

Biliary Glycoprotein I (BGP I) の発現

— 肝細胞癌を中心に —

高 井 康 博 日野田 裕 治 今 井 浩 三

札幌医科大学医学部内科学第1講座 (主任 谷内 昭 教授)

Expression of Biliary Glycoprotein I (BGP I) in Hepatocellular Carcinomas

Yasuhiro TAKAI, Yuji HINODA, Kohzoh IMAI

Department of Internal Medicine (Section I), School of Medicine, Sapporo Medical University

(Chief: Prof. A. YACHI)

ABSTRACT Molecular biological and immunohistochemical analyses of the expression of biliary glycoprotein I (BGP I) were performed in hepatocellular carcinomas.

The following results were obtained:

1. BGP I mRNA was expressed in a variety of epithelial tumor cell lines.
2. There was no significant difference between cancerous and non-cancerous colon tissues in the expression of BGP I mRNA, which was distinct from that of NCA mRNA.
3. BGP I mRNA was revealed in hepatocytes and hepatocellular carcinomas by Northern blot and *in situ* hybridization analyses.
4. An immunohistochemical study was carried out using anti-CEA peptide MoAb P1-255 which had been shown to be crossreactive with BGP I, since CEA and NCA mRNAs were not detected in the liver. The cytoplasm and bile canaliculi were positive for P1-255 in non-cancerous tissues.
5. In hepatocellular carcinomas the expression of BGP I tended to decrease with the level of differentiation.

In conclusion, it was revealed at the levels of mRNA and protein that BGP I is expressed in the hepatocytes and hepatocellular carcinomas.

(Received February 12, 1993 and accepted February 22, 1993)

Key words: BGP I, NCA, CEA, Hepatocellular carcinoma

1 緒 言

Biliary glycoprotein I (BGP I) は1976年 Svenberg¹⁾によって胆汁中に carcinoembryonic antigen (CEA) と免疫学的に交差反応を示す約 85 kDa の糖蛋白として見出された。CEA と交差反応を示す CEA 関

連抗原が多数存在するため BGP I の詳細な解析は困難であった。しかし、1987年本邦の及川²⁾らによって CEA の cDNA クローニングが行なわれ、これを契機として BGP I³⁾, non-specific crossreacting antigen (NCA)⁴⁾, をはじめとする CEA 関連抗原の一次構造が次々に明らかとなった。その結果、それぞれの塩基配

Abbreviations

BGP I : biliary glycoprotein I

CEA : carcinoembryonic antigen

NCA : non-specific crossreacting antigen

cDNA : complementary DNA

mRNA : messenger RNA

SDS : sodium dodecylsulfate

MoAb : monoclonal antibody

PBS : phosphate buffered saline

列の互いに異なる領域をプローブとして、mRNA のレベルで CEA 関連抗原分子の発現を明確に識別することが可能となり、CEA や NCA の発現について多数の知見が得られてきた⁵⁻⁷⁾。

一方、肝細胞癌において CEA あるいは CEA 類似抗原の発現することが報告されてきたが^{8,9)}、これらの結果は抗 CEA ポリクローナル抗体を用いたものであり、分子レベルでの検討はなされていない。BGP I は胆汁中に含まれており、胆管上皮細胞あるいは肝細胞において産生される可能性が高い。また肝細胞癌における発現については抗血清の特異性の問題があり確定的な知見の報告がない。本研究においては、肝細胞および肝細胞癌を中心に BGP I が発現しているか否かを明らかにするために、mRNA および蛋白のレベルでの検討を行なった。

2 方 法

2.1 ノーザンブロット法

2.1.1 培養細胞株および癌組織からの total RNA の抽出

培養細胞株として、大腸癌 BM 314, WiDr, Colo 201, DLD-1, Colo 320DM, H716, 胃癌 MKN45, 肺癌 A549, Calu3, A 427, 膵癌 Panc1, PK1, 肝細胞癌 HepG2, HuH-7, 肝由来細胞 Chang, 乳癌 MCF7, マウス線維芽細胞 NIH3T3, H-ras でトランスフォームされた NIH3T3, EJ-NIH3T3 を用いた。癌組織としては外科的に切除されインフォームドコンセントの得られた肝細胞癌 6 例、転移性肝癌 1 例、大腸癌 3 例の各組織片を採取後 30 分以内に -80℃ に凍結保存し、Davis *et al.*¹⁰⁾ に従い guanidine isothiocyanate 法を用いて total RNA を抽出した。

