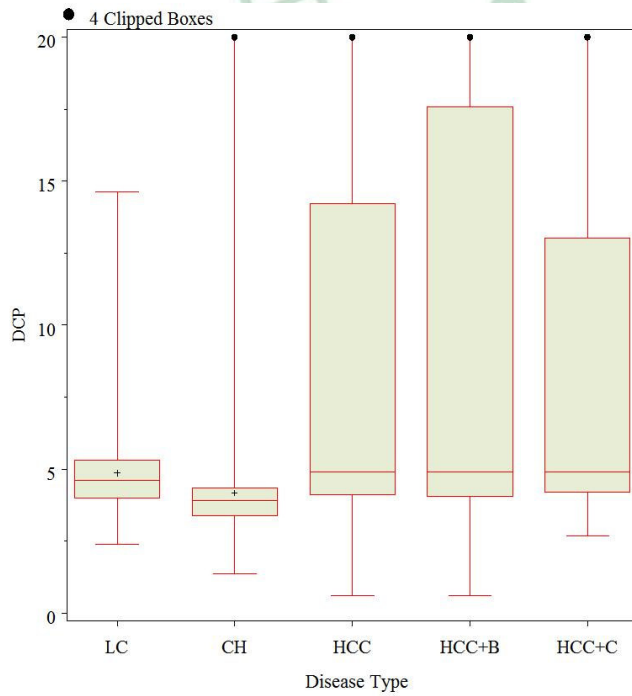




圖 5-GPC3 值在肝硬化、慢性肝炎及肝癌的盒鬚圖

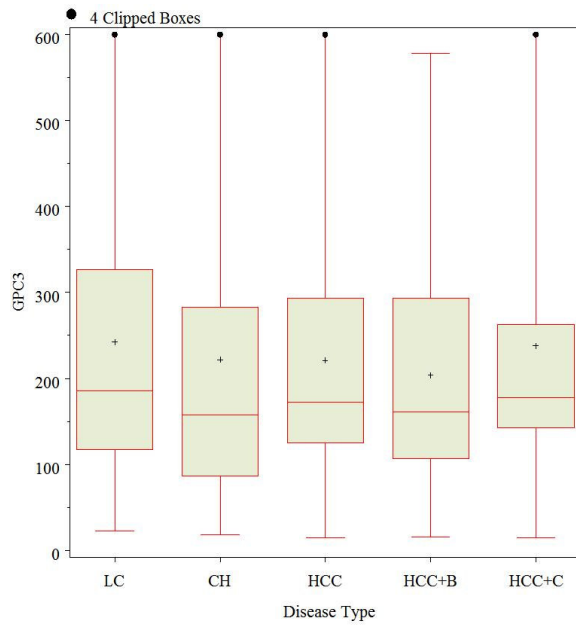


圖 6-AFP 值在肝癌小於等於 2 公分、2 到 3 公分、大於 3 公分的盒鬚圖

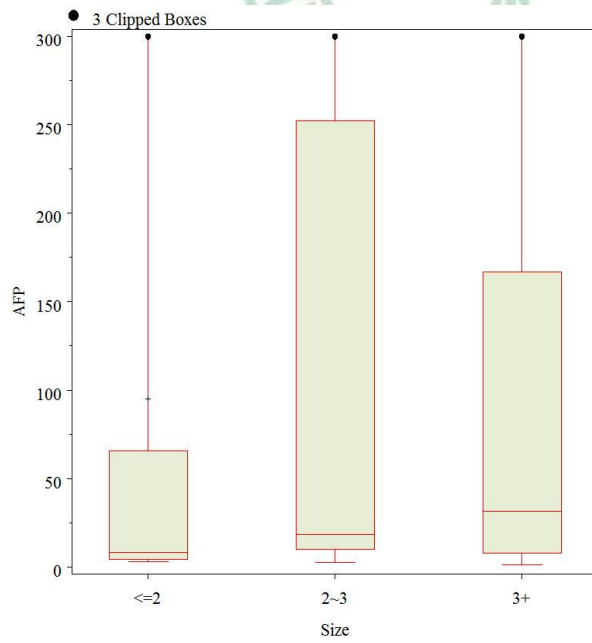


圖 7-DCP/ PIVKA-II 值在肝癌小於等於 2 公分、2 到 3 公分、大於 3 公分的盒鬚圖

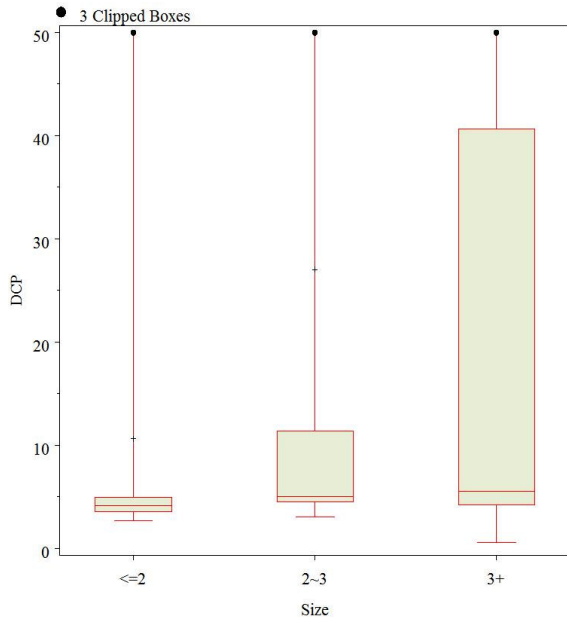
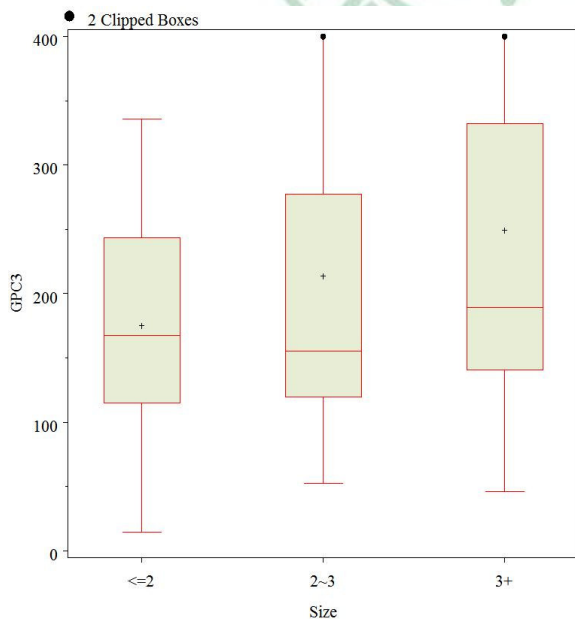


圖 8-GPC3 值在肝癌小於等於 2 公分、2 到 3 公分、大於 3 公分的盒鬚圖



參考文獻：

1. 楊懷壹, 盧勝男, 廖運範, 游山林, 孫建安, 王豐裕, 蕭朱杏, 陳培哲, 陳定信, 陳建仁: 「B 型肝炎病毒 e 抗原與肝細胞癌之長期追蹤研究」新聞稿  
[http://www.bhp.doh.gov.tw/asp/press/file/2003612103918VSKZSM/B%E5%9E%8B%E8%82%9D%E7%82%8E%E7%A0%94%E7%A9%B6%E6%96%B0%E8%81%9E%E7%A8%BF\(910718\).doc](http://www.bhp.doh.gov.tw/asp/press/file/2003612103918VSKZSM/B%E5%9E%8B%E8%82%9D%E7%82%8E%E7%A0%94%E7%A9%B6%E6%96%B0%E8%81%9E%E7%A8%BF(910718).doc). (行政院衛生署國民健康局癌症防治組 ed. 台北市; 2002.
2. 陳健弘, 陳定信: 肝細胞癌—台灣三十年的經驗. *Journal of the Formosan Medical Association* 1992, **91**:S187-202  
[http://formosan.mc.ntu.edu.tw/medicial\\_data/taiwan110.htm](http://formosan.mc.ntu.edu.tw/medicial_data/taiwan110.htm).
3. 中華民國行政院衛生署統計室: 95 年主要死因結果分析  
<http://www.doh.gov.tw/statistic/data/衛生統計叢書 2/95/專區/95 專區.htm>. 中華民國行政院衛生署; 2007.
4. Collier J, Sherman M: **Screening for hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 1998, **27**:273-278.
