

肝細胞癌におけるゲノム不安定性とテロメラーゼ活性 ならびに糖転移酵素活性の基礎的, 臨床的研究

新潟大学医学部第3内科学教室

青柳 豊・須田 剛士・川合 弘一
見田 有作・柳 雅彦・和栗 暢生
横田 隆司・鈴木 康史・朝倉 均

Genomic Instability, Telomerase Activity and Fucosylated Species of
Alpha-Fetoprotein as Possible Predictive and Prognostic
Indicators for Patients with Hepatocellular Carcinoma.

*The Third Division, Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine*

Yutaka AOYAGI, Takeshi SUDA, Kohichi KAWAI, Yuhsaku MITA,
Masahiko YANAGI, Nobuo WAGURI, Takashi YOKOTA,
Yasufumi SUZUKI and Hitoshi ASAKURA

In order to unveil a role of the genomic instability (loss of heterozygosity, LOH and replication error, RER), telomerase activity and fucosylated species of alpha-fetoprotein (fucosylation index, FI) with its enzymatic background in hepatocarcinogenesis, they were simultaneously determined in hepatocellular carcinoma (HCC), surrounding non-tumorous liver (SL), normal liver (NL) and patients sera. LOH was significantly frequent in HCC compared with SL or NL. In contrast, RER was detected at random loci and not significantly frequent in HCC. Both of LOH and RER were tended to appear preferentially in SL than in NL. The mean relative telomerase activity in patients suffering from early recurrences after surgery was significantly higher than that in patients without intrahepatic recurrence. The analysis of multiple co-variates in the prognostic factors by the Cox's proportional hazards model showed that FI was one of

Reprint requests to: Yutaka AOYAGI
The Third Division, Department of
Internal Medicine, Niigata University
School of Medicine, 757 Asahimachi-Dori-
1-Bancho, Niigata 951-8122, Japan.

別刷請求先:
〒951-8122 新潟市旭町通1番町757
新潟大学医学部第三内科 青柳 豊

the independent prognostic factors. When the tentative discriminating line of FI was set at 18%, the mean survival rate in the group, whose FI was higher than 18%, was significantly lower than another group, whose FI is equal to or less than 18%, by the generalized Wilcoxon and the log rank tests. These results suggest that measuring these indicators serves as new prognostic and predictive factors and may improve prognostic estimates and appraisal of therapeutic outcome for patients with HCC.

Key words: Alpha-fetoprotein, Fucosylation index, Hepatocellular carcinoma, Prognostic factor, Genomic instability, Telomerase activity
アルファフェトプロテイン, フコシル化率, 肝細胞癌, 予後規定因子, 遺伝子不安定性, テロメラーゼ活性

はじめに

近年発癌機構の一つとして、癌遺伝子、癌抑制遺伝子の増幅や欠失に加え、ゲノムの不安定化が注目されている¹⁾。また、細胞分裂を制御する因子としてのテロメアの意義も合わせて報告されている²⁾⁻⁴⁾。

肝細胞癌(HCC)においてはこれまで、その発癌に特徴的な癌遺伝子や癌抑制遺伝子の存在は明らかにされておらず、HCC全体に共通する発癌の危険因子は、肝臓における慢性炎症と考えられている。これら、慢性炎症に伴う複製回転亢進の持続は、ミスマッチ修復系に異常がなくともゲノムの不安定性とテロメアの短縮を引き起こし、HCCの発癌に関与している可能性が推察される。他方、著者らは、癌化に伴う血清糖蛋白の変異、特にアルファフェトプロテイン(AFP)糖鎖のフコシル化とそのHCC早期診断における意義ならびに予知の可能性につき報告してきた⁵⁾⁻¹²⁾。本研究においては、HCCとその周辺非癌部(SL)、ならびに非担癌慢性肝疾患組織(NL)におけるreplication error(RER)とloss of heterozygosity(LOH)の頻度を測定し、発癌過程にゲノム不安定性(Genomic instability, GI)が生じているかどうか、ならびにテロメラーゼ活性とテロメア長がHCC発癌の危険率を示す指標となりうるかを検討した。さらに、これらの組織中におけるフコシル化の酵素学的背景である α 1-6 fucosyltransferase(α FT)の活性測定の検討と多分岐化を担うグルコサミン転移酵素(GnT)Ⅲ、Ⅴならびにフコシル化AFPのprognostic indicatorとしての評価を合わせて行った。

