

肝癌及びその他の肝疾患組織における AFP mRNA の発現

伊林 由美子 東出 俊之 今井 浩三

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

AFP mRNA Expression in Tissues of Hepatocellular Carcinoma and Other Liver Diseases

Yumiko IBAYASHI, Toshiyuki HIGASHIDE and Kohzoh IMAI

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. A. YACHI)

ABSTRACT In order to analyze the characteristic distribution and intensity of mRNA of alpha-fetoprotein (AFP) in liver diseases, the tissues of hepatocellular carcinoma (HCC), liver cirrhosis (LC) and other benign liver diseases were investigated by *in situ* hybridization (ISH) with biotinylated AFP cDNA. These results were compared with those of AFP gene products detected by the immunohistochemical method using anti-AFP monoclonal antibody, and with those of AFP mRNA expression investigated by Northern blot (NB) analysis. In addition, the expression of AFP mRNA was studied by polymerase chain reaction (PCR) in some cases. The following results were obtained.

1. Human hepatocellular carcinoma cell line HuH-7, which produces AFP, showed positive staining using the *in situ* hybridization technique with a AFP cDNA probe, whereas human cell lines, which do not produce AFP, failed to show positive results. Pretreatment of HuH-7 cells with RNase abolished the reactivity. Furthermore, the Northern blot technique using this cDNA probe produced a 2.1 kb band which corresponds with AFP mRNA. These results indicate that the AFP cDNA probe used in this study is specific for detecting AFP mRNA.

2. In 74% of cancerous tissues, AFP mRNA was detected by the ISH. This incidence was significantly higher than that (24%) of the NB analysis. Interestingly, the incidence of positivity for HCC with LC (HCC with LC group) was not so different from that for HCC without LC (HCC group). Four out of 6 patients who showed less than 20ng/ml of AFP concentration in their sera showed positive results in the cancerous parts of their tissues. The incidence of positivity by the immunohistochemical staining was 44%, with localization being almost the same as that by the ISH technique.

3. In non-cancerous tissues from patients, 44% of the cases were shown to be positive by the ISH and 28% by immunohistochemical staining, whereas none were shown to be positive by the NB tech-

Abbreviations

AFP	: alpha-fetoprotein	LC	: liver cirrhosis
BSA	: bovine serum albumin	MOPS	: 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid
cDNA	: complementary DNA	mRNA	: messenger RNA
dNTPs	: deoxyribonucleoside triphosphates	NB	: Northern blot
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid	PBS	: phosphate-buffered saline
HCC	: hepatocellular carcinoma	PCR	: polymerase chain reaction
ISH	: <i>in situ</i> hybridization	RNase	: ribonuclease
kb	: kilobase	SSC	: standard saline citrate

nique.

4. Cases of liver cirrhosis, chronic hepatitis and other benign liver diseases were also analyzed. One case out of 6 LC patients and 4 out of 30 chronic hepatitis ones showed positive results using the ISH. No cases had positive results by the immunohistochemical method.

5. In the cases which showed positive results by the ISH, but were negative by the NB analysis, the PCR was carried out. The results obtained by the ISH were confirmed by this technique.

6. ISH employing liver tissue sections was useful to study the expression of AFP mRNA, and to define the preneoplastic states, such as liver cirrhosis, as well as to analyze cancerous tissues.

(Received April 24, 1991 and accepted June 28, 1991)

Key words: AFP, Biotinylated AFP cDNA, *In situ* hybridization, Hepatocellular carcinoma, Liver cirrhosis

1 緒 言

近年の遺伝子工学の技術の進歩により、多くの遺伝子がクローニングされ、これらのcDNAを用いた分子生物学的手法の応用により、遺伝子発現をRNAのレベルで解析することが可能となってきた。

ヒトのalpha-fetoprotein(AFP)についても、1982年にMorinaga *et al.*によりcDNAがクローニングされ¹⁾、さらに1983年にはAFP mRNAの全配列が決定され、一次構造も明らかとなった²⁾。肝細胞癌における血清AFPの異常上昇が癌の進展と密接に関連していること³⁾、肝硬変における血清AFPの上昇が前癌状態にある細胞の存在を示唆していること⁴⁾などに関連して、cDNAプローブを利用してmRNA及び遺伝子レベルでのアプローチが注目される。

一方、特定の遺伝子のDNAやmRNAを組織切片上で検出する*in situ* hybridization (ISH)法が開発され⁵⁾、個々の細胞レベルにおける遺伝子発現の状態が検索可能となってきた^{6,7)}。また、近年のpolymerase chain reaction (PCR)法⁸⁾の開発、thermostable DNA polymeraseの利用⁹⁾やthermal cyclerの導入とあいまって、遺伝子工学の臨床的応用を拡大しつつある。

そこで本研究においては、肝癌及びその前癌病変と目される組織におけるmRNAレベルでの解析を目的として以下のような検索を行なった。すなわち、AFP cDNAをビオチンで標識した非放射性プローブを作製し、培養細胞ならびに臨床材料を用い、肝細胞癌、肝硬変及びその他の肝疾患についてAFP遺伝子の発現を*in situ* hybridization法により検討し、Northern blot (NB)法、及び免疫組織学的手法による産物レベルでの成績と比較検討した。また、一部の症例ではPCR法

を用いてmRNAの発現を検索した。

2 方 法

2・1 培養細胞株及び臨床組織材料

2・1・1 培養細胞株

培養ヒト肝癌細胞としてHuH-7及びc-Hc-20の各培養細胞を、培養ヒト肝細胞としてChang細胞を、また培養ヒト胃癌細胞としてMKN 45を、それぞれ用いた。これらを10%牛胎仔血清加RPMI 1640培養液(GIBCO, USA)を用い、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。またHuH-7細胞には微量の不飽和脂肪酸および微量元素を含むIS-RPMI溶液¹⁰⁾を用いた。これらは4% paraformaldehydeにより固定し、2・1・2に示す臨床組織材料と同様の方法で処理して実験に供した。

2・1・2 臨床組織材料

本実験で用いた臨床組織材料は手術、生検(腹腔鏡下、あるいは超音波ガイド下)及び剖検により得た。なお、これらの症例についてはinformed consentが得られている。癌症例では癌部と同時に非癌部を用いた。得られた組織材料は、採取後直ちに4% paraformaldehydeにより固定した後、30% sucroseで脱水処理を施し、OCT compound (Miles, USA)中に包埋後、-80℃に凍結保存した。これらの標本より凍結切片を作製し、hematoxylin-eosin染色、*in situ* hybridization法及び免疫組織学的検索に用いた。一部の標本はホルマリンあるいはエタノールにより固定し、パラフィン切片として用いた。またNorthern blot法ならびにPCR法のために標本の一部は、採取後直ちに-80℃で凍結し、total RNAの抽出に用いた。

2・2 cDNA プローブ

本研究で行なった*in situ* hybridization法、North-

ern blot 法及び Southern blot 法においては、玉置大器教授（カナダ・カルガリー大学医学部生化学）より供与された AFP cDNA である pHAF-7²⁾ の Pst I 断片 1.2 kb を用いた。Negative control として pAZ 10 (amyloid β protein cDNA), pHCG (pchCG-beta #67: HCG cDNA), T β (T cell receptor β gene cDNA) を用いた。AFP 以外の各プローブはがん研究振興財団遺伝子バンクより供与された。

2.3 *In situ* hybridization 法

2.3.1 プローブの標識

本研究で用いたプローブの標識はランダムプライマー法¹¹⁾によった。すなわち cDNA を熱変性により一本鎖とした後、DNA polymerase I の large fragment (TAKARA, Japan) によりピオチン標識 dUTP (BRL, USA) を取り込ませて標識した。