2.1.2 ノーザンブロット法

高橋ら⁶⁾ に従い行なった。すなわち、10 µg の total RNA を変性条件下に電気泳動した後、20×SSC バッファー (1×SSC, 0.15 M NaCl/0.015 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0) を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell, NH) に転写した。ブリハイブリダイゼーションの後、random priming 法¹¹⁾ にて ³²P ラベルした 396 塩基対より成る BGP I cDNA 3' 非翻訳領域の Pst I/EcoR I 断片をプローブとして、一晚ハイブリダイゼーションを行なった。この後、ニトロセルロース膜を 2×SSC/0.1% SDS で洗浄し、さらに 0.1×SSC/0.1% SDS で 55℃ 10 分間洗浄し -80℃ で X 線フィルム (Kodak, USA) に露出した。

2.2 In situ hybridization 法

2.2.1 組織切片の作製

2.1 の癌組織の一部を採取後直ちに 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 染色および *in situ* hybridization 法に用いた。

2.2.2 In situ hybridization 法

伊林ら¹²⁾ に従い行なった。すなわち、脱パラフィン後の切片を PBS で 10 分間洗浄した後、proteinase K (Boehringer, Germany) 1 µg/ml, 37℃, 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 で洗浄した。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×SSC) で 70℃, 10 分間処理後、ビオチン化 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にプローブ (最終濃度 0.25 µg/ml) を加え、前処理した切片と 37℃, 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×SSC (室温, 30 分), 50% formamide, 1×SSC (室温, 30 分) で洗浄の後、3% BSA 中で 37℃, 30 分間処理した。次にストレプトアビジン (Boehringer, Germany) を 1 µg/ml, 室温, 1 時間の条件で反応させ、さらにビ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。なお、プローブは 2.1 で用いた cDNA 断片を用いた。

2.3 BGP I 粗抗原の作製

Svenberg *et al.*¹⁾ に従い、総胆管結石症の胆管ドレナージ液を採取し、1 M 過塩素酸を 1:1 に加えて沈降させた。その後過塩素酸可溶分画を得、これを AMICON (DIV. W. R. GRACE & CO., MA) にて 100 倍濃縮し BGP I 粗抗原として用いた。

2.4 SDS-PAGE およびウエスタンブロット法

2.2 で得られた BGP I 粗抗原をサンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8/10% グリセロール/0.0025% ブロムフェノールブルー) に溶解させた。そ

れを用いて、4-12% gradient gel(岩城硝子株式会社)で sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) を行ない、Hinoda *et al.*¹³⁾ の方法に従ってニトロセルロース膜へ転写した。その後、酵素抗体間接法により、抗 CEA ペプチド MoAb P1-255¹⁴⁾、抗 NCA MoAb F106-88¹⁵⁾、ポリクローナル抗 CEA 抗体 (DAKO 社) との反応性を検討した。

2.5 免疫組織染色

Yachi *et al.*¹⁶⁾ に従い MoAb P1-255 を一次抗体に

用い、間接ペルオキシダーゼ法を行った。組織切片は等張ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用いた。

3 成績

3.1 培養細胞株における BGP I mRNA の発現

まず、BGP I の組織分布を検討する目的で種々の組織由来の腫瘍細胞株における BGP I mRNA の発現を検討した。その結果、Fig. 1 A, B に示すごとく胃、大