対象と方法

対象: B型, C型肝炎硬変合併 HCC, SL, NL なら

びに正常肝組織を用いて検討した。AFPのフコシル化率、各種糖転移酵素活性はHCCおよび良性肝疾患患者血清ならびに血漿を用いて測定した。

方法: 1. マイクロサテライト不安定性の検討, 蛍光標識した18のマイクロサテライトマーカー(MS; D1S204, D2S123, D3S1768, D4S1625, D6S1007, D7S1793, D8S1106, D9S266, D10S1208, D11S1392, D12S375, D14S53, D15S165, D16S748, D19S601, D21S1437, D22S683, DXS121)を用いたPCR反応の産物をDNAシーケンサーで分離し、各組織と同一個体の末梢血白血球との間で、Canzianらの方法に従い検討した¹⁾。

2. テロメラーゼならびにテロメア長の検討, HCCとそのSL, ならびに末梢血白血球(PBL)よりゲノムDNAを抽出後ナイロンメンブレンにスロットブロットし、³²P-dATPで標識したd(TTAGGG)₃とd(CCT)₆でハイブリダイズした。前者で得られた放射活性を後者のそれで除し、単位DNA当たりのTelomeric repeats content(TC)とし、肝組織中のTCを同一個体のPBLにおけるTCで除した値を肝組織中のRelative TC(RTC)とした¹³⁾。Terminal restriction fragment(TRF)は既報の方法³⁾に従い、高分子量のゲノムDNAをMspIとRsaIで完全消化後1%アガロースゲルにて分離し、ナイロンメンブレンへの転写産物を³²P-dATPで標識したd(TTAGGG)₃でハイブリダイズした。その後、イメージアナライザーでシグナルインテンシティーを計測し、最大値の部分を実測テロメア長とした。テロメラーゼ活性は既報のごとく蛍光プライマーを用いたTRAP法で検出した¹³⁾。

3. AFPフコシル化分画の測定, レンズマメレクチン存在下の親和性電気泳動法により⁵⁾結合分画, 非結

表1 再発の有無よりみた HCC 組織の RTA 活性

Case	年齢	性	併存病変	TNM	癌部組織型	tw	vp	再発の有無	RTA
1	61	M	CH (C)	T 2 N 0 M 0	mod	+	0	2 +	105
2	66	M	CH (C)	T 4 N 0 M 0	mod	+	1	10+	36.0
3	42	F	LC (B)	T 3 N 0 M 0	por	-	1	15+	35.7
4	64	F	LC (C)	T 1 N 0 M 0	well	-	2	4 +	34.8
5	58	F	LC (C)	T 3 N 0 M 0	mod	-	1	15+	32.8
6	63	M	CH (C)	T 2 N 0 M 0	mod	+	0	7 +	30.2
7	53	F	CH (B)	T 3 N 0 M 0	mod	+	1	15-	29.0
8	62	M	CH (B)	T 4 N 0 M 0	well-mod	-	0	15+	28.9
9	48	M	CH (C)	T 4 N 0 M 0	mod	+	3	2 +	20.8
10	49	F	LC (B)	T 2 N 0 M 0	mod	+	1	12-	18.3
11	43	M	CH (B)	T 2 N 0 M 0	mod	+	1	42-	10.5
12	65	M	CH (C)	T 2 N 0 M 0	mod	+	0	18-	10.1
13	63	M	Alcoholic LC	T 4 N 0 M 0	mod	-	0	27+	8.72
14	66	M	CH (C)	T 4 N 0 M 0	mod-por	+	0	24+	7.44
15	46	M	CH (B)	T 2 N 0 M 0	por	-	0	39-	7.41
16	68	M	CH (C)	T 2 N 0 M 0	well-mod	-	0	29+	5.37
17	68	M	Alcoholic LI	T 3 N 0 M 0	well-mod	+	1	15-	5.10
18	68	M	CH (NBNC)	T 2 N 0 M 0	mod	-	0	42-	3.28
19	64	F	CH (C)	T 2 N 0 M 0	well	-	0	15+	3.21
20	65	M	CH (C)	T 1 N 0 M 0	well	+	0	15-	3.00