5. Matsui O: **Detection and characterization of small hepatocellular carcinoma.** *J Gastroenterol Hepatol* 2004, **19**:S266-S269.
6. 許金川, 陳健弘: 肝細胞癌的診斷 于 肝炎肝硬化與肝癌 初版 edn. 台北市: 橘井文化; 2006.
7. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K: **Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients.** *Cancer* 1985, **56**:918-928.
8. Calvet X, Bruix J, Gines P, Bru C, Sole M, Vilana R, Rodes J: **Prognostic factors of hepatocellular carcinoma in the west: a multivariate analysis in 206 patients.** *Hepatology* 1990, **12**:753-760.
9. Stuart KE, Anand AJ, Jenkins RL: **Hepatocellular carcinoma in the United States. Prognostic features, treatment outcome, and survival.** *Cancer* 1996, **77**:2217-2222.
10. Huang GT, Lee PH, Tsang YM, Lai MY, Yang PM, Hu RH, Chen PJ, Kao JH, Sheu JC, Lee CZ, Chen DS: **Percutaneous ethanol injection versus surgical resection for the treatment of small hepatocellular carcinoma: a prospective study.** *Ann Surg* 2005, **242**:36-42.
11. Sasaki Y, Yamada T, Tanaka H, Ohigashi H, Eguchi H, Yano M, Ishikawa O, Imaoka S: **Risk of recurrence in a long-term follow-up after surgery in 417 patients with hepatitis B- or hepatitis C-related hepatocellular carcinoma.**

