

最終講義

腫瘍マーカーによる肝癌診断・治療戦略 AFP糖鎖変異を中心に

青 柳 豊

新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器内科学分野（第三内科）

Altered Glycosylation of Alpha - fetoprotein in Patients with Hepatocellular Carcinoma, in Special Reference to Treatment to Hepatocellular Carcinoma

Yutaka AOYAGI

*Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Cellular Function,
Course for Molecular and Cellular Medicine,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University*

Abstract

The quantitative determinations of AFP (alpha - fetoprotein) has been extensively used for the detection of HCC (hepatocellular carcinoma). However, the serum concentration of AFP also increases moderately in nonneoplastic liver diseases. Moreover, the serum concentrations of AFP in HCC at the time of initial diagnosis became lower recently owing to the advancement of imaging modalities. Accordingly, these clinical circumstances lead to molecular discrimination of AFP between HCC and benign liver diseases by taking advantage of the reactivity of AFP with various lectins. LCA - reactive species of AFP was significantly greater in HCC than benign liver diseases. Molecular basis of this variation is the fucosylation of sugar chain at innermost N - acetylglucosamine residue. On the other hand, Con A - nonreactive species of AFP was significantly higher in AFP - producing gastrointestinal carcinoma than HCC and benign liver diseases. Molecular basis of Con A - nonreactive variants is the N - acetylglucosaminylation of the mannose residue at the trimannosyl core although the position to be modified is different. Therefore, the terms "fucosylation index, that is L3 fraction and glucosaminylation indices" were adopted to express the percentages of LCA - reactive and Con A - nonreactive species of AFP, respectively. These

Reprint requests to: Yutaka AOYAGI
Department of Gastroenterology and Hepatology,
JA Niigata Medical Center Hospital,
3 - 27 - 11 Nishi - kobari, Nishi - ku,
Niigata 950 - 2022, Japan.

別刷請求先：〒950 - 2022 新潟市西区小針 3 - 27 - 11
JA 新潟厚生連新潟医療センター 青柳 豊

indices are beneficial to the detection of HCC even if it is early stage. Furthermore, L3 from the sera before the initial treatment serves as a new prognostic factor and improves prognostic estimates and appraisal of therapeutic outcome in patients with HCC. Accordingly, not only quantitative but also qualitative measurements of AFP provide us very valuable information in the differential diagnosis of various liver diseases and the estimation of therapeutic outcome in patients with HCC.

キーワード：アルファフェトプロテイン、フコシル化、肝細胞癌、L3分画、多分岐化

はじめに

本邦における肝細胞癌（HCC）者数は年間3万人を超えており、臓器別死亡の第3番目に位置する。そして、その大多数が背景疾患としてウイルス慢性肝疾患、特にC型肝硬変を合併している。現在、これらウイルス慢性肝疾患を対象にHCC早期診断を目的としたアルファフェトプロテイン（AFP）などの腫瘍マーカーの測定によるスクリーニングが行われている。

本稿では著者らが行ってきたAFPのHCC特異性を改善したフコシル化分画（L3分画）測定法の開発の経緯ならびにその臨床的意義について著者らの成績を中心に概説する。

1. AFP陽性率

第19回全国原発性肝癌追跡調査報告によれば、HCCの60%（10,973/18,400例）がAFP陽性を呈しており、そのスクリーニング法として有用である事が示されている。しかしながら、AFPは最も鑑別が必要とされるHCCの背景疾患である肝硬変、慢性肝炎においても20から30%程度非特異的に上昇することが知られており、その特異性が低い欠点を有している。

2. HCC由来ならびに胎児性AFPの蛋白化学的比較研究

著者らはAFPのHCC特異性向上と生理機能解明を目的に、HCC由来ならびに胎児性AFPの精製、純化を行い、その両者の蛋白化学的比較研究

を行った。その結果、AFPの蛋白一次構造上に両者の大きな違いは認められないが糖組成に差がある事を報告した¹⁾。また、それらの経過中に得られた一次構造上の結果などより銅イオン、ビリルビンと結合する能力を有する事、ならびに、無細胞系でグロビン合成を阻害する活性を有することを報告した²⁾⁻⁴⁾。また、これらの生理活性においてはHCC由来ならびに胎児性AFPの間に大きな差は認められなかった。