2.3.2 *In situ* hybridization 法

In situ hybridization 法は、Singer *et al.*¹²⁾ の方法を一部改変し行なった。すなわち、凍結切片あるいは脱パラフィン後のパラフィン切片を PBS で 10 分間処理した後、proteinase K (Boehringer, Germany) により 1 μ g/ml, 37°C, 10~30 分の条件で除蛋白操作を行なった。PBS で洗浄後、4% paraformaldehyde で後固定を 5 分間行ない、再び PBS で洗浄し、内因性アルカリフォスファターゼ活性のブロックのため、Jensen *et al.*¹³⁾ の方法に準じて 0.01 M EDTA, 0.01 M MgCl₂ で反応させた (室温, 30 分間)。その後 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 M glycine を加え、さらに 50% deionized formamide, 2 倍濃縮の SSC (2 \times SSC) により 70°C, 10 分間処理後、ピオチン化 cDNA プローブをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション液として 50% deionized formamide, 2 \times SSC, 10% dextran sulphate (Pharmacia, Sweden), 0.2% BSA, 20 mM vanadyl ribonucleoside complex (BRL, USA) より成る混合液を使用し、その中にプローブ (最終濃度 0.25 μ g/ml) を加え、前処理した切片と 37°C, 15~20 時間 で反応させた。その後のシグナルの検出は以下のごとく行なった。すなわち 50% formamide, 2 \times SSC (室温, 30 分), 50% formamide, 1 \times SSC (室温, 30 分), 1 \times SSC (室温, 30 分) により洗浄の後、3% BSA 中で 37°C, 30 分間処理した。次にピオチンと親和性のあるストレプトアビジン (Boehringer, Germany) を 1 μ g/ml, 室温, 1 時間の条件で反応させ、さらにピオチン化アルカリフォスファターゼ (1 U/ml) (Vector laboratories, USA) を室温, 1 時間反応させ、ストレプトアビジンと架橋を

形成させた。最後に、nitroblue tetrazolium (0.33 mg/ml) (Sigma, USA), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (0.17 mg/ml) (Sigma, USA) を反応基質として加え発色させた。核染色は 1% methyl green (Sigma, USA), あるいは 0.1% nuclear fast red (Sigma, USA) により行なった。その判定には、同一材料について数枚以上の標本を作製し、非特異的陽性のみられやすい辺縁部分をさけ、数回再現される明瞭な紫色の着色部分を有する材料を陽性とした。

また、HuH-7 細胞にあらかじめ RNase A (1 mg/ml) (Boehringer, Germany) を 2 時間処理して、その後に *in situ* hybridization を行ない、RNase の影響を検索した。

2.4 Northern blot 法

2.4.1 Total RNA の抽出

2.1.2 で得られた凍結組織材料を液体窒素中でホモジナイズした後、Chirgwin *et al.*¹⁴⁾ の方法に従い guanidinium thiocyanate 法により total RNA を抽出した。

2.4.2 プローブの標識

2.2 において述べたプローブを、ニックトランスレーション法¹⁵⁾により標識した。Specific activity は $5\sim 8\times 10^8$ cpm/ μ g であった。

2.4.3 Northern blot 法

Northern blot 法は Goldberg¹⁶⁾ の方法に準じて行なった。すなわち 2.4.1 で抽出した total RNA 20 μ g を Goldberg buffer (0.04 M MOPS, 5 mM sodium citrate, 0.5 mM EDTA), 16% formaldehyde を含む 1% agarose gel (Bio-Rad, USA) で 30 V, 約 8 時間電気泳動を行なった。泳動後、RNA をニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell BA 85, Germany) に転写し、続いてポリシーラーバッグ内で 2.4.2 で作製したプローブを最終濃度 0.4×10^6 cpm/ml となるように加え、ニトロセルロース膜を 15~20 時間, 42°C に保ち、ハイブリダイゼーションを行なった。次にニトロセルロース膜を洗浄した後、XAR-5 フィルム (Kodak, USA) を用い、-80°C においてオートラジオグラフィーを行なった。

2.5 polymerase chain reaction 法

2.5.1 オリゴヌクレオチドプライマー

本研究には MilliGen/Bioscience (USA) より供与された AFP アミノ酸残基の 146 位~152 位と同一配列の cDNA (upstream primer), ならびに 240 位~246 位と相補的配列を有する cDNA (downstream primer) を用いた。

2.5.2 PCR 法

PCR 法は Saiki *et al.*^{8,9)} に準じて行なった。すなわち 2.4.1 で得られた total RNA 1 μ g を 90°C, 5 分間加熱し, 10×amplification buffer (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 0.1% gelatin) 2 μ l, dNTPs 混合溶液 (4 種それぞれ 10 mM), downstream primer 10 pmoles, ribonuclease inhibitor (RNasin, Promega, USA) 20 units, 50 mM MgCl₂ 1 μ l, M-MLV reverse transcriptase (BRL, USA) 100 units 及び無菌蒸留水を加えて 20 μ l とし, 30 分間, 37°C に保ち, 次に 95°C, 5 分間の加熱により reverse transcriptase を不活化した。続いて以下に述べる操作で DNA の amplification を行なった。すなわち, upstream primer 10 pmoles に 1×amplification buffer を加えて 79 μ l とし, AmpliTaq™ DNA polymerase (5 units/ μ l) (Perkin Elmer Cetus, USA) 1 μ l を加え, 以下に述べるサイクルに設定した Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, USA) にセットした。熱変性, アニールング及び伸長反応の温度と時間を, 最初のサイクルでは 94°C, 5 分, 50°C, 2 分, 72°C, 3 分, 続く 25 サイクルを各 94°C, 1 分, 50°C, 2 分, 72°C, 3 分と設定し, 最後のサイクルは 94°C, 1 分, 50°C, 2 分, 72°C, 10 分の条件で行なった。

2.5.3 Southern blot 法

Southern blot 法は Southern の方法¹⁷⁾ に準じた。すなわち 2.5.2 で得られた PCR 産物をアガロースゲルに電気泳動後, ニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell BA85, Germany) に転写し, 続いてポリシーラーバッグ内で 2.4.2 で作製したプローブを最終濃度 0.4×10⁶ cpm/ml となるように加え, 恒温槽内で 3 時間, 68°C に保ち, ハイブリダイゼーションを行なった。次にニトロセルロース膜を洗浄した後, XAR-5 フィルム (Kodak, USA) を用い, -80°C においてオートラジオグラフィーを行なった。

2.6 免疫組織学的検索

2.1.2 で述べた組織切片を用い, 遠藤・今井¹⁸⁾ の方法に従い間接免疫ペルオキシダーゼ法を行なった。一次抗体としてわれわれの教室で作製した AFP のペプチドをエピトープするモノクローナル抗体 OA 37 (IgG 1) を用い, 次いで二次抗体としてビオチン化ウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体 (DAKO, Denmark) を反応させ, ABC 法により発色を行なった。核染色は hematoxylin による。

3 成 績

3.1 *In situ* hybridization 法の基礎的検討

pHAF 7 をプローブとして用い, まず培養細胞を対象として *in situ* hybridization 法の基礎的検討を行なった。

Fig. 1-a 及び 1-b に HuH-7 細胞と Chang 細胞における *in situ* hybridization の結果を示す。AFP 産生性ヒト肝癌細胞株である HuH-7 細胞では細胞質内に陽性シグナルを顆粒状ないしその集積として認めた。AFP 非産生性細胞株である Chang 細胞及び MKN45 細胞において, ISH 法は陰性であった。

さらに HuH-7 細胞を用いて, RNase の前処理による影響を検索したが, Fig. 1-c に示すようにシグナルは消失した。次に, 図には示さないが, あらかじめ未標識の pHAF7 をハイブリダイスさせたところ, RNase 処理と同様にビオチン化 pHAF7 のハイブリダイゼーションは阻止され, シグナルは検出されなかった。

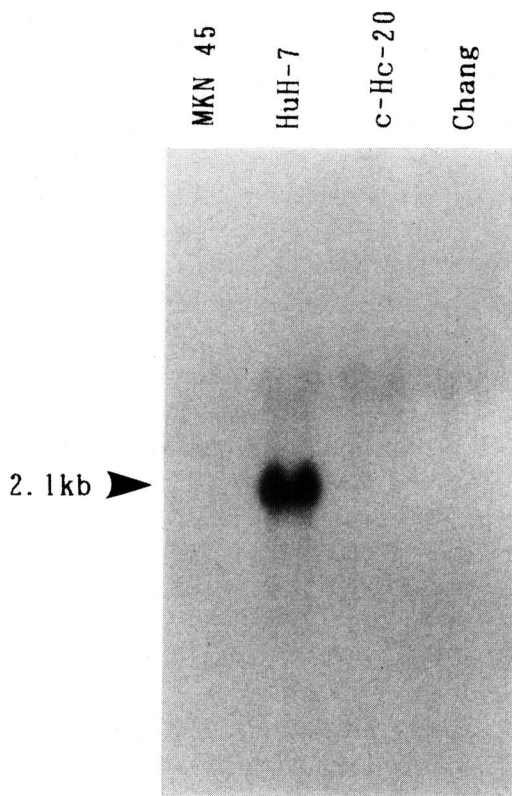


Fig. 2 Northern blot analysis of total RNA from human cultured cell lines, HuH-7, c-Hc-20, Chang and MKN45 with AFP probe, pHAF7.