- Ann Surg* 2006, **244**:771-780.
12. Nagasue N, Uchida M, Makino Y, Takemoto Y, Yamanoi A, Hayashi T, Chang YC, Kohno H, Nakamura T, Yukaya H: **Incidence and factors associated with intrahepatic recurrence following resection of hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 1993, **105**:488-494.
  13. 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**:200-207.
  14. Benvegnu L, Noventa F, Bernardinello E, Pontisso P, Gatta A, Alberti A: **Evidence for an association between the aetiology of cirrhosis and pattern of hepatocellular carcinoma development.** *Gut* 2001, **48**:110-115.
  15. Benvegnu L, Alberti A: **Patterns of hepatocellular carcinoma development in hepatitis B virus and hepatitis C virus related cirrhosis.** *Antiviral Res* 2001, **52**:199-207.
  16. Pompili M, Rapaccini GL, Covino M, Pignataro G, Caturelli E, Siena DA, Villani MR, Cedrone A, Gasbarrini G: **Prognostic factors for survival in patients with compensated cirrhosis and small hepatocellular carcinoma after percutaneous ethanol injection therapy.** *Cancer* 2001, **92**:126-135.
  17. Chen PJ, Chen DS, Lai MY, Chang MH, Huang GT, Yang PM, Sheu JC, Lee SC, Hsu HC, Sung JL: **Clonal origin of recurrent hepatocellular carcinomas.** *Gastroenterology* 1989, **96**:527-529.
  18. Kumada T, Nakano S, Takeda I, Sugiyama K, Osada T, Kiriyaama S, Sone Y, Toyoda H, Shimada S, Takahashi M, Sassa T: **Patterns of recurrence after initial treatment in patients with small hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 1997, **25**:87-92.
  19. Nishizaki T, Takenaka K, Yanaga K, Soejima Y, Uchiyama H, Kishikawa K, Sugimachi K: **Early detection of recurrent hepatocellular carcinoma.** *Hepato-gastroenterology* 1997, **44**:508-513.
  20. Shibata T, Kubo S, Itoh K, Sagoh T, Nishimura K, Nakano Y, Yamaoka Y, Ozawa K, Konishi J: **Recurrent hepatocellular carcinoma: usefulness of ultrasonography compared with computed tomography and AFP assay.** *J Clin Ultrasound* 1991, **19**:463-469.
  21. Aoyagi Y, Oguro M, Yanagi M, Mita Y, Suda T, Suzuki Y, Hata K, Ichii K, Asakura H: **Clinical significance of simultaneous determinations of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in monitoring recurrence in patients with hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 1996, **77**:1781-1786.