3. 糖鎖を指標とした分子識別の試み

前記した糖鎖組成の差に着目し、糖鎖構造を反映する各種レクチンを用いた両者の分子識別を試みた。その結果、HCC由来AFPにおいて、レンズマメレクチン（LCA）に結合性を有する分画が肝硬変などの良性肝疾患由来AFPに比較し有意な増加を示し、総AFPに対するLCA結合性AFPの割合であるフコシル化率がHCCの早期診断に有用であることを見いだした⁵⁾⁻⁷⁾。また、コンカナバリンA（Con A）による反応性では、HCC、良性肝疾患由来AFPが結合性分画が主体であるのに対しAFP産生性消化器癌やヨークサック腫瘍では非結合性分画の明らかな上昇を認めた⁸⁾⁹⁾。すなわち、LCAとCon Aによる結合性を検討することで、HCC由来、良性肝疾患由来ならびに消化器癌由来AFPの3者の亜種を分子識別することが可能である結果を得た⁸⁾。

4. 糖鎖構造解析

HCCにおいて有意に上昇するLCA結合性分画

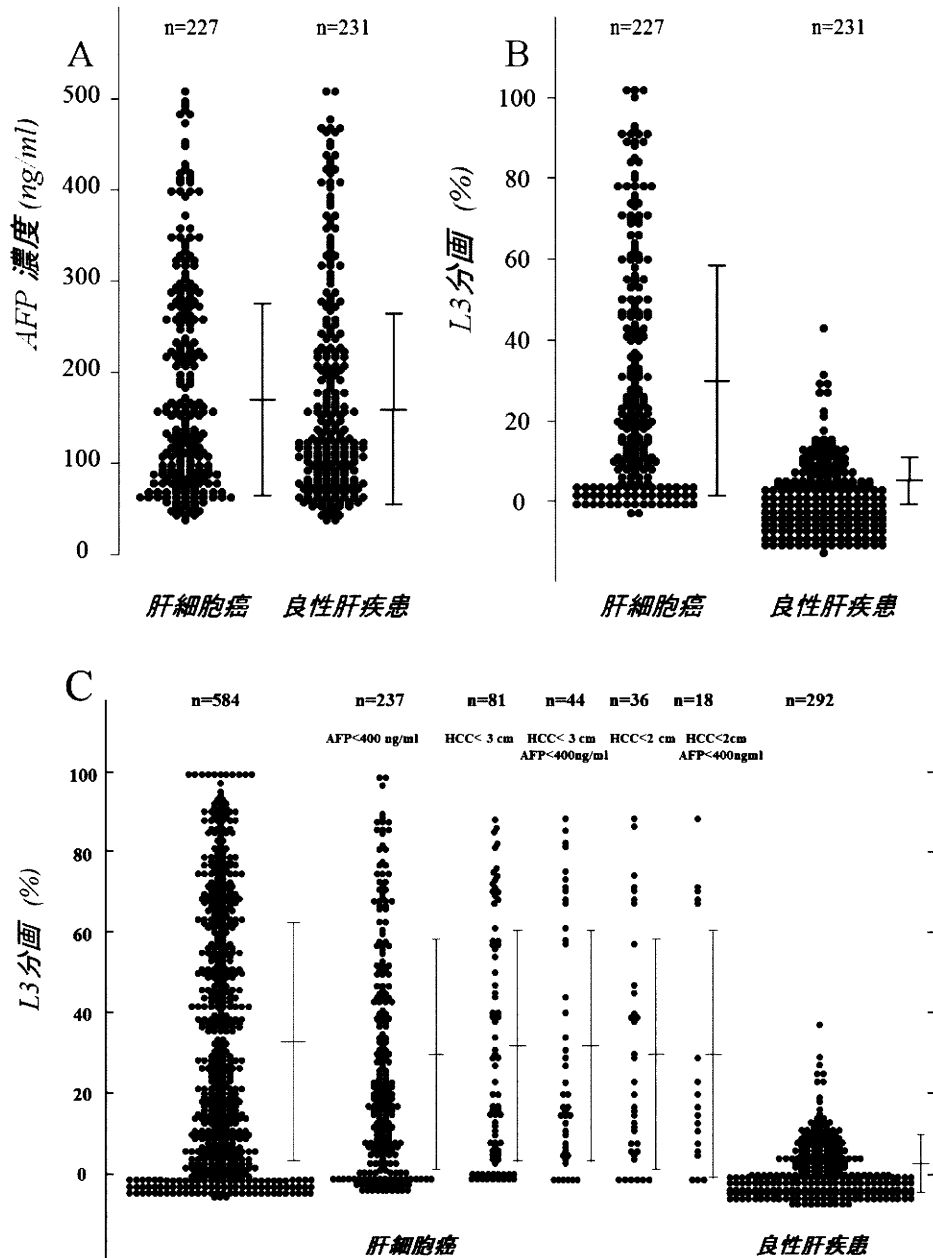


図 1

- A HCC 診断時の AFP 値が 500ng/ml 以下の症例 227 例と各種画像診断により腫瘍の存在を否定し得た良性肝疾患 (BLD) 231 例の血清 AFP 値をプロットしたもの。単なる AFP の絶対量では両疾患の鑑別は困難であることを示している。
- B 同対象での AFP フコシル分画のプロットで、両疾患の鑑別が可能である事を示す。
- C 肝細胞癌 584 例, AFP 濃度 400ng/ml 以下の 237 例, 最大径 3cm 以下の 81 例, 最大径 3cm 以下で AFP 濃度 400ng/ml 以下の 44 例, 最大径 2cm 以下の 36 例, 最大径 2cm 以下で AFP 濃度 400ng/ml 以下の 18 例いずれにおいても L3 分画は良性肝疾患に比較して有意な上昇を示している。

の糖鎖組成解析ならびに糖ペプチドとフコシダーゼを用いた検討により、LCA 結合性分画の糖鎖には中性糖の一つであるフコースが存在することを報告した¹⁰⁾。つぎに、糖鎖構造解析を目的とした糖鎖微量蛍光標識法であるピリジルアミノ化法と高速液体クロマトグラフィーによる分析で、このLCA 結合性AFPの糖鎖構造が二分岐型複合糖鎖の還元末端側のN-アセチルグルコサミンに α 1-6の形式でフコースが結合したものであることを明らかにした¹¹⁾。