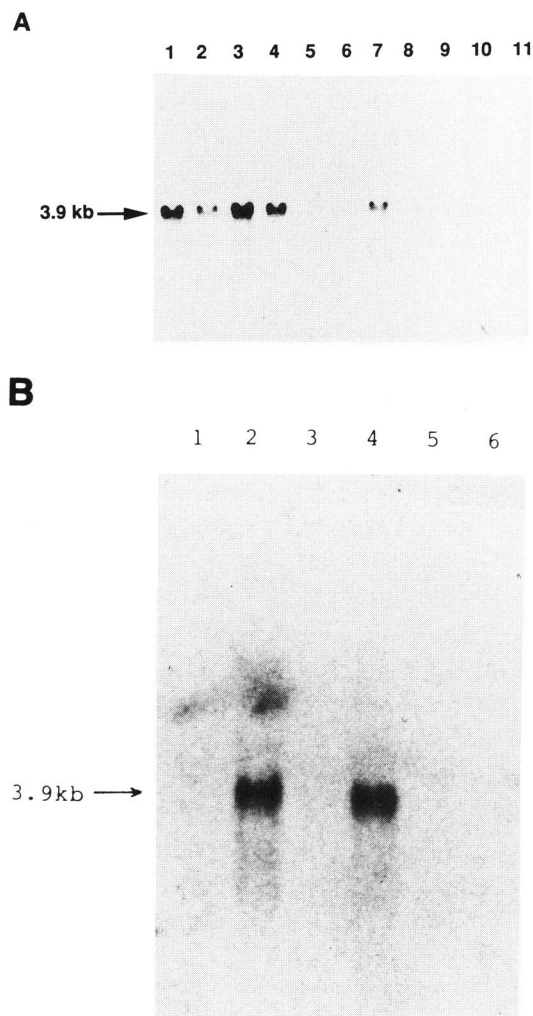


Fig. 1 Detection of BGP I mRNA in various cancer cell lines by Northern blot analysis. A single 3.9 kb message was detected in MKN45, BM314, WiDr, Colo201, PK1, HepG2 and Calu3. Lane (A): 1, MKN45; 2, BM314; 3, WiDr; 4, Colo201; 5, DLD-1; 6, Colo320DM; 7, PK-1; 8, Panc-1; 9, A549; 10, Chang; 11, EJ3T3. Lane (B): 1, NIH3T3; 2, HepG2; 3, H716; 4, Calu3; 5, A427; 6, MCF7.

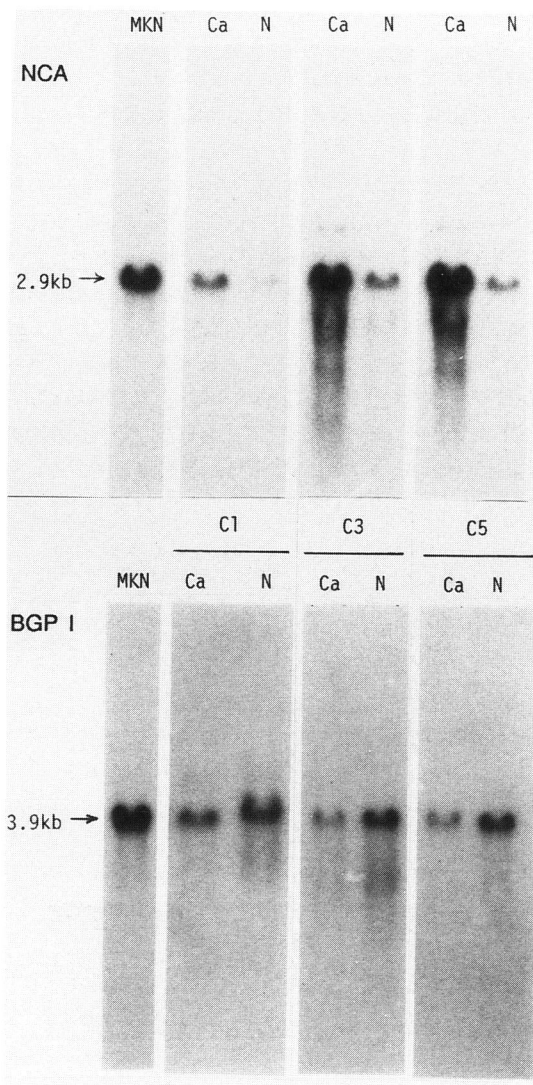


Fig. 2 Detection of NCA and BGP I mRNAs in colon cancer tissues. A single 3.9 kb message for BGP I and a 2.9 kb for NCA were detected in all the tissue samples tested. C1, C3 and C5 indicate colon carcinoma cases. Ca and N indicate cancerous and non-cancerous regions, respectively. MKN is a stomach cancer cell line, MKN45.