HCC 切除症例を RTA の高い順に示す。約1年以内に再発した早期再発例 (case No. 1-6, 8, 9, 19) の RTA は 36.4 ± 27.8 で、非再発群ならびに後期再発群の RTA (9.84 ± 7.65) に比較して有意な上昇を認め、tw や vp factor より、優れた指標であることを示している。CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; LI, liver injury; mod, moderately differentiated; por, poorly differentiated; well, well differentiated HCC。+, 再発有り。-, 再発なし。文献13より引用

合分画を定量し、総 AFP に対する結合性画分の割合をフコシル化率と定義し⁷⁾⁹⁾、HCC 590 例、各種画像診断ならびにサンプル採取より6ヶ月の経過観察により HCC の存在が否定された肝硬変、慢性肝炎を主体とする良性肝疾患 270 例を対象に測定した。フコシル化 AFP の prognostic indicator としての検討は Cox の比例ハザードモデルを用いて行い、生存率の差は Kaplan-Meier 法により検定した。

4. α FT, III型, V型 GnT の酵素活性測定, α FT の酵素基質としては、トランスフェリンより pronase 消化と Toyopearl HW-40S のゲル濾過により、糖ペプチド分画を得、水溶性蛍光標識試薬 PNSNB を用い標識し、さらに、sialidase, β -galactosidase 消化により agalacto-biantennary form として用いた¹⁴⁾。GnT 測定用基質はトランスフェリン糖鎖をヒドラジン分解後、直接 2-アミノピリジンを用い標識した。つぎに、それぞれ、GDP-Fuc, UDP-GlcNAc 存在下、各種酵素源を用いて反応系を構成し、活性測定は、

逆相系高速液体クロマトグラフィー (HPLC) カラム Takara type R-MB を用い測定した¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。

結 果

1. マイクロサテライト不安定性の検討, RER あるいは LOH が出現する頻度 (GI%) は HCC, SL, NL でそれぞれ mean \pm SD が $19.1 \pm 10.4\%$, $11.1 \pm 8.3\%$, $3.2 \pm 3.0\%$ であり、各群間に有意差がみられた。B 型肝炎では C 型肝炎に比べ GI% が高い傾向にあった。また癌部の組織型別の GI% は、分化度が低いほど GI% が高い傾向にあった。GI% と年齢, AFP, 血小板数に有意な相関は認められなかった。

2. テロメラーゼならびにテロメア長の検討, 正常肝, 良性肝疾患ならびに HCC 組織中における RTC を検討した。正常肝, 非担癌慢性肝疾患肝組織中における RTC はそれぞれ 1.08 ± 0.08 ($n=4$), 0.89 ± 0.15 ($n=10$) で有意に非担癌慢性肝疾患肝組織中で減少していた。さらに、担癌非癌部における RTC は $0.65 \pm$