そして、総AFPに対するLCA 結合性分画の割合、すなわちフコシル化AFP分画の測定が、肝硬変をはじめとする慢性肝疾患経過観察中におけるHCCの早期診断に有用であることを提唱してきた。

5. フコシル化AFPによる鑑別

図1AはAFP濃度500ng/mlを上限として、当科でのHCCならびに肝硬変を主とする良性肝疾患のAFP濃度をプロットしたものであるが、濃度での両疾患の識別は困難である。しかしながら、図1BはAFP濃度では極めてオーバーラップが多かった両群のAFP-L3(フコシル化)分画の割合をプロットしたものであるが、有意なHCCでの上昇を認め、これらの鑑別に有用であることが理解出来る¹²⁾¹³⁾。当科で現在まで行った1,000例を超えるHCC症例と良性肝疾患約500例あまりの結果においてもHCC群で有意な上昇を示し、さらに、早期のHCCである最大径3cm以下の症例や2cm以下の症例においても統計学的に有意なL3分画の上昇を呈している。すなわち、AFP濃度では困難な両疾患の鑑別がフコシル化AFP分画(L3分画)測定で可能である事を示している。また、本分画と濃度とは関連を認めず、互いに独立した因子と考えられる。これらの総AFPに対するフコシル化AFPの割合はAFPのL3分画測定法として1996年より保険収載され、日常診療に用いられている。

6. 同一症例でのフコシル化亢進

著者らは肝硬変経過観察中にAFPが上昇を示し、各種画像診断によりHCCの存在が否定され、

その後の数年の経過観察を経てHCCへ進展した症例におけるL3分画の変化を複数症例において報告している。これらの症例では、肝硬変時のL3値は低値を呈するにもかかわらずHCC進展時においては有意なL3の上昇を示していた¹⁴⁾。

7. AFP-L3分画によるHCC予知の可能性

AFP持続陽性C型肝硬変例の前向き経過観察において、最大径2cm以下のHCCを、画像診断による指摘より2~4年先行してL3分画上昇を認め、HCCの出現を予知した症例を複数例報告している¹⁵⁾。この事実はAFPのフコシル化亢進という分子基盤が癌化の比較的早期の段階で起きていることを示すもと考えられる。