3・2 Northern blot 法による基礎的検討

Northern blot 法によるヒト培養細胞における AFP mRNA 発現の結果を Fig. 2 に示す。AFP 産生性 HuH-7 細胞においては、AFP mRNA に相当する 2.1 kb のバンドが検出されたが、AFP 非産生性の Chang, MKN45 及び c-Hc-20 の各細胞では、バンドは検出されなかった。

3・3 肝癌組織における AFP mRNA 及び産物の発現

外科的に切除された肝癌 20 例及び剖検により得られた肝癌 3 例、計 23 例の癌部ならびに非癌部において、AFP mRNA の発現を *in situ* hybridization 法及び Northern blot 法を用いて検索し、合せて免疫組織学的染色を行ない産物としての AFP の局在と比較検討した。ISH 法で陽性であった症例において、図には示さないがプローブ pHAF7 の negative control として pAZ10, pHCG 及び T β を用いた場合、さらには RNase 処理を加えた後に pHAF7 を反応させた場合においてもシグナ

ルは検出されず、ISH 法による陽性シグナルが AFP mRNA に対応することが確認された。

Table 1 に肝癌症例の病理組織学的診断や固定法、血清 AFP 値、HB 関連抗原及び抗体などの諸データに加えて、ISH 法、NB 法及び免疫組織学的染色の成績を示した。また Table 2 に良性肝疾患における成績を示し、これらをまとめて Table 3 に示した。

癌部における ISH 法では、Table 3 にまとめて示したように、肝硬変を伴う肝癌群（以下 HCC with LC 群）では 14 例中 11 例（79%）が陽性所見を呈し、肝硬変を伴わない肝癌群（以下 HCC 群）においては 9 例中 6 例（67%）に陽性シグナルが検出され、両群間に有意差はみられなかった。陽性シグナルのパターンは、HCC with LC 群においては、Fig. 3 に提示した case 5 のように、小葉ないし偽小葉の辺縁に近い少数の細胞に強く発現する例が多く、また管腔を形成している細胞にも陽性シグナルが観察された。一方、HCC 群にお

Table 1 AFP gene expression in hepatocellular carcinoma tissues detected by *in situ* hybridization technique, Northern blot analysis and immunohistology

Case No.	Sex /Age	Pathological diagnosis	Obtained at /Fixation	ISH ^a CA ^d /N-CA ^e	NB ^b CA/N-CA	IHC ^c CA/N-CA	AFP level (ng/ml)	HBs-Ag /-Ab	HBe-Ag /-Ab
1	M/80	HCC with LC ^f	ope ^h / 4%PFA ⁱ	+/- ^k	+/-	+/-	769	-/-	-/-
2	M/69	HCC with LC	ope / 4%PFA	+/-	-/-	-/-	416	-/-	-/-
3	M/53	HCC with LC	ope / 4%PFA	+/+	-/-	-/-	734	-/-	-/-
4	M/68	HCC with LC	ope / 4%PFA	-/-	-/-	-/-	11	-/-	-/-
5	M/59	HCC with LC	ope / 4%PFA	+/+	-/-	+/+	19	-/-	-/-
6	M/61	HCC with LC	ope / 4%PFA	+/-	-/-	-/-	197	-/-	-/-
7	M/57	HCC with LC	ope / 4%PFA	+/+	-/-	+/+	20	-/-	-/-
8	M/53	HCC with LC	ope / 4%PFA	-/-	+/-	-/-	1240	-/-	-/-
9	M/58	HCC with LC	necropsy/ 4%PFA	+/+	-/-	+/+	57	-/-	-/-
10	F/67	HCC with LC	ope / 4%PFA	+/+	-/nd ^l	-/-	50	-/-	-/-
11	M/56	HCC with LC	ope / 4%PFA	+/nd	nd/nd	+/nd	347	-/-	-/-
12	M/47	HCC with LC	necropsy/ 4%PFA	+/nd	nd/nd	-/nd	38400	+/-	-/-
13	M/59	HCC with LC	ope / frozen	+/nd	nd/nd	+/nd	51725	-/-	-/-
14	F/66	HCC with LC	ope / frozen	-/nd	nd/nd	-/nd	9	-/+	-/-
15	F/54	HCC	ope / 4%PFA	+/+	+/-	+/+	1618	-/-	-/-
16	M/39	HCC	ope / 4%PFA	+/-	-/-	+/-	16	+/-	-/-
17	M/39	HCC	ope / 4%PFA	+/+	-/-	-/+	10	+/-	+/-
18	M/56	HCC	ope / 4%PFA	-/+	-/-	-/-	26	+/-	-/-
19	M/64	HCC	ope / 4%PFA	-/-	-/-	-/-	350	-/-	-/-
20	M/41	HCC	ope / 4%PFA	+/-	+/-	-/-	21255	+/-	-/-
21	M/50	HCC	ope / 4%PFA	+/-	-/-	+/-	33	-/-	-/-
22	M/70	HCC	necropsy/95%Ethanol	+/nd	nd/nd	+/nd	1700000	-/-	-/-
23	F/45	HCC	ope / 4%PFA	-/-	nd/-	-/-	334	+/-	-/-

a : *in situ* hybridization b : Northern blot analysis c : immunohistology with anti-AFP monoclonal antibody OA37 d : cancerous region e : non-cancerous region f : hepatocellular carcinoma g : liver cirrhosis h : operation i : paraformaldehyde j : positive k : negative l : not done

Table 2 *AFP gene expression in tissues of various liver diseases detected by in situ hybridization technique and immunohistology*

Case No.	Sex /Age	Pathological diagnosis	Fixation	ISH ^a	IH ^b	AFP level (ng/ml)	HBs-Ag /Ab	HBe-Ag /Ab
24	M/63	LC ^c	4% PFA ^d	— ^e	—	63	—/—	—/—
25	M/51	LC	4% PFA	—	—	< 5	—/—	—/—
26	M/26	LC	4% PFA	—	—	< 5	+/+	+/-
27	F/24	LC	95% Ethanol	+ ^f	—	57	+/-	—/—
28	M/58	LC	4% PFA	—	—	146	—/—	—/—
29	F/53	LC	4% PFA	—	—	249	+/-	—/—
30	M/24	CAH ^g	4% PFA	—	—	49	+/+	+/-
31	M/66	CAH	4% PFA	—	—	60	—/—	—/—
32	M/73	CAH	4% PFA	—	—	113	—/—	—/—
33	F/74	CAH	4% PFA	—	—	57	—/+	—/—
34	M/74	CAH	4% PFA	—	—	6	—/+	—/—
35	F/49	CAH	4% PFA	—	—	5	—/+	—/—
36	F/44	CAH	4% PFA	—	—	57	—/—	—/—
37	M/52	CIH ^h +FL ⁱ	4% PFA	—	—	< 5	—/—	—/—
38	M/55	CAH+FL	4% PFA	—	—	34	—/—	—/—
39	F/18	CPH ^j	4% PFA	—	—	< 5	+/+	+/-
40	F/35	CAH	4% PFA	—	—	6	—/—	—/—
41	F/50	CPH	4% PFA	—	—	nd ^k	—/—	—/—
42	M/27	CAH	4% PFA	—	—	103	+/+	+/-
43	M/15	CPH	4% PFA	+	—	< 5	+/+	+/-
44	F/53	CAH	4% PFA	+	—	12	+/+	+/-
45	F/53	CPH	4% PFA	—	—	< 5	—/—	—/—
46	M/45	CPH	4% PFA	—	—	< 5	+/-	—/+
47	F/56	CPH	4% PFA	+	—	< 5	—/+	—/—
48	M/60	CAH	4% PFA	+	—	43	—/—	—/—
49	M/50	CAH	4% PFA	—	—	9	+/-	—/+
50	M/15	CPH	4% PFA	—	—	< 5	+/+	+/-
51	F/52	CAH	4% PFA	—	—	< 5	—/+	—/—
52	F/63	CAH	4% PFA	—	—	13	—/+	—/—
53	M/67	CAH	4% PFA	—	—	20	+/-	—/—
54	M/59	CAH	4% PFA	—	—	11	—/—	—/—
55	F/22	CAH	4% PFA	—	—	< 5	+/+	+/-
56	F/47	CAH	4% PFA	—	—	< 5	—/+	—/—
57	M/47	CAH	4% PFA	—	—	17	—/+	—/—
58	M/40	CAH	4% PFA	—	—	9	—/—	—/—
59	F/58	CAH	4% PFA	—	—	10	—/—	—/—
60	F/40	PBC ^l	4% PFA	—	—	< 5	—/+	—/—
61	F/47	FL	4% PFA	—	—	< 5	—/—	—/—
62	F/45	FL	4% PFA	—	—	< 5	+/-	+/-
63	F/24	AH ^m	4% PFA	—	—	< 5	—/—	—/—