腸, 脾, 肝および肺癌由来の細胞株において, 3.9 kb の位置に単一のパンドを認め, BGP I が肝を含め広い組織分布を示すことが示唆された。

3.2 大腸癌組織における BGP I mRNA の発現

大腸癌において NCA mRNA の発現レベルが非癌部に比較して癌部で上昇することがすでに明らかにされている^{6,7)}ので, BGP I mRNA の発現を NCA mRNA と比較検討した。Fig. 2 に示すように大腸癌 3 例およびその非癌部組織において, NCA mRNA は癌部で発現レベルの明らかな上昇を示すのに対し, BGP I mRNA ではそのような傾向は認められなかった。

3.3 肝組織における BGP I mRNA の発現

次に肝組織および肝細胞癌における BGP I mRNA の発現を検討した。その結果, 手術で摘出された肝細胞癌とその非癌部組織において, 明らかな BGP I mRNA の発現を認めた(Fig. 3)。症例 2 から 6 において, 癌部と非癌部での発現レベルを比較したところ症例 4, 5 において癌部で低下傾向を認めたが, 他の例は明らかな変化を示さなかった。肝細胞癌由来細胞株 HuH-7 ではさらに 1.9 kb のパンドを認め BGP I mRNA の isoform の 1 つと考えられた。これらの結果は肝細胞において BGP I mRNA が発現していることを示唆するが, 他の CEA サブグループのメンバーであ

る CEA と NCA の発現の有無をさらに検討した。転移性肝癌(大腸癌)の 1 例においては, CEA および NCA の mRNA が見い出されたが, 非癌部肝組織 3 例および肝細胞癌 3 例には両者は全く検出されなかった。従って肝細胞においては, CEA サブグループのうち主として BGP I が発現すると考えられた。

3.4 *In situ* hybridization による検討

肝組織における BGP I mRNA の発現を *in situ* hybridization 法により検討した。Fig. 4 に代表例を示すが, 非癌部 (A), 癌部 (B) とともにシグナルが細胞質に検出された。しかし, プローブの陰性対照として human chorionic gonadotropin cDNA を用いた場合や, さらに, RNase 処理を加えた後に BGP I cDNA を反応させた場合においてもシグナルは検出されなかった。

3.5 MoAb P1-255 による BGP I の検出

MoAb P1-255 の BGP I との反応性を確める目的で, 胆汁より分離した BGP I 粗抗原をウエスタンブロット法を用いて検討した。その結果, Fig. 5 に示すように, P1-255 によって 110 kDa と 85 kDa の位置にパンドが検出され, 本抗体が BGP I を認識することが明らかとなった。さらに抗 CEA ポリクローナル抗体でも P1-255 と同様に 2 本のパンドが検出されたが, 抗 NCA MoAb F 106-88 は反応を示さなかった。

3.6 MoAb P1-255 による免疫組織学的検討

肝細胞癌における BGP I 発現の意義を検討する目的で, 15 例の肝細胞癌組織と 5 例の非癌肝組織(肝硬変, 脂肪変性を認めない例)について MoAb P1-255 による免疫組織染色を行なった。肝細胞癌については染色強度と Edmondson 分類との関連を観察した。Table 1 に示すごとく, 非癌肝組織の染色強度が最も強く, Edmondson 分類¹⁷⁾ 上分化度が低下するに従い反応性の低下傾向が認められた。代表的な染色像を Fig. 6 に示す。非癌部肝組織では肝細胞の細胞質に顆粒状陽性反応物がみられ, また毛細胆管が線状に染色された(Fig. 6A)。癌組織では, Edmondson II 型の例 (Fig. 6B) において一部細胞質内にも陽性反応を認めるが, 偽胆管を形成する部位やその内腔に陽性反応の多い傾向がみられた。また, Edmondson IV 型の 1 例では全く陰性であった。(Fig. 6C)。

4 考 察

BGP I に特異的と考えられる 3' 非翻訳領域の一部をプローブとして mRNA レベルでその発現を検討した。はじめにいくつかの細胞株について観察したが, 肝癌

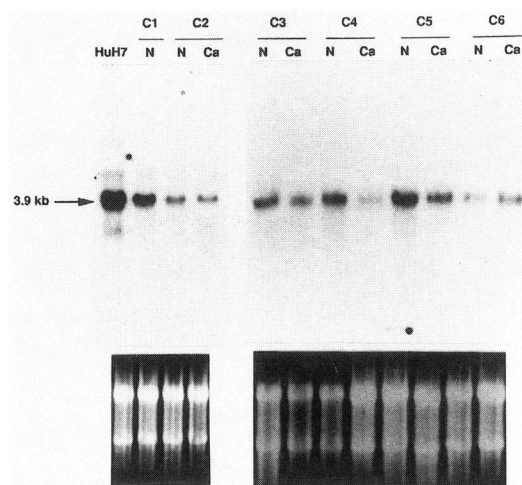


Fig. 3 Detection of BGP I mRNA in hepatocellular carcinoma tissues. A single 3.9 kb message for BGP I was detected in HuH7 and all the tissue samples tested. C1 to C6 indicate hepatocellular carcinoma cases. N and Ca indicate non-cancerous and cancerous regions, respectively. Ethidium bromide staining of electrophoresed RNAs was shown at the bottom of the figure.