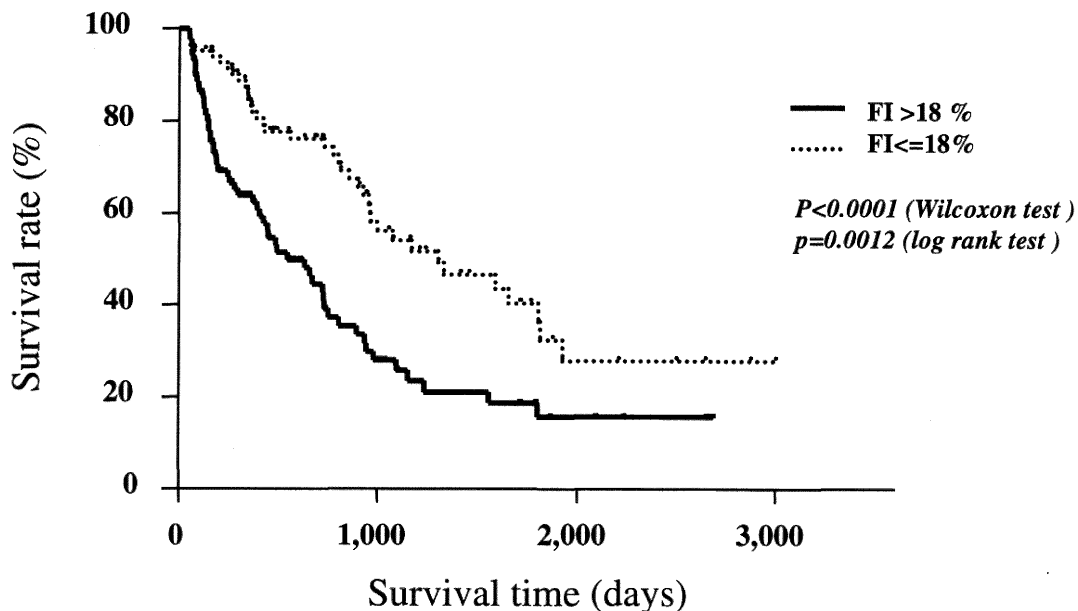


図1 内科的治療を行った HCC (302 例) でのフコシル化率18%以上群と未満群での Kaplan-Meier 法による生存曲線の比較. フコシル化率18%以上群は未満群に比較して有意な生存率の低下を認めた. 同様の生存率の低下は, Tumor Stage を II, III, IVA, IVB に限っても認められ, フコシル化率の多寡は, 単なる解剖学的進展度を示すものではなく, 腫瘍の生物学的悪性度を反映するものと考えられた.

文献20より引用

0.14 (n=8) であり, 非担癌慢性肝炎患組織中に比し有意に減少していた¹⁸⁾. 一方, HCC においては, ばらつきが大きく, 一定の傾向は認められなかった. 次にテロメラーゼ活性の程度と腫瘍の転移巣形成との関係をマウスの細胞系列を用い検討した. マウスの繊維肉腫の MST 細胞系列より非転移株, 静注した時にだけ転移可能な株, さらに皮下注でも転移する株をそれぞれ複数クローニングし, 各クローンのテロメラーゼ活性を半定量的に測定した. 各クローンの HeLa 細胞に対する相対的テロメラーゼ活性値は, それぞれ 0.093 ± 0.031 (n=4), 0.15 ± 0.039 (n=4), 0.39 ± 0.20 (n=5) で, より転移能の高い株ほど高い値を示した. また, 各腫瘍の皮下注局所と転移先で活性を測定した結果では, いずれの株においても転移先で高値を示した. さらに外科的に切除された HCC 中のテロメラーゼ活性を, 一定量の内部コントロールに対する相対値として半定量的に評価した. その結果 表1 に示すように, 術後1年程度で残肝再発の認められた早期再発群と認められなかった非再発群の RTA はそれぞれ 36.4 ± 27.8 (n=9), 9.84

± 7.65 (n=11) で, 有意に早期再発群で高値を示した¹³⁾.