a: *in situ* hybridization b: immunohistology with anti-AFP monoclonal antibody OA37

c: liver cirrhosis d: paraformaldehyde e: negative f: positive g: chronic active hepatitis

h: chronic inactive hepatitis i: fatty liver j: chronic persistent hepatitis k: not done

l: primary biliary cirrhosis m: acute hepatitis

Table 3 Summary of the results on AFP gene expression shown in Tables 1 and 2

Pathological diagnosis	Cancerous region			Non-cancerous region		
	ISH ^a	NB ^b	IH ^c	ISH	NB	IH
HCC ^d with LC ^e	11/14 ^f (79%) ^g	2/10 (20%)	6/14 (43%)	5/10 (50%)	0/ 9 (0%)	3/10 (30%)
HCC	6/ 9 (67%)	2/ 7 (29%)	4/ 9 (44%)	3/ 8 (38%)	0/ 8 (0%)	2/ 8 (25%)
(total)	17/23 (74%)	4/17 (24%)	10/23 (44%)	8/18 (44%)	0/17 (0%)	5/18 (28%)
LC				1/ 6 (17%)	n. d. ^h	0/ 6 (0%)
CH ⁱ				4/30 (13%)	n. d.	0/30 (0%)
Fatty liver				0/ 2 (0%)	n. d.	0/ 2 (0%)
PBC ^j				0/ 1 (0%)	n. d.	0/ 1 (0%)
AH ^k				0/ 1 (0%)	n. d.	0/ 1 (0%)
(total)				4/40 (10%)		0/40 (0%)

a: *in situ* hybridization b: Northern blot analysis c: immunohistology with anti-AFP monoclonal antibody OA37 d: hepatocellular carcinoma e: liver cirrhosis f: No. positive/No. tested

g: % positive h: not done i: chronic hepatitis j: primary biliary cirrhosis k: acute hepatitis

いてはHCC with LC群におけるよりも弱い顆粒状のシグナルを多数の細胞に認めることが多く、強い集積は観察されなかった。HCC群より代表例としてcase 15をFig. 4に示した。血清AFP値との比較では、400 ng/ml以上の例では殆どがISH法陽性となった。陰性となったcase 8及びcase 19は固定までに30分以上経過した例であり、case 23は壊死の顕著な組織像を呈した例であった。また、血清AFP値が20 ng/ml以下でもシグナルが検出される例があり、両群あわせて6例中4例に認められた。

非癌部におけるISH法の結果は、Table 3にまとめたように、HCC with LC群では10例中5例(50%)に、HCC群においては8例中3例(38%)に陽性であり、合計18例中8例(44%)に陽性を示した。非癌部における陽性シグナルのパターンは、HCC with LC群では顆粒状の弱い陽性シグナルが少数の細胞にみられ、その分布は、hematoxylin-eosin染色による細胞形態や病理組織学的所見上、一定の傾向を見出し得ていないが、Fig. 5に示したcase 10のようにグリソン鞘に接する部位にある比較的小型の細胞や、管腔を形成する細胞に強い発現を示す例も認められた。またHCC群の非癌部では顆粒状の弱いシグナルが、成熟肝細胞と形態学的に区別し難い多数の細胞に認められる傾向を示した。

非癌部組織についてISH法の成績と血清AFP値を比較すると、HCC with LC群においては、ISH法で陽性となった5例のうち、4例のAFP値が60 ng/ml以下であった。一方、HCC群における陽性例3例中2

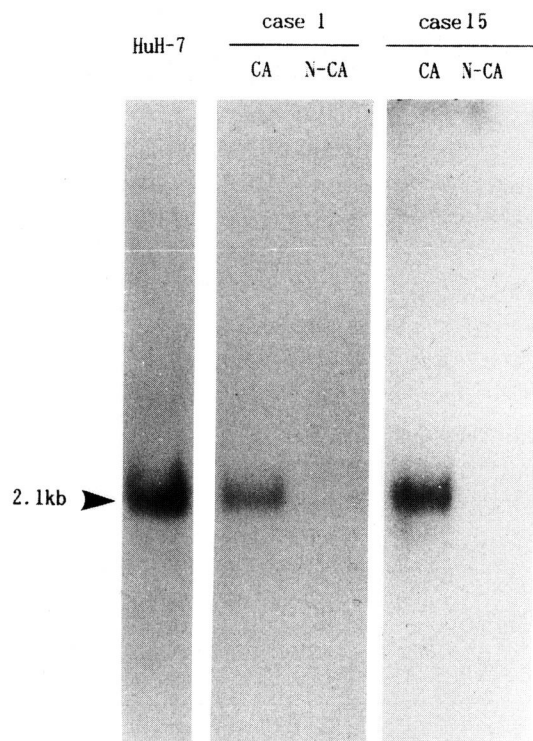


Fig. 6 Northern blot analysis of total RNA from cell line, HuH-7 and hepatocellular carcinoma tissues with AFP probe, pHAF7.

(CA: cancerous region, N-CA: non-cancerous region)

Case 1: Hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis.

Case 15: Hepatocellular carcinoma without liver cirrhosis.

例の AFP 値は各々10 及び 26 ng/ml であった。

抗 AFP モノクローナル抗体 OA37 を用いた免疫組織学的染色では, Table 3 に示すように癌部では 23 例中 10 例(44%)に, 非癌部においては 18 例中 5 例(28%)に, 産物としての AFP を認めた. その局在は AFP mRNA の発現部位と概ね一致し(Fig. 4-c, Fig. 5-c), 偽胆管形成細胞でも観察された.

NB 法による検索では, 癌部では AFP mRNA に相当する 2.1 kb のバンドが HCC with LC 群では 10 例中 2 例(20%)に, また HCC 群では 7 例中 2 例(29%)に検出された. 一方, 非癌部ではバンドは検出されなかった. 代表例を Fig. 6 に示した.

3・4 各種肝疾患における AFP mRNA 及び産物の発現

腹腔鏡下あるいは超音波ガイド下生検によって得られた肝硬変 6 例, 慢性肝炎 30 例, その他 4 例の計 40 例の組織について, 同様に検索を行なった. 成績を Table 2 に示し, そのまとめを Table 3 に示した.

肝硬変では 6 例中 1 例(case 27)に ISH 法が陽性となり, シグナルは再生結節を含めてび慢性に認められ, グリソン鞘近くのやや小型の細胞で強く発現された(Fig. 7-b). また, 抗 AFP モノクローナル抗体による免疫組織染色は陰性であった. 慢性肝炎では ISH 法により 30 例中 4 例に陽性シグナルを認めた. Case 43 ではグリソン鞘近くの細胞に強いシグナルを認めたが(Fig. 8-a), 他の 3 例では Fig. 8-b に示した case 44 のように弱い顆粒状のシグナルを呈した. 免疫組織学的染色では全例陰性であった. 肝硬変, 慢性肝炎ともに ISH 法における成績と血清 AFP 値との間に関連性はみられなかった. その他の肝疾患では ISH 法, 免疫組織学的染色ともに陰性であった.