22. Shirabe K, Takenaka K, Gion T, Shimada M, Fujiwara Y, Sugimachi K: **Significance of alpha-fetoprotein levels for detection of early recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatic resection.** *J Surg Oncol* 1997, **64**:143-146.
23. Shimada M, Takenaka K, Gion T, Fujiwara Y, Kajiyama K, Maeda T, Shirabe K, Nishizaki T, Yanaga K, Sugimachi K: **Prognosis of recurrent hepatocellular carcinoma: a 10-year surgical experience in Japan.** *Gastroenterology* 1996, **111**:720-726.
24. Bruix J, Sherman M: **Management of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2005, **42**:1208-1236.
25. Lin SM, Lin CJ, Lin CC, Hsu CW, Chen YC: **Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma < or =4 cm.** *Gastroenterology* 2004, **127**:1714-1723.
26. Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, Ishikawa T, Koike Y, Yoshida H, Kawabe T, Omata M: **A randomized controlled trial of radiofrequency ablation with ethanol injection for small hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2005, **129**:122-130.
27. Livraghi T, Lazzaroni S, Meloni F, Solbiati L: **Risk of tumour seeding after percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma.** *Br J Surg* 2005, **92**:856-858.
28. Schotman SN, De Man RA, Stoker J, Zondervan PE, Ijzermans JN: **Subcutaneous seeding of hepatocellular carcinoma after percutaneous needle biopsy.** *Gut* 1999, **45**:626-627.
29. Tateishi R, Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Yoshida H, Kawabe T, Omata M: **Percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. An analysis of 1000 cases.** *Cancer* 2005, **103**:1201-1209.
30. Yuen MF, Cheng CC, Laufer IJ, Lam SK, Ooi CG, Lai CL: **Early detection of hepatocellular carcinoma increases the chance of treatment: Hong Kong experience.** *Hepatology* 2000, **31**:330-335.
31. Wilson JM, Jungner YG: **[Principles and practice of mass screening for disease].** *Bol Oficina Sanit Panam* 1968, **65**:281-393.
32. Bolondi L, Sofia S, Siringo S, Gaiani S, Casali A, Zironi G, Piscaglia F, Gramantieri L, Zanetti M, Sherman M: **Surveillance programme of cirrhotic patients for early diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: a cost effectiveness analysis.** *Gut* 2001, **48**:251-259.
33. Tanaka S, Kitamura T, Nakanishi K, Okuda S, Yamazaki H, Hiyama T, Fujimoto I: **Effectiveness of periodic checkup by ultrasonography for the**

- early diagnosis of hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 1990, **66**:2210-2214.
34. Zoli M, Magalotti D, Bianchi G, Gueli C, Marchesini G, Pisi E: **Efficacy of a surveillance program for early detection of hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 1996, **78**:977-985.
35. Cottone M, Turri M, Caltagirone M, Parisi P, Orlando A, Fiorentino G, Virdone R, Fusco G, Grasso R, Simonetti RG, et al.: **Screening for hepatocellular carcinoma in patients with Child's A cirrhosis: an 8-year prospective study by ultrasound and alphafetoprotein.** *J Hepatol* 1994, **21**:1029-1034.
36. Cottone M, Turri M, Caltagirone M, Maringhini A, Sciarrino E, Virdone R, Fusco G, Orlando A, Marino L, Pagliaro L: **Early detection of hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis by ultrasound and alfafetoprotein: a prospective study.** *Hepatogastroenterology* 1988, **35**:101-103.
37. Tremolda F, Benevegnu L, Drago C, Casarin C, Cechetto A, Realdi G, Ruol A: **Early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis by alphafetoprotein, ultrasound and fine-needle biopsy.** *Hepatogastroenterology* 1989, **36**:519-521.
38. Sherman M, Peltekian KM, Lee C: **Screening for hepatocellular carcinoma in chronic carriers of hepatitis B virus: incidence and prevalence of hepatocellular carcinoma in a North American urban population.** *Hepatology* 1995, **22**:432-438.
39. Pateron D, Ganne N, Trinchet JC, Aurousseau MH, Mal F, Meicler C, Coderc E, Reboullet P, Beaugrand M: **Prospective study of screening for hepatocellular carcinoma in Caucasian patients with cirrhosis.** *J Hepatol* 1994, **20**:65-71.
40. Larcos G, Sorokopud H, Berry G, Farrell GC: **Sonographic screening for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis or cirrhosis: an evaluation.** *AJR Am J Roentgenol* 1998, **171**:433-435.
41. Chen DS, Sung JL, Sheu JC, Lai MY, How SW, Hsu HC, Lee CS, Wei TC: **Serum alpha-fetoprotein in the early stage of human hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 1984, **86**:1404-1409.
42. Sheu JC, Sung JL, Chen DS, Yang PM, Lai MY, Lee CS, Hsu HC, Chuang CN, Yang PC, Wang TH, et al.: **Growth rate of asymptomatic hepatocellular carcinoma and its clinical implications.** *Gastroenterology* 1985, **89**:259-266.
43. Fung KT, Li FT, Raimondo ML, Maudgil D, Mancuso A, Tibballs JM, Watkinson AA, Patch D, Burroughs AK: **Systematic review of radiological imaging for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients.** *Br J Radiol* 2004, **77**:633-640.