3. AFP フコシル化分画の測定, HCC 590 例, 良性肝炎患 270 例のフコシル化率の検討では, HCC 群のフコシル化率は $37 \pm 31\%$ (mean \pm SD) で良性肝炎患群の $4 \pm 7\%$ に比較して統計学的に有意な上昇を認めた. 早期の HCC である最大径 3 cm 以下で AFP 値 1,000 ng/ml 以下62例, 3 cm 以下で 400 ng/ml 以下41例, 2 cm 以下で 1,000 ng/ml 以下31例, 2 cm 以下で 400 ng/ml 以下17例においてもそのフコシル化率はおおの 30 ± 30 , 32 ± 30 , 31 ± 29 , $30 \pm 31\%$ と良性肝炎患群に比較して統計学的に有意な上昇を認めた¹⁹⁾.

4. α FT の酵素活性測定, α FT 活性はヒトトランスフェリンより蛍光標識した agalacto-biantennary 型基質を用い, incubation time とした 2 時間以内では, 構成した reaction mixture で時間依存性に HPLC 上の product の位置に溶出された. 同ピークは α -fucosidase 消化により acceptor の位置に復する事を確認した. ヒト HCC 組織由来の α FT の至適

pH はほぼ中性領域で、非癌部に比較して癌部に活性の上昇を認めた。血漿中の α FT 活性は HCC や慢性肝疾患で、健常コントロール例に比較して上昇を示す例を認め、 α FT と AFP フコシル化率と有意な相関を示した。また、HCC 群における GnT III は肝硬変、慢性肝炎群に比較して有意に高値を示し¹⁷⁾、GnTV 活性ならびにその発現は転移や門脈浸潤と相関した。さらに Cox の比例ハザードモデルを用いた結果では、フコシル化 AFP は prognostic indicator と見なされ、18%以上群は、18%以下群に比較して有意に survival の短縮を認めた (図 1)²⁰⁾。

考 察

これまで HCC における RER の頻度は比較的低いと報告されているが、多くの報告は対照として既にエラーが蓄積していると思われる SL を用いており、正確な GI の評価がなされていない可能性がある。本来ゲノムの不安定性は、正常組織との比較により評価されるべきもので、著者らは同一個体の末梢白血球を対照として用いた。このことにより、HCC のみならず慢性肝炎、肝硬変における GI の評価も可能なものとなった。さらに、組織ごとにエラーの蓄積度を算出し、半定量的に評価することを試み、非担癌肝に比し担癌肝においてエラーの蓄積度が有意に増加していることが示された。このことはエラーの蓄積という観点から癌発生母地を評価することで、発癌のリスクを数値化できる可能性を示唆している。また、ゲノムの不安定性は特定の染色体に限られた現象ではなく、ゲノム全体に生じているものと推察された。また、テロメアは、慢性肝疾患の段階では肝細胞の壊死と再生の歴史を反映して減少し、慢性肝疾患肝組織中のテロメア長の減少度を測定することで、HCC の発癌リスクを評価できる可能性が示唆された。また、高いテロメラーゼ活性を有するクローンは生体内における種々の選択過程で生き延びる確率が高く、結果的にテロメラーゼ活性の程度は、腫瘍の悪性度を示す良い指標となる可能性が示唆された¹³⁾。さらに、担癌非癌部のテロメア長の有意な短縮は、発生母地としての肝硬変の malignant potential を評価する重要な因子であることが示された¹⁸⁾。

他方、HCC において産性される代表的な腫瘍マーカーである AFP においては、その分子内に一個の二分岐複合型アスパラギン結合糖鎖を持つことが知られている。著者らは、HCC 由来 AFP において良性肝疾患由来 AFP に比較してレンズマメレクチン結合性分画が有意