3・5 PCR 法による AFP mRNA の増幅

まず培養細胞株やヒトリンパ球の RNA を用いて PCR

を行なった. HuH-7 細胞では 0.3 kb のバンドが増幅され, Southern blot 法においてプローブの pHAF7 と特異的に結合した(Fig. 9). 一方, Chang 細胞及び健康成人のリンパ球においては PCR による AFP mRNA

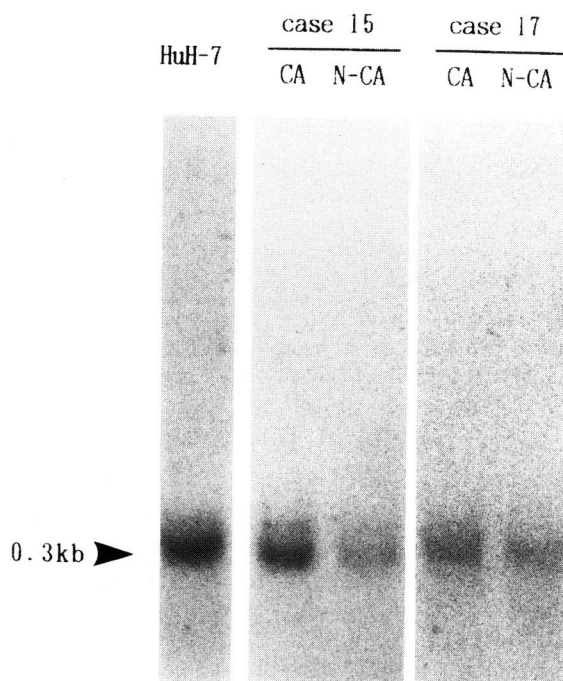


Fig. 9 Southern blot analysis of AFP cDNA amplified by polymerase chain reaction from total RNA of HuH-7 and hepatocellular carcinoma tissues with AFP probe, pHAF7. (CA: cancerous region, N-CA: non-cancerous region)

Case 15: Hepatocellular carcinoma without liver cirrhosis.

Case 17: Hepatocellular carcinoma without liver cirrhosis.

Table 4 Comparison of the sensitivity of various methods to detect AFP mRNA in tissues of hepatocellular carcinoma

Case No.	In situ hybridization			Northern blot analysis			Polymerase chain reaction		
	CA	/	N-CA	CA	/	N-CA	CA	/	N-CA
1	+	/	-	+	/	-	+	/	-
15	+	/	+	+	/	-	+	/	+
17	+	/	+	-	/	-	+	/	+
21	+	/	-	-	/	-	+	/	+

CA : cancerous region

+: positive

N-CA : non-cancerous region

- : negative

の増幅は認められなかった。臨床症例としてISH法で陽性であった肝癌のうち、NB法陽性の2症例及び陰性の2症例、計4例についてPCRを行なった。成績をTable 4及びFig. 9に示す。Case 1では、癌部においてはpHAF7とハイブリダイズする0.3 kbのバンドの増幅が認められたが、非癌部での増幅はみられず、ISH法、NB法の結果と一致した。Case 15の非癌部及びcase 17とcase 21の癌部、非癌部においてはNB法ではAFP mRNAの発現が認められなかったが、PCR法ではAFP mRNAの増幅が認められた。

4 考 察

遺伝子工学の発展によりcDNAの利用が可能となり、腫瘍関連抗原に関する研究においても、遺伝子レベルでの検索が可能となってきた。これまでにわれわれの教室では癌及び前癌病変における遺伝子発現の解析を目的として、大腸癌及び大腸腺腫について、CEA及びNCAのcDNAを用いて、高橋¹⁹⁾がNorthern blot法による研究を行ない、さらに伊藤²⁰⁾は*in situ* hybridization法による検索を行なってきた。本研究ではこれらの研究に引き続いてAFP cDNAを利用して、肝癌、肝硬変及びその他の肝疾患におけるAFP mRNAの発現をISH法、NB法さらにPCR法により検索し、免疫組織学的染色による産物レベルでの発現と比較検討した。これまで血清中のAFP値については、400 ng/mlを基準として、これを越える場合には肝細胞癌の可能性が強く疑われたが、400 ng/ml未満の場合には主として画像、生検等により肝癌の診断が進められている。

本研究においては、特にAFPの発現について肝硬変を伴う、あるいは伴わない肝癌、肝硬変ならびに他の肝疾患組織を用いて、mRNAレベルで詳細な検討を加え、肝癌の診断、特に前癌病変の解析に資し得るかを検索した。このような研究は、最大径が2 cm以下の最小肝癌が続々と診断され、治療されるようになった今日では、特に重要性を増している。ISH法はプローブの標識方法により、放射性プローブを用いる方法と非放射性プローブを用いる方法とに大別される。³H、³²Pあるいは³⁵Sを利用するアイソトープによる標識法は、核種によりオートラジオグラフィーに要する時間や分解能等に関してそれぞれ問題を有し、特殊な設備の必要性などの欠点を有している。一方、これらの欠点を補うべくハプテンなどの標識による非放射性プローブを用いる試みがなされており、ビオチン^{12,21)}、DNP基²²⁾、スルホン基²³⁾、fluorene誘導体²⁴⁾、チミン2量体²⁵⁾などが報告されている。本研究で用いたビオチン標識に

よる方法は、全行程を2日間で終了でき、特殊な施設を必要としないなどの利点を有する。

まず基礎的検討のために、ヒト培養細胞を対象としてISH法を施行した。HuH-7細胞では細胞質中に明瞭にAFP mRNAの陽性シグナルを検出した。さらに、用いたAFP cDNAがAFP mRNAと特異的にハイブリダイズしているかどうかを、HuH-7細胞を対象として以下の方法により検討した。まずRNaseによる前処理を施すとシグナルは検出されず、cDNAプローブがDNAや蛋白分子などと非特異的に結合することなく、RNAとハイブリダイズしていることが示唆された。次に、あらかじめ未標識のプローブをmRNAとハイブリダイズさせることにより、ビオチン化プローブと競合させたところ、ハイブリダイゼーションは阻止され、シグナルは検出されなかった。これらの結果とNB法による成績を合わせ、ISH法においてAFP cDNAは特異的にAFP mRNAを検出していることが示された。

RNAを扱う際、RNAの安定性が常に問題となり、特に臨床材料を用いる場合、固定法や、固定または凍結に至るまでの時間にも注意を要する。種々の固定法があるが、本研究ではmRNAの保存性、検出率及び非特異的反応程度等から総合的に優れているとされる4% paraformaldehyde¹²⁾を可能な限り用い、一部はホルマリンやエタノールを使用した。また最近ではマイクロ波を用いた新しい固定法²⁶⁾も開発されており検討の余地がある。成績には示していないが、ホルマリン固定を用いた場合には、血清AFPが異常高値を示す例ではISH法も陽性となったが、それ以外の例での陽性率は低く、固定によりプローブの組織内への浸透性が低下する可能性も考えられた。エタノール固定は少数例に施行したにすぎないが、血清AFPが低値でも陽性シグナルが検出された。また固定や凍結までに要する時間とAFP mRNAの保存との関連については、林ら²⁷⁾がマウス摘出臓器を用いて検討を行ない、肝臓に関しては摘出後数時間はmRNAが保存されると報告しているが、実際の手術の際には阻血状態となってから長時間経過することもあり、RNAの保存状態を考慮に入れておく必要がある。

近年、わが国において肝癌罹患率の増加が注目されている。肝硬変から肝癌への移行が少なからず観察されること²⁸⁾、肝硬変におけるAFPの上昇は前癌状態にある細胞の存在を示唆していること⁴⁾などの報告にも関連して、ISH法を用いてAFP mRNAの発現を細胞レベルでとらえることができれば、前癌状態の解析や早期診断に役立つ可能性がある。本研究の結果、肝癌症