44. Marrero JA, Lok AS: **Newer markers for hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2004, **127**:S113-119.
45. Benowitz S: **Liver cancer biomarkers struggling to succeed.** *J Natl Cancer Inst* 2007, **99**:590-591.
46. Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, Ishida Y, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Ido A, Stuver SO, Tsubouchi H: **Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system.** *Hepatology* 2007, **45**:948-956.
47. Gitlin D, Perricelli A, Gitlin GM: **Synthesis of -fetoprotein by liver, yolk sac, and gastrointestinal tract of the human conceptus.** *Cancer Res* 1972, **32**:979-982.
48. Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin IS: **Production of embryonal  $\alpha$ -globulin by transplantable mouse hepatomas.** *Transplantation* 1963, **1**:174-180.
49. IuS T: **[Detection of Embryo-Specific Alpha-Globulin in the Blood Serum of a Patient with Primary Liver Cancer.].** *Vopr Med Khim* 1964, **10**:90-91.
50. Zaman SN, Melia WM, Johnson RD, Portmann BC, Johnson PJ, Williams R: **Risk factors in development of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: prospective study of 613 patients.** *Lancet* 1985, **1**:1357-1360.
51. Lok AS, Lai CL: **alpha-Fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection: role in the early detection of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 1989, **9**:110-115.
52. 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**:61-66.
53. Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, Mazzella G, Accogli E, Caraceni P, Domenicali M, De Notariis S, Roda E, Bernardi M: **Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status.** *J Hepatol* 2001, **34**:570-575.
54. Johnson PJ: **The role of serum alpha-fetoprotein estimation in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma.** *Clin Liver Dis* 2001, **5**:145-159.
55. 廖運範: **慢性B型肝炎病毒感染于肝炎肝硬化與肝癌** 初版 edn. 台北市: 橋井文化; 2006.
56. Liaw YF, Tai DI, Chen TJ, Chu CM, Huang MJ: **Alpha-fetoprotein changes in the course of chronic hepatitis: relation to bridging hepatic necrosis and hepatocellular carcinoma.** *Liver* 1986, **6**:133-137.

57. Chen DS, Sung JL: **Serum alphafetoprotein in hepatocellular carcinoma.** *Cancer* 1977, **40**:779-783.
58. Sung JL, Liaw YF, Lin WS, Chen TH: **Alpha-fetoprotein in liver diseases in Taiwan.** *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* 1974, **73**:178-183.
59. Lin TY, Chu SH, Chen MF, Chen CH: **Serum alpha-fetoglobulin and primary cancer of the liver in Taiwan.** *Cancer* 1972, **30**:435-443.
60. Wu JC, Lee SD, Hsiao KJ, Wang SS, Chou P, Tsao D, Tsai YT, Lui WY, Chiang JH, Lo KJ: **Mass screening of primary hepatocellular carcinoma by alpha-fetoprotein in a rural area of Taiwan--a dried blood spot method.** *Liver* 1988, **8**:100-104.
61. Sherman M: **Alphafetoprotein: an obituary.** *J Hepatol* 2001, **34**:603-605.
62. McMahon BJ, Alberts SR, Wainwright RB, Bulkow L, Lanier AP: **Hepatitis B-related sequelae. Prospective study in 1400 hepatitis B surface antigen-positive Alaska native carriers.** *Arch Intern Med* 1990, **150**:1051-1054.
63. McMahon BJ, Bulkow L, Harpster A, Snowball M, Lanier A, Sacco F, Dunaway E, Williams J: **Screening for hepatocellular carcinoma in Alaska natives infected with chronic hepatitis B: a 16-year population-based study.** *Hepatology* 2000, **32**:842-846.
64. Gupta S, Bent S, Kohlwes J: **Test characteristics of alpha-fetoprotein for detecting hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C. A systematic review and critical analysis.** *Ann Intern Med* 2003, **139**:46-50.
65. Farinati F, Marino D, De Giorgio M, Baldan A, Cantarini M, Cursaro C, Rapaccini G, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegno L, et al: **Diagnostic and prognostic role of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither?** *Am J Gastroenterol* 2006, **101**:524-532.
66. Chu ML, Lin WS, Yoshida TO, Chu SH, Lin TY: **Demonstration of alpha-Fetoglobulin in hepatoma tissue by fluorescent antibody technique.** *Cancer* 1974, **34**:268-273.
67. Volk ML, Hernandez JC, Su GL, Lok AS, Marrero JA: **Risk factors for hepatocellular carcinoma may impair the performance of biomarkers: a comparison of AFP, DCP, and AFP-L3.** *Cancer Biomark* 2007, **3**:79-87.
68. Li D, Mallory T, Satomura S: **AFP-L3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma.** *Clin Chim Acta* 2001, **313**:15-19.
69. Fujioka M, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M: **Immunohistologic study on the expressions of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist II in surgically resected small hepatocellular carcinoma.** *Hepatology* 2001, **34**:1128-1134.