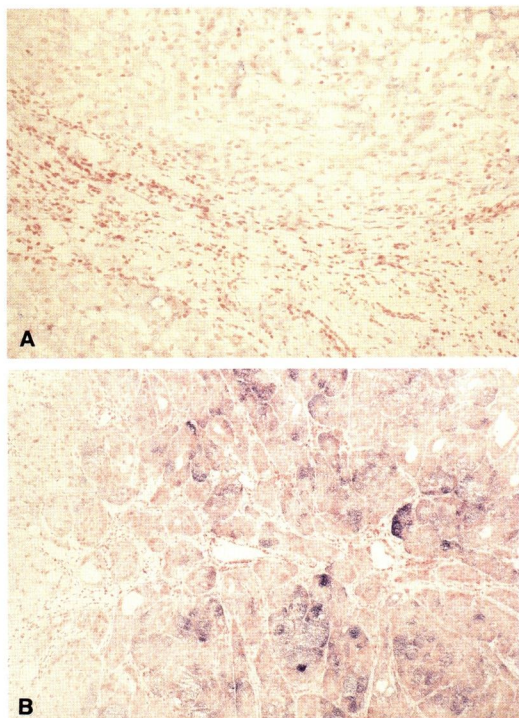


Fig. 4 Detection of BGP I mRNA in non-cancerous (A) (170 \times) and cancerous (B) (170 \times) regions of a hepatocellular carcinoma tissue by *in situ* hybridization technique. A fine granular staining pattern was obtained in both non-cancerous and cancerous regions.

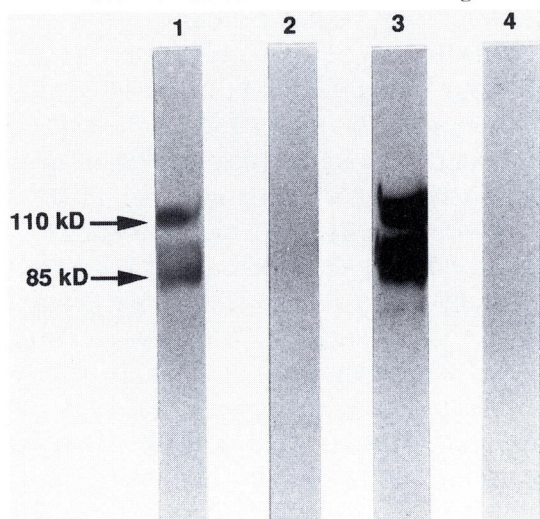


Fig. 5 Western blot analysis of the perchloric acid extract from a bile. Lane: 1, MoAb P1-255; 2, MoAb F-106-88; 3, anti-CEA polyclonal antibody; 4, rabbit whole serum. The bands at the regions of 85 and 110 kDas were detected by either MoAb P1-255 or anti-CEA polyclonal antibody.