例組織の癌部及び非癌部の一見成熟肝細胞と区別のつかない細胞に AFP mRNA の発現が認められ、ISH 法による AFP mRNA の陽性頻度は、NB 法に比較して明らかに高いことが判明した。この場合、ISH 法により非特異的な陽性シグナルを検出していないことを、いくつかの基礎的実験で確認したが、さらに ISH 法陽性の数例については、NB 法及び PCR 法により AFP mRNA の存在を追試し、確認した。すなわち、ISH 法により得られた陽性成績は、それぞれの細胞に存在する AFP mRNA のシグナルを感度良く検出している結果と考えられる。興味あることは、血清 AFP 値が高値を示していない数例の肝癌組織に ISH 法により AFP mRNA の発現が認められたことである。肝癌の 1 例 (case 17) をあげると、血清 AFP が 10 ng/ml と低値であるのに、ISH 法では陽性を示し、この AFP mRNA は PCR 法で増幅された。HCC with LC 群のうちで、癌部及び非癌部のグリソン鞘近くの小型細胞に強い陽性シグナルを認める例を経験したが、これらの細胞は Sakamoto *et al.*²⁹⁾ の報告における、AFP を産生する oval cell 様細胞に相当するものかもしれない。また、肝癌以外の症例では ISH 法で AFP mRNA が肝硬変、慢性肝炎のそれぞれ 17% 及び 13% に検出されたことが注目される。肝組織での AFP の ISH 法による検索は、われわれの知る限りではほとんど報告がないが、³H 標識プローブを用いて ISH を検討した Otsuru *et al.*³⁰⁾ の報告では、肝硬変においては 2 例中 1 例に少数の強い陽性シグナルを呈する細胞が観察されたとしている。本研究において陽性となった例では、び慢性に陽性シグナルを認め、グリソン鞘近くのやや小型の細胞に強いシグナルを認めた。以上のような肝癌以外の症例における AFP mRNA の発現意義は、現在のところ不明であるが、今後、肝癌の前癌病変に関連する遺伝子やその産物の発現異常、あるいは最近注目を集めている癌抑制遺伝子の異常等の成績と比較して、AFP mRNA の前癌病変における意義をさらに明らかにする必要がある。

5 要 約

ヒトの肝癌、肝硬変及びその他の肝疾患における AFP mRNA の発現の差異を組織レベルで検索するために、ピオチン化 AFP cDNA を用いて *in situ* hybridization を行なった。これらの成績を抗 AFP モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色及び Northern blot (NB) 法と比較した。さらに一部の症例においては、polymerase chain reaction (PCR) 法

により AFP 遺伝子の発現動態を検索した。その結果、以下の成績を得た。

1. ISH 法において、AFP cDNA を用いた場合、AFP 産生性株である HuH-7 細胞では陽性シグナルを認めたが、AFP 非産生性細胞株では陰性であった。さらに RNase による前処理の実験、ならびに NB 法により 2.1 kb の AFP mRNA 相当部分にバンドを認めたことなどより、本研究における ISH 法により、AFP mRNA を特異的に検出し得ることが判明した。

2. 肝癌組織の癌部において、74% に ISH 法による陽性シグナルを認め、肝硬変を伴わないもの (HCC 群) と伴うもの (HCC with LC 群) の間に差はみられなかった。これらの合計の陽性頻度 (74%) は NB 法によるそれ (24%) に比較して有意に高かった。血清 AFP 値が 20 ng/ml 以下でもシグナルの検出される例があり両群あわせて 6 例中 4 例に認められた。免疫組織学的染色による AFP 産物は 44% に認められ、その局在は ISH 法によるものとほぼ一致した。

3. 肝癌症例の非癌部においては、NB 法で全例陰性であるのに対し、ISH 法では 44% に陽性を示し、免疫組織学的染色では 28% に陽性となった。

4. 肝硬変及び慢性肝炎等の肝疾患例について同様の検討を行った。肝硬変では 6 例中 1 例に、また、慢性肝炎の 30 例中 4 例に ISH 法による陽性シグナルを認めた。いずれの場合にも抗 AFP モノクローナル抗体による免疫組織学的染色は陰性であった。

5. ISH 法で陽性を示し、NB 法で陰性であった症例について PCR 法を施行し、ISH 法で検出されたシグナルが AFP mRNA であることを確認し得た。

6. 以上より ISH 法は組織における AFP mRNA の発現を検索するのに有用であり、肝癌のみならず、肝硬変等の前癌病態におけるその発現の解析に利用しうることが示唆された。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた本学内科学第 1 講座谷内昭教授、御教示いただいた坂本真一講師ならびに菅充生講師に感謝いたします。また病理組織観察の御指導をいただいた本学病理学第 2 講座森道夫教授はじめ諸先生に感謝いたします。さらに、cDNA プローブを供与下さった玉置大器教授 (カナダ・カルガリー大学生化学)、組織標本を御提供下さった北海道大学第 1 外科内野純一教授ならびに宇根良衛講師、国立療養所松戸病院島村善行博士ならびに国立精神・神経センター国府台病院高橋陽博士に謝意を表します。細胞株及び

cDNA プローブを供与いただいたがん研究振興財団遺伝子バンクに御礼を申し上げます。最後に、細胞株を供与下さった慈恵医大医化学教室大川清講師に謝意を表します。

本研究は文部省科学研究費補助金がん特別研究 I (02151056 谷内) 及び重点領域研究 (02262231 今井), ならびに厚生省対癌 10ヶ年総合戦略(松山班, 谷内) 及びがん研究助成金(大倉班, 今井)の補助によった。

文 献

- Morinaga, T., Sakai, M., Wegmann, T. G. and Tamaoki, T.: Alphafetoprotein messenger RNA in human embryonal carcinoma grown in nude mice, and cloning of its complementary DNA. **Oncogene. Biol. Med.** 3, 301-313 (1982).
- Morinaga, T., Sakai, M., Wegmann, T. G. and Tamaoki, T.: Primary structures of human α -fetoprotein and its mRNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80, 4604-4608 (1983).
- Ruoslahti, E. and Seppälä, M.: α -fetoprotein in cancer and fetal development. **Adv. Cancer Res.** 29, 275-346 (1979).
- Furukawa, R., Tajima, H., Nakata, K., Kono, K., Muro, T., Sato, A., Kawahara, K., Ishii, N., Kusumoto, Y., Munehisa, T., Koji, T. and Nagataki, S.: Clinical significance of serum alpha-fetoprotein in patients with liver cirrhosis. **Tumor Biol.** 5, 327-338 (1984).
- Brahic, M. and Haase, A. T.: Detection of viral sequences of low reiteration frequency by *in situ* hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75, 6125-6129 (1978).
- Higashide, T., Hinoda, Y., Itoh, J., Takahashi, H., Satoh, Y., Ibayashi, Y., Imai, K. and Yachi, A.: Detection of mRNAs of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting antigen genes in colorectal adenomas and carcinomas by *in situ* hybridization. **Jpn. J. Cancer Res.** 81, 1149-1154 (1990).
- Yachi, A. and Imai, K.: Monoclonal antibody and cDNA probe for the analysis of carcinomas in gastroenterology. **J. Gastroenterol. and Hepatology**, in press (1991).
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230, 1350-1354 (1985).
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239, 487-491 (1988).
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Yamane, T., Miyazaki, M., Miyano, K. and Sato, J.: Phenotypical stability of a human hepatoma cell line, HuH-7, in long-term culture with chemically defined medium. **Gann** 75, 151-158 (1984).
- Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.** 132, 6-13 (1983).
- Singer, R. H., Lawrence, J. B. and Villnave, C.: Optimization of *in situ* hybridization using isotopic and non-isotopic detection methods. **BioTechniques** 4, 230-250 (1986).
- Jensen, H., Lyngbye, J. and Davidsen, S.: Histochemical investigation of the thermostable alkaline phosphatase in the normal full-term placenta. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.** 47, 436-442 (1968).
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** 18, 5294-5299 (1979).
- Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P.: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. **J. Mol. Biol.** 113, 237-251 (1977).
- Goldberg, D. A.: Isolation and partial characterization of *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 77, 5794-5798 (1980).
- Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.** 98, 503-517 (1975).
- 遠藤高夫, 今井浩三: ヒト肺腺癌細胞に対するモノクローナル抗体の作製と癌患者血清中抗原の検出. **札幌医誌** 54, 393-410 (1985).
- 高橋裕樹: 大腸癌及び大腸腺腫における carcinoembryonic antigen 及び nonspecific cross-reacting antigen の遺伝子発現. **札幌医誌** 58, 87-98 (1989).
- 伊藤 淳: *In situ* hybridization 法による CEA 及び NCA mRNA の検出. **札幌医誌** 59, 129-141 (1990).
- Langer, P. R., Waldrop, A. A. and Ward, D. C.: Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides.