70. Yuen MF, Lai CL: **Serological markers of liver cancer.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005, **19**:91-99.
71. Liebman HA: **Isolation and characterization of a hepatoma-associated abnormal (des-gamma-carboxy)prothrombin.** *Cancer Res* 1989, **49**:6493-6497.
72. Fujiyama S, Tanaka M, Maeda S, Ashihara H, Hirata R, Tomita K: **Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma.** *Oncology* 2002, **62 Suppl 1**:57-63.
73. Lamerz R, Hayes P, Hoffmann R-T, Löhe F, Shiratori Y, Taketa K: **National Academy of Clinical Biochemistry Guidelines for the Use of Tumor Markers in Primary Liver Cancer.**  
[http://www.aacc.org/NR/rdonlyres/491D2679-1801-4075-9B59-3106B4A42629/0/chp3d\\_liverpdf](http://www.aacc.org/NR/rdonlyres/491D2679-1801-4075-9B59-3106B4A42629/0/chp3d_liverpdf) 2006.
74. 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 Engl J Med* 1984, **310**:1427-1431.
75. Tanabe Y, Ohnishi K, Nomura F, Iida S: **Plasma abnormal prothrombin levels in patients with small hepatocellular carcinoma.** *Am J Gastroenterol* 1988, **83**:1386-1389.
76. 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**:1787-1792.
77. Izuno K, Fujiyama S, Yamasaki K, Sato M, Sato T: **Early detection of hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis by combined assay of des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein: a prospective study.** *Hepatogastroenterology* 1995, **42**:387-393.
78. Kuromatsu R, Tanaka M, Shimauchi Y, Shimada M, Tanikawa K, Watanabe K, Yokoo T: **Usefulness of ED036 kit for measuring serum PIVKA-II levels in small hepatocellular carcinoma.** *J Gastroenterol* 1997, **32**:507-512.
79. Okuda H, Nakanishi T, Takatsu K, Saito A, Hayashi N, Watanabe K, Magario N, Yokoo T, Naraki T: **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**:812-818.
80. 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**:1114-1121.
81. 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**:6115-6119.
  82. Tanaka Y, Kashiwagi T, Tsutsumi H, Nagasawa M, Toyama T, Ozaki S, Naito M, Ishibashi K, Azuma M: **Sensitive measurement of serum abnormal prothrombin (PIVKA-II) as a marker of hepatocellular carcinoma.** *Hepato gastroenterology* 1999, **46**:2464-2468.
  83. Ando E, Tanaka M, Yamashita F, Kuromatsu R, Takada A, Fukumori K, Yano Y, Sumie S, Okuda K, Kumashiro R, Sata M: **Diagnostic clues for recurrent hepatocellular carcinoma: comparison of tumour markers and imaging studies.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003, **15**:641-648.
  84. 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**:481-488.
  85. Fujiyama S, Izuno K, Yamasaki K, Sato T, Taketa K: **Determination of optimum cutoff levels of plasma des-gamma-carboxy prothrombin and serum alpha-fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular carcinoma using receiver operating characteristic curves.** *Tumour Biol* 1992, **13**:316-323.
  86. Takikawa Y, Suzuki K, Yamazaki K, Goto T, Madarame T, Miura Y, Yoshida T, Kashiwabara T, Sato S: **Plasma abnormal prothrombin (PIVKA-II): a new and reliable marker for the detection of hepatocellular carcinoma.** *J Gastroenterol Hepatol* 1992, **7**:1-6.
  87. Kasahara A, Hayashi N, Fusamoto H, Kawada Y, Imai Y, Yamamoto H, Hayashi E, Ogihara 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**:2170-2176.
  88. 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**:249-255.
  89. 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**:1643-1648.
  90. Nakagawa T, Seki T, Shiro T, Wakabayashi M, Imamura M, Itoh T, Tamai T,