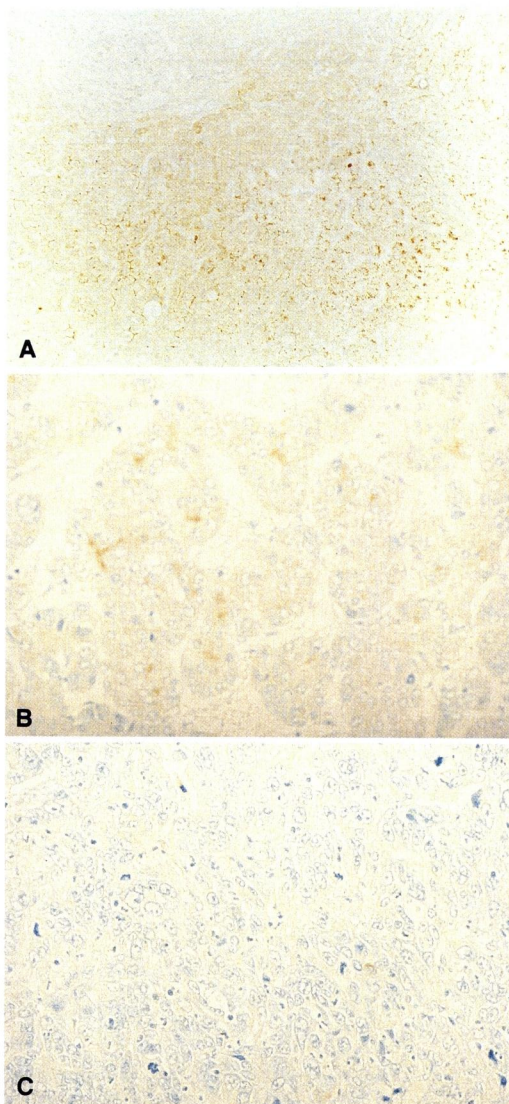


Fig. 6 Immunohistochemical detection of BGP I with MoAb P1-255 in hepatocellular carcinoma tissues. The cytoplasm and bile canaliculi were clearly immunostained in a non-cancerous tissue sample (A) (170 \times). With regard to HCCs, the luminal contents of pseudoglands were positive in a case of Edmondson type II (B) (340 \times), whereas a case of Edmondson type IV was shown negative (C) (340 \times).

Table 1 Relationship between differentiation level of carcinomas and staining intensity with P1-255

| Tissue specimens | Staining Intensity* | | | |
|-----------------------------|---------------------|----|---|---|
| | +++ | ++ | + | - |
| Non-cancerous lesions (n=5) | 5 | | | |
| HCC** (n=15) | | | | |
| Edmondson | | | | |
| type II | 2 | 3 | | |
| type III | | 2 | 5 | |
| type IV | | | 2 | 1 |

* +++, strongly positive; ++, moderately positive; faintly positive; -, negative.

** hepatocellular carcinoma.

のみならず胃, 大腸, 脾, および肺癌由来の細胞株に広く BGP I mRNA の発現を認めた. Barnett ら¹⁸⁾ の検討でも膀胱癌, 絨毛上皮腫, 悪性黒色腫, 骨髄性白血病由来の細胞株において発現を認めている. また Kuroki ら¹⁹⁾ は好中球 cDNA ライブラリーより BGP I クローンを得ている. これらのことは, BGP I の組織分布がきわめて広範囲であることを示唆し, 胆汁中の CEA 様抗原と考えられていた BGP I の新しい側面が明らかになってきている.

本研究においては, これまで議論のあった肝細胞癌における CEA 様抗原の本態を明らかにするために, 非癌部肝および肝細胞癌における BGP I の発現について検討を加えた. 検索した全ての肝細胞癌とその非癌部組織において BGP I mRNA の発現を認め, ノーザンプロット法による解析の結果からは癌部により強く発現するという結論は得られなかった. また肝細胞の分化形質を良く保持していると考えられる肝癌細胞株 HuH-7²⁰⁾ においても BGP I mRNA の発現を認めた. HuH-7 については CEA 様抗原が radioimmunoassay 法にて培養上清中に検出されており²⁰⁾, それが BGP I である可能性がある. さらに CEA および NCA のプローブではこれらのメッセージが非癌部肝細胞および肝細胞癌に全く検出されなかった. Tsutsumi ら¹⁵⁾ も CEA, NCA のそれぞれに特異性の高いと考えられるモノクローナル抗体を用いて免疫組織学的検討を行ない, 肝細胞および肝細胞癌は陰性であったとしている. 従って肝細胞癌に見出される CEA 様抗原については主として BGP I であると考えられた. ところで, HuH-7 において 3.9 kb のメッセージに加えて 1.9 kb の位置にもバンドが検出されたが, これは BGP I mRNA の isoform と考えられる. これまで BGP I mRNA の isoform に

は少なくとも 4 種あることが知られている¹⁸⁾ がそれらの全てが蛋白に翻訳されるか否かは明らかにされていない.

次に BGP I mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて観察した. シグナルは肝細胞および肝細胞癌の細胞質に顆粒状一部び慢性に認められた. これによって, これらの細胞が BGP I mRNA を発現していることが組織学的にも明らかとなった.