8. 他の血清糖蛋白のフコシル化

AFP以外の生理的に存在する血清糖蛋白である α 1アンチトリプシン¹⁶⁾¹⁷⁾やトランスフェリン¹⁸⁾においても、HCCではAFPと同じ糖鎖変異である二分岐型複合糖鎖の還元末端側のN-アセチルグルコサミンに α 1-6形式のフコシル化の亢進が起きていることを報告している。この事実は複合型糖鎖の還元末端側のフコシル化という事象が癌化において普遍的に起きている事を示しており、また、臨床的にはAFP非産生HCCの診断に用いる事が出来ると考えられる¹⁹⁾。

9. HCC予後規定因子としての意義

当科にて内科的治療を行ったHCC302例における予後とそれに影響をおよぼす因子をCoxの比例ハザードモデルを用いて検討するとTumor Stageや肝予備能を示す因子の他に、L3分画が有意な予後規定因子として抽出出来る。また、 Kaplan-Meier法による生命予後の検討では、治療前L3分画高値群と低値群の間に、有意な生存率の差が認められた²⁰⁾。

10. 生物学的悪性度を示す指標

さらに同一Stageに限った検討でも、Stage Iでは有意差を認めなかったが、Stages II, III, IVA, IVBにおいて治療前L3分画高値群は明らかに低

値群に比較して予後不良であった。この事実は、本分画が腫瘍の生物学的悪性度を評価出来るマーカーである事を示していると考えられる^{21) - 24)}。

11. 自動化 L3 分画測定法

L3 分画は Taketa²⁵⁾ らの開発したレクチン含有ゲル電気泳動での測定法で行われていたが、現在は自動化測定系による高感度化が計られている²⁶⁾。これらの基本的原理は著者らが報告している糖鎖結合部位近傍の抗原決定基を認識するモノクローナル抗体と LCA との競合阻害による測定系である^{27) 28)}。

12. 高感度化 L3 測定法

近年、電気泳動法に変わる第一世代 (LiBASys 法) ならびに第二世代であるミュータスワコーによる高感度化が計られている。従来法でのカットオフ値 10% では陽性率が 38% であったのに対し、同じ 10% のカットオフ値で陽性率は 48%、さらにカットオフ値を 7% に引き下げることにより、特異性を 90% 以上に保ったまま、陽性率を 60% までに上昇させる結果であった。また、従来法、高感度法の Stage 別陽性率の比較では、Stage I においても従来法のカットオフ値では 16% であったのに対して、46% まで診断能の改善が可能であり、全症例の陽性率も 40% から 60% へ上昇を示している^{29) - 33)}。

13. L3 分画解釈上の注意点

本検査法の特徴は特異性 (specificity) が高いことであり、当科の検討では 96% であった。また、良性肝疾患で L3 分画 20% 以上を示した例は自己免疫性肝炎を含む重症型急性肝炎例が多く、臨床的に鑑別可能例が大半であった⁷⁾。

LC などにおける本分画の上昇 (10% 以上) は HCC が存在することを前提に各種画像診断を行う必要がある。また、重要なことは、低値がすなわち HCC の否定にはつながらない事に留意すべきである。当科のデータでは HCC の約 30% が本分画 10% 以下を示している。

14. フコシル化 AFP よりみた HCC の治療目標

フコシル化を受けた AFP の分子種は肝癌細胞に極めて特異的であり、腫瘍の悪性度を示すマーカーであることより、治療後本分画を低下し得た HCC 群では、非低下群に比較して明らかに生命予後の改善を認めた²⁹⁾。すなわち、HCC の治療目標を AFP の L3 分画低下ないし陰性化を目指す事が妥当と考えられる。

15. フコシル化の酵素学的背景

フコシル化の酵素学背景である α 1-6 フコース転移酵素の血漿中活性と AFP-L3 の関連を検討すると、両者には有意な正の相関々係が存在し、酵素活性と product の関係として矛盾しない結果であった。また、HCC 組織中活性ならびにその mRNA は周辺非癌部肝硬変組織に比較して高値を示した³⁴⁾。しかしながら、疾患群として本酵素活性を計測すると慢性肝炎や肝硬変においてすでに高値を呈しており AFP で認められた L3 分画ほど際だった差は得られなかった。今後、酵素活性と product としてのフコシル化の差を生ずる調節機構の解明が必要と考えられる。