- Nishimura A, Yamashiki N, Matsuzaki K, et al: **Clinicopathologic significance of protein induced vitamin K absence or antagonist II and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma.** *Int J Oncol* 1999, **14**:281-286.
91. Ishii M, Gama H, Chida N, Ueno Y, Shinzawa H, Takagi T, Toyota T, Takahashi T, Kasukawa R: **Simultaneous measurements of serum alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence for detecting hepatocellular carcinoma.** South Tohoku District Study Group. *Am J Gastroenterol* 2000, **95**:1036-1040.
92. 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**:2464-2471.
93. Gotoh M, Nakatani T, Masuda T, Mizuguchi Y, Sakamoto M, Tsuchiya R, Kato H, Furuta K: **Prediction of invasive activities in hepatocellular carcinomas with special reference to alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxyprothrombin.** *Jpn J Clin Oncol* 2003, **33**:522-526.
94. 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**:561-569.
95. Sakon M, Monden M, Gotoh M, Kanai T, Umeshita K, Nakano Y, Mori T, Sakurai M, Wakasa K: **Relationship between pathologic prognostic factors and abnormal levels of des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma.** *Am J Surg* 1992, **163**:251-256.
96. Weitz IC, Liebman HA: **Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review.** *Hepatology* 1993, **18**:990-997.
97. Shimauchi Y, Tanaka M, Kuromatsu R, Ogata R, Tateishi Y, Itano S, Ono N, Yutani S, Nagamatsu H, Matsugaki S, et al: **A simultaneous monitoring of Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin as an early diagnosis of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients.** *Oncol Rep* 2000, **7**:249-256.
98. Shen T, Sonoda G, Hamid J, Li M, Filmus J, Buick RN, Testa JR: **Mapping of the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome gene (GPC3) to chromosome X in human and rat by fluorescence in situ hybridization.**

- Mamm Genome* 1997, **8**:72.
99. Filmus J, Church JG, Buick RN: **Isolation of a cDNA corresponding to a developmentally regulated transcript in rat intestine.** *Mol Cell Biol* 1988, **8**:4243-4249.
  100. Filmus J, Selleck SB: **Glypicans: proteoglycans with a surprise.** *J Clin Invest* 2001, **108**:497-501.
  101. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M: **Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:729-777.
  102. Watanabe K, Yamada H, Yamaguchi Y: **K-glypican: a novel GPI-anchored heparan sulfate proteoglycan that is highly expressed in developing brain and kidney.** *J Cell Biol* 1995, **130**:1207-1218.
  103. Paine-Saunders S, Viviano BL, Saunders S: **GPC6, a novel member of the glypican gene family, encodes a product structurally related to GPC4 and is colocalized with GPC5 on human chromosome 13.** *Genomics* 1999, **57**:455-458.
  104. Hsu HC, Cheng W, Lai PL: **Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution.** *Cancer Res* 1997, **57**:5179-5184.
  105. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmermann A, Lander AD, Korc M, Kleeff J, Buchler MW: **Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders.** *Gut* 2001, **48**:558-564.
  106. Sung YK, Hwang SY, Park MK, Farooq M, Han IS, Bae HI, Kim JC, Kim M: **Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma.** *Cancer Sci* 2003, **94**:259-262.
  107. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, et al: **Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **306**:16-25.
  108. Capurro M, Wanless IR, Sherman M, Deboer G, Shi W, Miyoshi E, Filmus J: **Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2003, **125**:89-97.
  109. Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, Tokita S, Iwanari H, Ito Y, Nakano K, et al: **Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 2004, **64**:2418-2423.

110. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS: **Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan.** *Lancet* 1981, **2**:1129-1133.
111. Grozdanov PN, Yovchev MI, Dabeva MD: **The oncofetal protein glypican-3 is a novel marker of hepatic progenitor/oval cells.** *Lab Invest* 2006, **86**:1272-1284.
112. Huo TI, Hsia CY, Chu CJ, Huang YH, Lui WY, Wu JC, Lee PC, Chi CW, Lee SD: **The predictive ability of serum alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma is linked with the characteristics of the target population at surveillance.** *J Surg Oncol* 2007, **95**:645-651.
113. 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**:544-549.
114. 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**:2489-2493.
115. 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 carcinomas varies according to tumor size.** *Am J Gastroenterol* 2006, **101**:2038-2043.
116. Capurro M, Filmus J: **Glypican-3 as a serum marker for hepatocellular carcinoma.** *Cancer Res* 2005, **65**:372; author reply 372-373.
117. Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R, Neri G, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D: **Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome.** *Nat Genet* 1996, **12**:241-247.
118. Editorial: **Are progenitor cells the 'egg'? Glypican-3 expression in hepatocarcinogenesis.** *Lab Invest* 2006, **86**:1202.
119. Wang XY, Degos F, Dubois S, Tessitore S, Allegretta M, Guttman RD, Jothy S, Belghiti J, Bedossa P, Paradis V: **Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas.** *Hum Pathol* 2006, **37**:1435-1441.
120. Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V: **Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma.** *Semin Liver Dis* 2005, **25**:181-200.
121. Kojiro M: **Focus on dysplastic nodules and early hepatocellular carcinoma:**