に増加を示すこと、この結合性分画の molecular basis が還元末端側 α 1-6 フコシル化であること⁵⁾⁶⁾¹¹⁾、ならびに、同様の糖鎖変異が生理的な蛋白である α 1 アンチトリプシンなどでもおきていることを報告してきた²¹⁾⁻²⁴⁾。さらに、この糖鎖変異が HCC の画像診断による指摘以前に認められる例も存在し、その早期診断、ならびに予知の可能性もあわせて報告してきた¹²⁾。現在この AFP フコシル化分画測定は L3 分画として保険収載されている。今回、多数例の検討を行いその診断的意義を再確認すると同時に、その酵素学的背景である、ヒト HCC 由来 α FT 活性測定のための基礎的臨床的検討を行った。その結果、 α FT による AFP フコシル化分画の酵素学的背景の説明が可能と考えられた。さらに、フコシル化 AFP ならびに GnTV は腫瘍の malignant potential を示す指標となる可能性が示され、治療選択の上で重要な情報を与えることが期待された。

以上述べた、HCC におけるゲノム不安定性と担癌非癌部におけるテロメアの短縮ならびに糖鎖変異とその酵素学的背景である糖転移酵素の検討は、multi-step carcinogenesis の観点より HCC 予知および早期診断、予防などの strategy を考える上で重要な情報を与えるものと思われた。

謝 辞

本研究は平成 8 年度有任基金 (医学研究助成金) による助成で行われたものであり、関係各位に深謝致します。

文 献

- 1) Canzian, F., Salovaara, R., Hemminki, A., Kristo, P., Chadwick, R.B., Aaltonen, L.A., de la Chapelle, A.: Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res.* 56: 3331~3337, 1996.
- 2) Yu, G.L., Bradley, J.D., Attardi, L.D., Blackburn, E.H.: In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* 344 (6262): 126~132, 1990.
- 3) Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W.: Telomeres shorten during aging of human fibroblasts. *Nature* 345: 458~460, 1990.
- 4) Blackburn, E.H., and Greider, C.W.(eds.), *Telomeres*. New York: Cold Spring Harbor