16. Con A 非結合性分画として認識される AFP 糖鎖の多分岐化

AFP 糖鎖においてはフコシル化と共にバイセクト型を含む多分岐化変異 (グルコサミニル化) が各種 AFP 産生性腫瘍で認められる。これらの多分岐化糖鎖は trimannosyl core に N-アセチルグルコサミンが付加され、Con A に反応性を有しなくなるため、総 AFP に対する Con A 非結合性分画として表記している。この変化は胃癌、大腸癌、膵癌などの消化管由来 AFP 産生腫瘍やヨークサック腫瘍において認められるものであり、その鑑別診断に有用である。著者らは AFP のレクチン分画測定の際は、フコシル化を評価するレンズマメレクチンと多分岐化糖鎖を測定する Con A の二者をペアーで行ってきた^{8) 35) - 37)}。

表1 AFP糖鎖のフコシル化, 多分岐化とその疾患特異性

| <u>基本糖鎖</u> | | |
|--|--|---------------|
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 | } Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc | 良性肝疾患 |
| <u>フコシル化</u> | | |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 | } Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc Fuc α 1-6 | 肝細胞癌 |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 GlcNAc β 1-4 | } Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc Fuc α 1-6 | ヨークサック腫瘍 |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 Man α 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-4 Man α 1-3 | } Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc Fuc α 1-6 | 消化器癌 混合型肝癌 |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 Man α 1-3 | } Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc Fuc α 1-6 | 肺癌, 腎癌 |
| <u>多分岐化(グルコサミニル化)</u> | | |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 Man α 1-6 Gal β 1-4GlcNAc β 1-4 Man α 1-3 | } Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc | 消化器癌 混合型肝癌 |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 Man α 1-3 | } Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc | 腎癌 |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6 GlcNAc β 1-4 | } Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc | |
| Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 | } Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc | |

17. 多分岐化糖鎖とその酵素学的背景の臨床的意義

AFPの多分岐変異をHCC, 良性肝疾患ならびにAFP産生性各種疾患につき検討すると, HCC, 良性肝疾患では上昇を示さないのに対して, AFP産生消化器癌の肝転移や混合型肝癌では, 前二者に対して有意な上昇を示した. すなわち, 肝腫瘍の鑑別という立場よりは原発性か転移性の鑑別に有用と考えられる. また, これらの他にもyolk sac tumorにおいても明らかな上昇を示し, yolk sac型glycosylationの特徴と考えられる⁸⁾⁹⁾. また, これら多分岐型糖鎖の酵素学的背景であるIII型, V型グルコサミン転移酵素がAFP産生性腎癌ならびにHCCの転移浸潤能を評価する因子として臨床的に有用である結果を報告している³⁵⁾⁻³⁷⁾.

18. AFP糖鎖の疾患特異性

表1は各種AFP産生性腫瘍ならびに良性肝疾患のフコシル化, 多分岐化の疾患特異性を示す. 良性肝疾患においては基本糖鎖である二分岐複合型糖鎖にフコシル化, 多分岐化(グルコサミニル化)のいずれの修飾も受けない糖鎖が主体である. これに対して, HCCにおいてはフコシル化の上昇を認めるが, 多分岐型糖鎖の出現頻度はそれほど高くない. 他方, 消化器癌の肝転移や混合型肝癌では, フコシル化ならびに多分岐化の両者の出現が認められる. ヨークサック腫瘍においては多分岐化と顕著なフコシル化の亢進を認める. すなわち, AFPの糖鎖という極めて限られた領域においてもその疾患特異性が認められ, その調節機構の存在と疾患特異性による診断的意義が理解できる.