- cleotides: novel nucleic acid affinity probes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**, 6633-6637 (1981).
22. Shroyer, K. R. and Nakane, P. K.: Use of DNP-labeled cDNA for *in situ* hybridization. **J. Cell Biol.** **97**, 377a (1983).
23. Poverenny, A. M., Podgorodnichenko, V. K., Bryksina, L. E., Monastyrskaya, G. S. and Sverdlov, E. D.: Immunochemical identification of the product of cytosine modification with bisulphite and o-methylhydroxylamine mixture. **Mol. Immunol.** **16**, 313-316 (1979).
24. Tchen, P., Fuchs, R. P. P., Sage, E., and Leng, M.: Chemically modified nucleic acids as immunodetectable probes in hybridization experiments. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **81**, 3466-3470 (1984).
25. Nakane, P. K., Moriuchi, T., Koji, T., Tanno, M. and Abe, K.: *In situ* localization of mRNA using thymine-thymine dimerized cDNA. **Acta. Histochem. Cytochem.** **20**, 229-243 (1987).
26. Coates, P. J., Hall, P. A., Butler, M. G. and D'Ardenne, A. J.: Rapid technique of DNA-DNA *in situ* hybridization on formalin fixed tissue sections using microwave irradiation. **J. Clin. Pathol.** **40**, 865-869 (1987).
27. 林 同輔, 堀見忠司, 岡林孝弘, 田中 出, 三宅規之, 平川恵一, 八木孝仁, 折田薫三: *In situ* hybridization 法における組織内 mRNA の試料採取後固定までの時間的変化に関する研究. **医学のあゆみ** **151**, 623-624 (1989).
28. Okuda, K. and The Liver Cancer Study Group of Japan: Primary liver cancers in Japan. **Cancer** **45**, 2663-2669 (1980).
29. Sakamoto, S., Yachi, A., Anzai, T. and Wada, T.: AFP-producing cells in hepatitis and liver cirrhosis. **Ann. NY Acad. Sci.** **259**, 253-258 (1975).
30. Otsuru, A., Nagataki, S., Koji, T. and Tamaoki, T.: Analysis of alpha-fetoprotein gene expression in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis by *in situ* hybridization. **Cancer** **62**, 1105-1112 (1988).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第1講座 伊林由美子

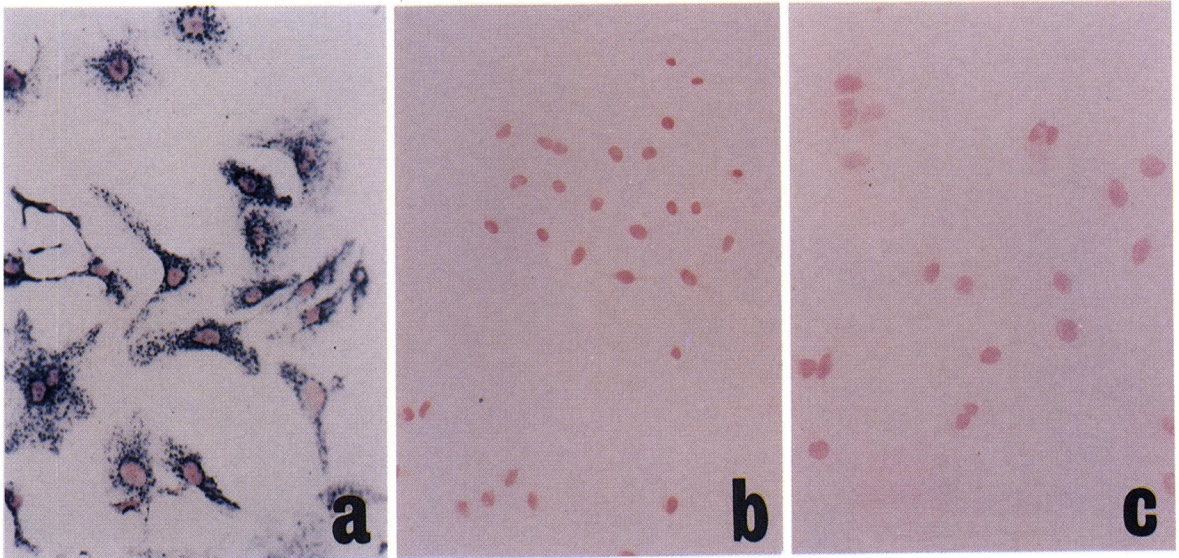


Fig. 1 *In situ* hybridization of human cultured cell lines with biotinylated pHAF7.

- a: Hepatocellular carcinoma cell line, HuH-7. ($\times 170$)
- b: Hepatocyte cell line, Chang. ($\times 170$)
- c: Pretreatment of HuH-7 cells with RNase A. ($\times 170$)

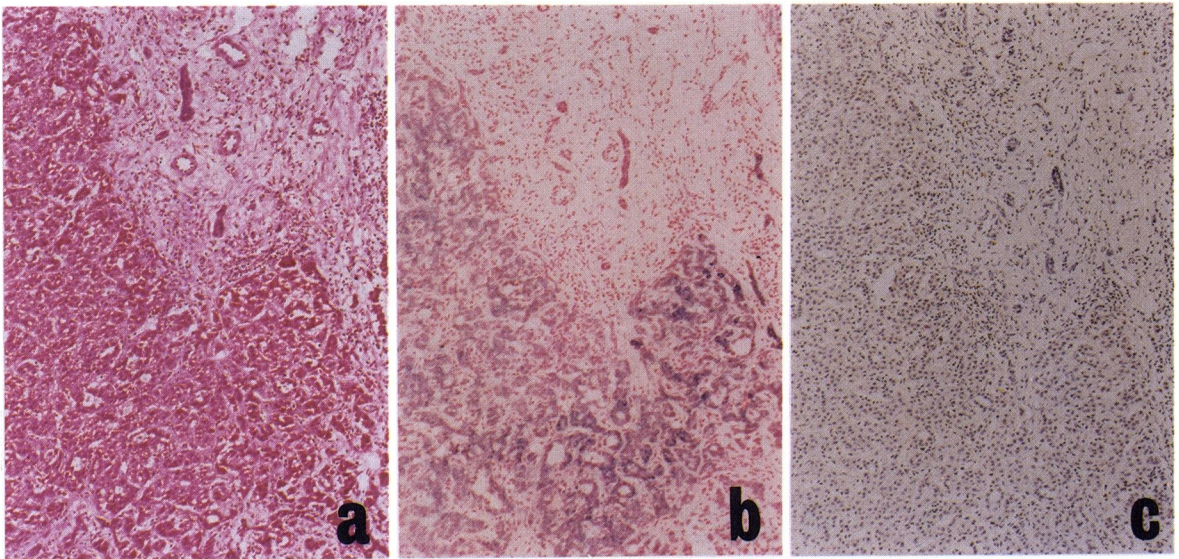


Fig. 3 AFP gene expression in cancerous region of hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis (case 5).