- Laboratory Press, 1995.
- 5) Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Isemura, M., Soga, K., Ozaki, T., Ichida, T., Inoue, K., Sasaki, H. and Ichida, F.: Differential reactivity of alpha-feto protein with lectins and evaluation of its usefulness in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Gann*, 75: 809~815, 1984.
 - 6) Aoyagi, Y., Isemura, M., Yosizawa, Z., Suzuki, Y., Sekine, C., Ono, T. and Ichida, F.: Fucosylation of serum alpha-fetoprotein in patient with primary hepatocellular carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta*, 830: 217~223, 1985.
 - 7) Aoyagi, Y., Isemura, M., Suzuki, Y., Sekine, C., Soga, K., Ozaki, K. and Ichida, F.: Fucosylated alpha-fetoprotein as marker of early hepatocellular carcinoma. *Lancet*, ii: 1353~1354, 1985.
 - 8) Aoyagi, Y., Isemura, M., Suzuki, Y., Sekine, C., Soga, K., Ozaki, K. and Ichida, F.: Change in fucosylation of alpha-fetoprotein on malignant transformation of liver cells. *Lancet*, i: 210, 1986.
 - 9) Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Isemura, M., Nomoto, M., Sekine, C., Igarashi, K. and Ichida, F.: The fucosylation index of alpha-fetoprotein and its usefulness in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 61: 769~774, 1988.
 - 10) Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Igarashi, K., Saitoh, A., Isemura, M., Oguro, M., Yokota, T., Nomoto, M. and Asakura, H.: The usefulness of the simultaneous determination of glucosaminylation and fucosylation indices of alphafetoprotein in the differential diagnosis of neoplastic diseases of the liver. *Cancer*, 67: 2390~2394, 1991.
 - 11) Aoyagi, Y., Suzuki, Y., Igarashi, K., Saitoh, A., Oguro, M., Yokota, T., Mori, S., Suda, T., Isemura, M. and Asakura, H.: Carbohydrate structures of human alphafetoprotein of patients with hepatocellular carcinoma: Presence of fucosylated and non-fucosylated triantennary glycans. *Brit J Cancer*, 67: 486~492, 1993.
 - 12) Aoyagi, Y., Saitoh, A., Suzuki, Y., Igarashi, K., Oguro, M., Yokota, T., Mori, S., Suda, T., Isemura, M. and Asakura, H.: Fucosylation index of alphafetoprotein, a possible aid in early recognition of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 17: 50~52, 1993.
 - 13) Suda, T., Isokawa, O., Aoyagi, Y., Nomoto, M., Tsukada, K., Shimizu, T., Suzuki, Y., Naitoh, A., Igarashi, H., Yanagi, M., Takahashi, T. and Asakura, H.: Quantitation of telomerase activity in hepatocellular carcinoma: A possible aid for a prediction of recurrent disease in the remnant liver. *Hepatology*, 27: 402~406, 1998.
 - 14) Uozumi, N., Teshima, T., Yamamoto, T., Nishikawa, A., Gao, Y.E., Miyoshi, E., Gao, C.X., Noda, K., Islam, K.N., Ihara, Y., Fujii, S., Shiba, T. and Taniguchi, M.: A fluorescent assay method for GDP-L-Fuc: N-Acetyl- β -D-glucosaminide α 1-6 fucosyltransferase activity, involving high performance liquid chromatography. *J Biochem* 1996; 120: 385~392.
 - 15) Hase, S., Ibuki, T. and Ikenaka, T.: Reexamination of the pyridylamination used for fluorescence labeling of oligosaccharides and its application to glycoproteins. *J Biochem*. 95: 197~203, 1984.
 - 16) Aoyagi, Y., Mori, S., Naitoh, A., Yanagi, M., Suzuki, Y., Suda, T., Isokawa, O., Igarashi, H., Takahashi, T., Isemura, M. and Asakura, H.: Alpha-fetoprotein producing renal cell carcinoma with the increased activity of N-acetylglucosaminyltransferase III. *Nephron*, 74: 409~414, 1996.
 - 17) Mori, S., Aoyagi, Y., Yanagi, M., Suzuki, Y. and Asakura, H.: N-acetyl-glucosaminyltransferase III activities in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 13: 610~619, 1998.
 - 18) Isokawa, O., Suda, T., Aoyagi, Y., Kawai, H., Takahashi, T., Tsukada, K., Shimizu, T., Nomoto, M., Igarashi, H., Yanagi, M., Suzuki, Y. and Asakura, H.: Reduction of telomeric repeat as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma; convenient evaluation by slot-blot analysis. *Hepatology*, 1999 in press.
 - 19) Aoyagi, Y.: Carbohydrate-based measurement on alpha-fetoprotein in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. Mini-Review. *Glycoconjugate Journal*, 12: 194~199, 1995.

- 20) Aoyagi, Y., Isokawa, O., Suda, T., Watanabe, M., Suzuki, Y. and Asakura, H.: Fucosylation index of alpha-fetoprotein as a possible prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, **83**: 2076~2082, 1998.
- 21) Sekine, C., Aoyagi, Y., Suzuki, Y. and Ichida, F.: The reactivity of alpha-1-antitrypsin with *Lens culinaris* agglutinin and its usefulness in the diagnosis of neoplastic diseases of the liver. *Brit J Cancer*, **56**: 371~375, 1987.
- 22) Saitoh, A., Aoyagi, Y. and Asakura, H. **Structural analysis on the sugar chains of alpha-1-antitrypsin**: Presence of fucosylated biantennary glycan in hepatocellular carcinoma. *Arch Biochem Biophys*, **303**: 281~287, 1993.
- 23) Suzuki, Y., Aoyagi, Y., Mori, S., Suda, T., Yanagi, M. and Asakura, H.: Microheterogeneity of serum transferrin in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, **11**: 358~365, 1996.
- 24) Naitoh, A., Aoyagi, Y. and Asakura, H.: Highly enhanced fucosylation of serum glycoproteins in patients with hepatocellular carcinoma, correlation of the fucosylations between alpha-fetoprotein, alpha-1-antitrypsin and transferrin. *J Gastroenterol Hepatol*. **14**: 432~441, 1999.
-