おわりに

現在 AFP は、その濃度のみならず質的变化である糖鎖変異による情報が得られるようになった。この AFP 糖鎖の疾患特異性は AFP 産生性消化器疾患の鑑別診断において有用であるのみならず、特に L3 分画は HCC の生物学的悪性度を表し、HCC の予後の指標として用いることが出来ることが明らかになってきた。

今後、非アルコール性脂肪性肝炎などを中心とする非 B 非 C 肝癌のサーベイランスにおいて、高感度化された L3 を含む腫瘍マーカーの意義がますます重要になると考えられる。

文 献

- 1) Aoyagi Y, Ikenaka T and Ichida F: Comparative chemical structures of human alpha - fetoprotein from fetal serum and from ascites fluid of a patient with hepatoma. *Cancer Res.*, 37: 3663 - 3667, 1977.
- 2) Aoyagi Y, Ikenaka T and Ichida F: Copper (II) - binding ability of human alpha - fetoprotein. *Cancer Res.*, 38: 3483 - 3486, 1978.
- 3) Aoyagi Y, Ikenaka T and Ichida F: alpha - Fetoprotein as a carrier protein in plasma and its bilirubin - binding ability. *Cancer Res.*, 39: 3571 - 3574, 1979.
- 4) Aoyagi Y, Takahashi T, Odani S, Ogata K, Ono T and Ichida F: Inhibitory effect of alpha - fetoprotein on protein synthesis in a reticulocyte lysate cell - free system. *J. Biol. Chem.*, 257: 9566 - 9569, 1982.
- 5) Aoyagi Y, Suzuki Y, Isemura M, Soga K, Ozaki T, Ichida T, Inoue K, Sasaki H and Ichida F: Differential reactivity of alpha - fetoprotein with lectins and evaluation of its usefulness in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Gann*, 75: 809 - 815, 1984.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Aoyagi Y, Suzuki Y, Igarashi K, Saitoh A, Isemura M, Oguro M, Yokota T, Nomoto M and Asakura H: The usefulness of the simultaneous determinations of glucosaminylation and fucosylation indices of alpha - fetoprotein in the differential diagnosis of neoplastic diseases of the liver. *Cancer*, 67: 2390 - 2394, 1991.
- 9) Aoyagi Y, Suzuki Y, Igarashi K, Yokota T, Mori S, Suda T, Isemura M and Asakura H: Highly enhanced fucosylation of alpha - fetoprotein in patients with germ cell tumor. *Cancer*, 72: 615 - 618, 1993.
- 10) Aoyagi Y, Isemura M, Yosizawa Z, Suzuki Y, Sekine C, Ono T and Ichida F: Fucosylation of serum alpha - fetoprotein in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 830: 217 - 223, 1985.
- 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 alpha - fetoprotein of patients with hepatocellular carcinoma: presence of fucosylated and non - fucosylated triantennary glycans. *Brit J Cancer*, 67: 486 - 492, 1993.
- 12) Aoyagi Y: Molecular discrimination between alpha - fetoprotein from patients with hepatocellular carcinoma and nonneoplastic liver diseases by their carbohydrate structures. Invited Review Article. *Int. J. Oncology*, 4: 369 - 383, 1994.
- 13) Aoyagi Y: Carbohydrate - based measurement on alpha - fetoprotein in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma. Mini - Review. *Glycoconjugate Journal*, 12: 194 - 199, 1995.
- 14) 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.
- 15) Aoyagi Y, Saitoh A, Suzuki Y, Igarashi K, Oguro M, Yokota T, Mori S, Suda T, Isemura M and