- a: Hematoxylin-eosin staining. ($\times 85$)
- b: *In situ* hybridization with AFP probe, pHAF7. ($\times 85$)
- c: Immunohistology with anti-AFP monoclonal antibody OA37. ($\times 85$)

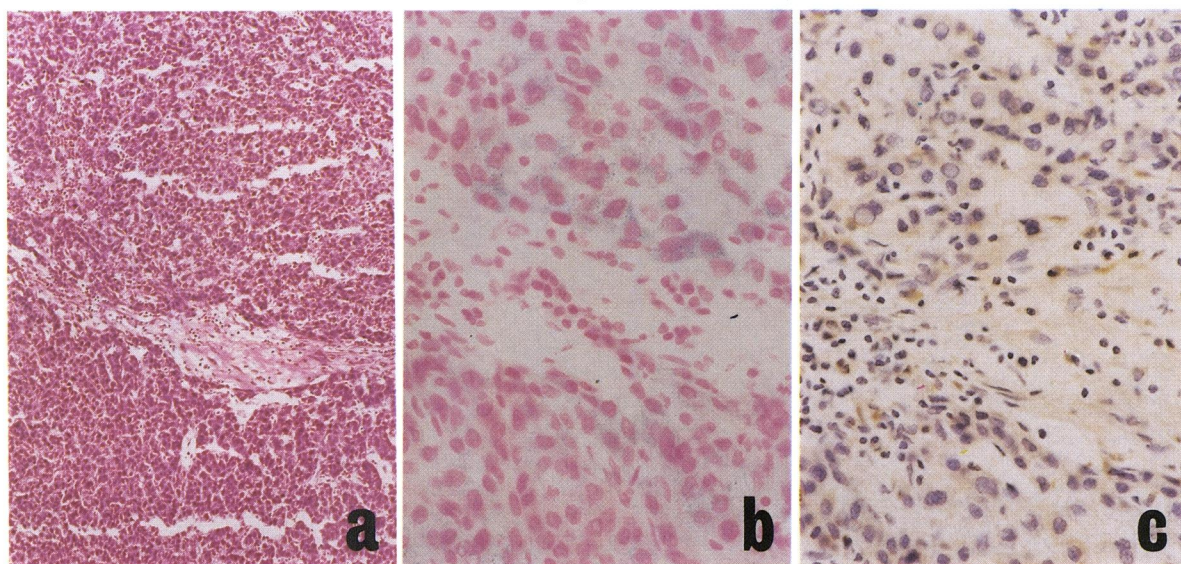


Fig. 4 AFP gene expression in cancerous region of hepatocellular carcinoma without liver cirrhosis (case 15).
a: Hematoxylin-eosin staining. ($\times 85$)
b: *In situ* hybridization with AFP probe, pHAF7. ($\times 340$)
c: Immunohistology with anti-AFP monoclonal antibody OA37. ($\times 340$)

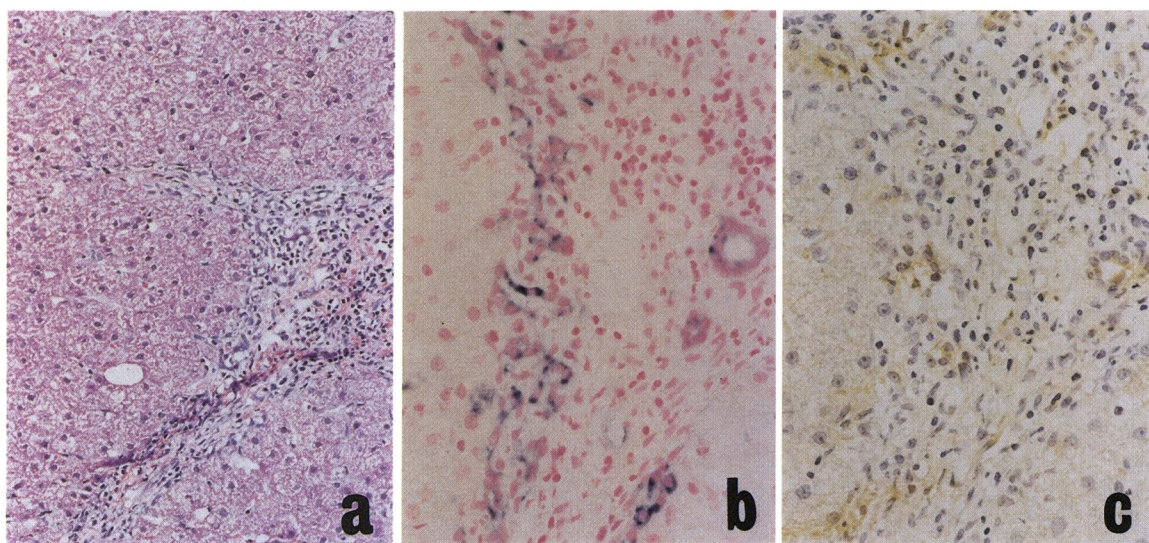


Fig. 5 AFP gene expression in non-cancerous region of hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis (case 10).
a: Hematoxylin-eosin staining. ($\times 170$)
b: *In situ* hybridization with AFP probe, pHAF7. ($\times 340$)
c: Immunohistology with anti-AFP monoclonal antibody OA37. ($\times 340$)

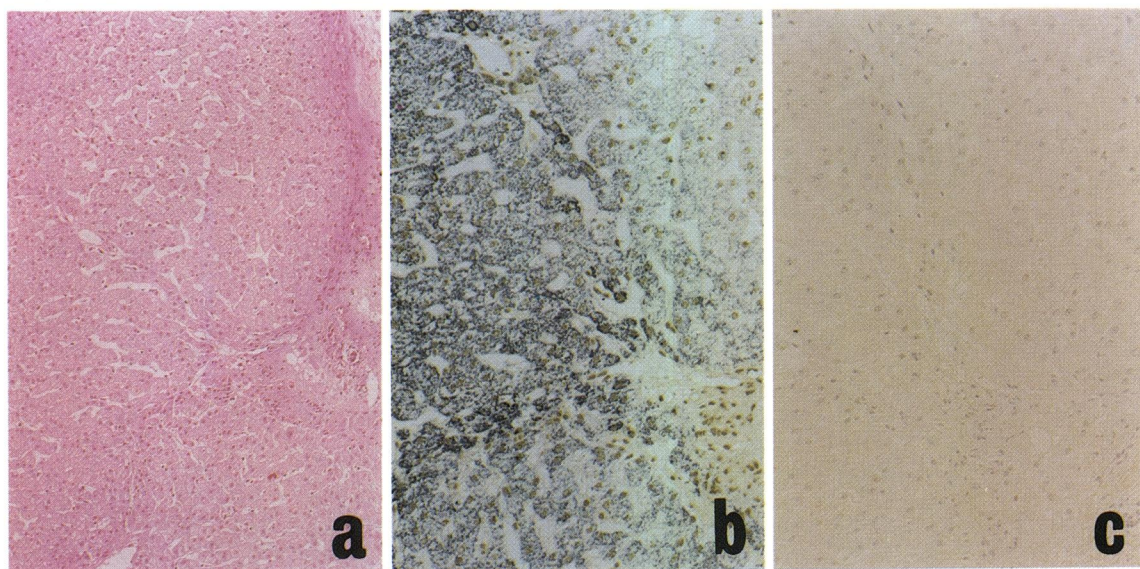


Fig. 7 AFP gene expression in liver cirrhosis (case 27).

a: Hematoxylin-eosin staining. ($\times 85$)

b: *In situ* hybridization with AFP probe, pHAF7. ($\times 170$)

c: Immunohistochemistry with anti-AFP monoclonal antibody OA37. ($\times 170$)

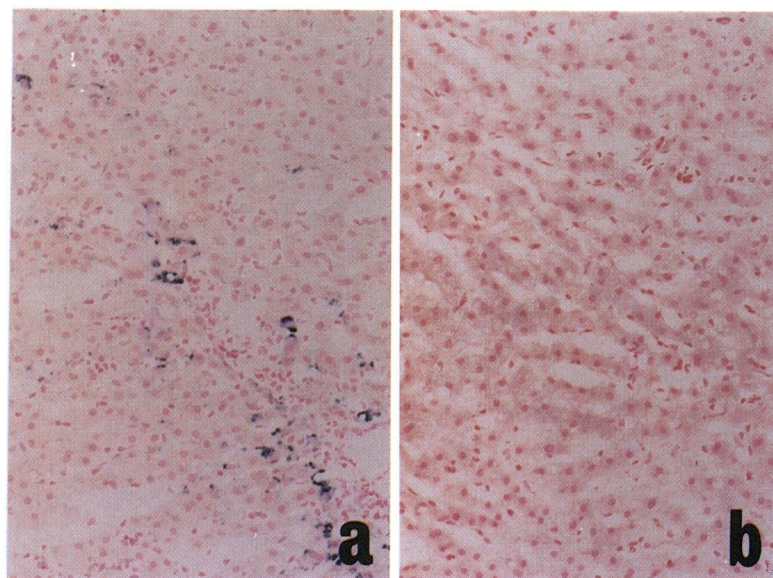


Fig. 8

Fig. 8 AFP gene expression in chronic hepatitis detected by *in situ* hybridization.

a: Case 43 ($\times 170$)

b: Case 44 ($\times 170$)