- an Eastern point of view.** *Liver Transpl* 2004, **10**:S3-8.
122. Kojiro M: **Histopathology of liver cancers.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005, **19**:39-62.
  123. Bruix J, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J: **Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver.** *J Hepatol* 2001, **35**:421-430.
  124. Talwalkar JA, Gores GJ: **Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 2004, **127**:S126-132.
  125. Soresi M, Magliarisi C, Campagna P, Leto G, Bonfissuto G, Riili A, Carroccio A, Sesti R, Tripi S, Montalto G: **Usefulness of alpha-fetoprotein in the diagnosis of hepatocellular carcinoma.** *Anticancer Res* 2003, **23**:1747-1753.
  126. Maringhini A, Cottone M, Sciarrino E, Marceno MP, La Seta F, Fusco G, Rinaldi F, Pagliaro L: **Ultrasonography and alpha-fetoprotein in diagnosis of hepatocellular carcinoma in cirrhosis.** *Dig Dis Sci* 1988, **33**:47-51.
  127. Hu KQ, Kyulo NL, Lim N, Elhazin B, Hillebrand DJ, Bock T: **Clinical significance of elevated alpha-fetoprotein (AFP) in patients with chronic hepatitis C, but not hepatocellular carcinoma.** *Am J Gastroenterol* 2004, **99**:860-865.
  128. Arrieta O, Cacho B, Morales-Espinosa D, Ruelas-Villavicencio A, Flores-Estrada D, Hernandez-Pedro N: **The progressive elevation of alpha fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis.** *BMC Cancer* 2007, **7**:28.
  129. Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, Everhart JE, Dienstag JL, Bonkovsky HL, Wright EC, Everson GT, Lindsay KL, Lok AS, et al: **Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial.** *J Hepatol* 2005, **43**:434-441.
  130. Murashima S, Tanaka M, Haramaki M, Yutani S, Nakashima Y, Harada K, Ide T, Kumashiro R, Sata M: **A decrease in AFP level related to administration of interferon in patients with chronic hepatitis C and a high level of AFP.** *Dig Dis Sci* 2006, **51**:808-812.
  131. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, et al: **Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method.** *Cancer Res* 2002, **62**:3939-3944.
  132. Kim W, Oe Lim S, Kim JS, Ryu YH, Byeon JY, Kim HJ, Kim YI, Heo JS,

- Park YM, Jung G: **Comparison of proteome between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**:5493-5500.
133. Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, Yamazaki O, Shiomi S, Tamori A, Oka H, Igawa S, et al: **Effects of long-term postoperative interferon-alpha therapy on intrahepatic recurrence after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. A randomized, controlled trial.** *Ann Intern Med* 2001, **134**:963-967.
134. Shiratori Y, Shiina S, Teratani T, Imamura M, Obi S, Sato S, Koike Y, Yoshida H, Omata M: **Interferon therapy after tumor ablation improves prognosis in patients with hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus.** *Ann Intern Med* 2003, **138**:299-306.
135. Mazzaferro V, Romito R, Schiavo M, Mariani L, Camerini T, Bhoori S, Capussotti L, Calise F, Pellicci R, Belli G, et al: **Prevention of hepatocellular carcinoma recurrence with alpha-interferon after liver resection in HCV cirrhosis.** *Hepatology* 2006, **44**:1543-1554.
136. Lin DY, Sheen IS, Chiu CT, Lin SM, Kuo YC, Liaw YF: **Ultrasonographic changes of early liver cirrhosis in chronic hepatitis B: a longitudinal study.** *J Clin Ultrasound* 1993, **21**:303-308.
137. Lok AS, Ghany MG, Goodman ZD, Wright EC, Everson GT, Sterling RK, Everhart JE, Lindsay KL, Bonkovsky HL, Di Bisceglie AM, et al: **Predicting cirrhosis in patients with hepatitis C based on standard laboratory tests: results of the HALT-C cohort.** *Hepatology* 2005, **42**:282-292.
138. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le Bail B, Adhoute X, Bertet J, Couzigou P, de Ledinghen V: **Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study.** *Gut* 2006, **55**:403-408.
139. Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, Conte D, Donato MF, Ronchi G, Colombo M: **Reproducibility of transient elastography in the evaluation of liver fibrosis in patients with chronic liver disease.** *Gut* 2007, **56**:968-973.