- Asakura H: Fucosylation index of alpha - fetoprotein, a possible aid in early recognition of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 17: 50 - 52, 1993.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) Aoyagi Y, Isokawa O, Suda T, Watanabe M, Suzuki Y and Asakura H: The fucosylation index of alpha - fetoprotein as a possible prognostic indicator for patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 83: 2076 - 2082, 1998.
- 21) 厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)総括研究報告書(平成17-19年度)AFP-L3分画および血流中癌細胞テロメラーゼを指標とした肝細胞癌のサーベイランスの有用性に関する研究,主任研究者,青柳豊,分担研究者恩地森一,田中榮司,高木均.
- 22) Aoyagi Y, Mita Y, Suda T, Kawai K, Kuroiwa T, Igarashi M, Kobayashi M, Waguri N and Asakura H: The fucosylation index of serum alpha - fetoprotein as useful prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma in special reference to chronological changes. *Hepatology Res*. 23: 287 - 295, 2002.
- 23) Igarashi H, Aoyagi Y, Suda T, Mita Y and Kawai H: Studies on the correlation among the fucosylation index, concentration of alpha - fetoprotein and des - gamma - carboxy prothrombin as prognostic indicators in hepatocellular carcinoma. *Hepatology Res*. 27: 280 - 288, 2003.
- 24) Kobayashi M, Kuroiwa T, Suda T, Tamura Y, Kawai H, Igarashi M, Fukuhara Y and Aoyagi Y: Fucosylated fraction of alpha - fetoprotein, L3, as a useful prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma with special reference to the low concentration of serum alpha - fetoprotein. *Hepatology Res*. 37: 914 - 922, 2007.
- 25) Taketa K, Ichikawa E, Taga H and Hirai H: Antibody - affinity blotting, a sensitive technique for the detection of alpha - fetoprotein separated by lectin affinity electrophoresis in agarose gels. *Electrophoresis* 6: 492 - 497, 1985.
- 26) Yamagata Y, Shimizu K, Nakamura K, Henmi F, Satomura S, Matsuura S and Tanaka M: Simultaneous determination of percentage of Lens culinaris agglutinin - reactive alpha - fetoprotein and alpha - fetoprotein concentration using the LiBASys clinical auto - analyzer. *Clin Chim Acta*. 327: 59 - 67, 2003.
- 27) Suzuki Y, Aoyagi Y, Muramatsu M, Isemura M and Ichida F: Close topographical relationship in alpha - foetoprotein (AFP) between a lens culinaris binding glycan and the epitope recognized by AFP - reactive monoclonal antibody, 18H4. *Brit J Cancer*, 55: 147 - 152, 1987.
- 28) Suzuki Y, Aoyagi Y, Muramatsu M, Igarashi K, Saitoh A, Oguro M, Isemura M and Asakura H: A lectin - based monoclonal enzyme immunoassay to distinguish fucosylated and non - fucosylated alpha - fetoprotein molecular variants. *Ann Clin Biochem*, 27: 121 - 128, 1990.
- 29) Tamura Y, Yamagiwa S, Aoki Y, Kurita S, Suda T, Ohkoshi S, Nomoto M and Aoyagi Y: Serum alpha - fetoprotein levels during and after interferon therapy and the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*. 54: 2530 - 2537, 2009.
- 30) Tamura Y, Igarashi M, Suda T, Wakai T, Shirai Y, Umemura T, Tanaka T, Kakizaki S, Takagi H,

- Hiasa Y, Onji M and Aoyagi Y: Fucosylated fraction of alpha-fetoprotein as a predictor of prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment. *Dig Dis Sci*. 55: 2095 - 2101, 2010.
- 31) Tamura Y, Igarashi M, Kawai H, Suda T, Satomura S and Aoyagi Y: Clinical Advantage of Highly Sensitive On - Chip Immunoassay for Fucosylated Fraction of Alpha - Fetoprotein in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2010 Dec; 55: 3576 - 3583. Epub 2010.
- 32) Aoyagi Y, Tamura Y, Suda T and EDITORIAL: History and recent progress in evaluation of the fucosylated alpha - fetoprotein fraction, *J Gastroenterol Hepatol*, 26: 615 - 616, 2011.
- 33) Tamura Y, Suda T, Arie S, Sata M, Moriyasu F, Imamura H, Kawasaki S, Izumi N, Takayama T, Kokudo N, Yamamoto M, Iijima H and Aoyagi Y: Value of Highly Sensitive Fucosylated Fraction of Alpha - Fetoprotein for Prediction of Hepatocellular Carcinoma Recurrence After Curative Treatment. *Dig Dis Sci*. 2013. [Epub ahead of print]
- 34) Mita Y, Aoyagi Y, Suda T and Asakura H: Plasma fucosyltransferase activity in patients with hepatocellular carcinoma, with special reference to correlation with fucosylated species of alpha-fetoprotein. *J Hepatology*, 32: 946 - 954, 2000.
- 35) Mori S, Aoyagi Y, Yanagi M, Suzuki Y and Asakura H: N - acetylglucosaminyl - transferase III activities in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 13: 610 - 619, 1998.
- 36) Yanagi M, Aoyagi Y, Suda T, Mita Y and Asakura H: N - acetylglucosaminyl - transferase V as a possible aid for the evaluation of tumor invasiveness in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 16: 1282 - 1289, 2001.
- 37) 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.
-