BGP I の発現を蛋白レベルでも検討するために MoAb P1-255 を用いた. 本抗体は教室の菱川ら¹⁴⁾ によって CEA の合成ペプチドを免疫原として作製され, NCA に交差反応を示す. 肝細胞では CEA および NCA の mRNA が検出されなかったことから, BGP I と交差反応性を有するこのような抗体 (P1-255) を利用して BGP I の発現を観察し得ると考えられる. まず抗体の BGP I との反応性を確めるため, 胆汁の過塩素酸抽出液についてウェスタンプロットを行なったところ, P1-255 によって 85 kDa と 110 kDa の 2 本のバンドが検出された. 抗 CEA ポリクローナル抗体によってもこれら 2 本のバンドが同様に検出されたが, NCA に特異性の高い MoAb F 106-88¹⁵⁾ は全く反応を示さなかった. Svenberg ら¹⁾ が最初に報告した BGP I は 85 kDa のみであり, 110 kDa の本態は明らかではなかった. 最近 Drzeniek ら²¹⁾ は約 115 kDa の BGP I 蛋白が大腸癌細胞株 HT 29 の膜分画に存在することを示唆しており, 今回検出された分子も BGP I である可能性が高いと考えられる. 今後本蛋白の精製を行ない, 一部のアミノ酸配列を決定することによって, mRNA の isoform との関連が明らかになるものと思われる.

P1-255 を用いた免疫組織染色では, 非癌部肝細胞の細胞質に顆粒状の陽性反応物を認め, また毛細胆管が

線状陽性を呈した。これらの所見は BGP I が肝細胞で合成され毛細胆管より胆汁中に分泌されることを示唆する。BGP I は I 型の膜貫通蛋白であり³⁾、肝細胞膜の毛細胆管面において、おそらくはプロテアーゼの作用によって細胞外ドメイン部分が胆汁中に遊離するものと推測される。肝細胞癌では明らかに P1-255 の反応性が低下しており、主に偽腺管形成のある部分やその内腔に染色が認められた。また、Edmondson 分類と比較すると II 型から IV 型へと分化型が低くなるほど染色強度が低下する傾向がうかがわれた。一方、大腸癌に関しては、菱川ら¹⁴⁾に従って同様の固定法で作製した組織切片で MoAb P1-255 の十分な染色強度が得られた。しかし、大腸癌では BGP I に加えて CEA および NCA も常に発現している^{6,7)}ため、BGP I 自体の発現を MoAb P1-255 による免疫染色のみでとらえることは不可能であろう。

ところで、BGP I の生理的機能については現在のところ全く知られていない。トランスフェクトマを用いて BGP I が Ca^{2+} および温度依存性に細胞凝集をおこす²²⁾ことが示されている。しかし、通常の細胞株では実験が困難であり *in vivo* での機能を表わすものか否かは明らかでない。ラット肝細胞膜の ecto-ATPase と BGP I の間にアミノ酸レベルで約 65% の配列類似性が報告された²³⁾が、これまでのところ BGP I に ATPase 活性は証明されていない。最近この ecto-ATPase が インスリンレセプターチロシンキナーゼの基質になり得ることが示された²⁴⁾。また細胞間接着や胆汁酸輸送に関与する可能性も示唆されている。BGP I と ecto-ATPase との高いアミノ酸配列の相同性を考慮すると、BGP I の機能についてもこのような面からの解析が必要であろう。

肝細胞癌における BGP I の発現が Edmondson 分類上高分化型のものに強いことは、上述の *in vitro* 細胞凝集活性²²⁾などから細胞間接着への関与を推察させる。Mowery ら²⁵⁾は ecto-ATPase が肝細胞の bile canaliculi 面に加えて細胞間の一部にも発現しており、また単離したラット肝細胞の再凝集を抗 ecto-ATPase 抗体が阻止することから、細胞間接着因子としての機能を示唆した。もし BGP I に類似の機能が存在するなら、その発現レベルの低下が逆に肝細胞癌の悪性度を高めると仮定することも可能であり、今後この面からさらに検討を加えたいと考えている。

5 要 約

1. BGP I に特異的な cDNA プローブを用いて、BGP

I mRNA が多くの上皮性腫瘍由来細胞株において発現することを明らかにした。

2. 大腸癌組織において BGP I mRNA は NCA mRNA とは異なり癌部での発現レベルの上昇を示さなかった。
3. BGP I mRNA が肝細胞および肝細胞癌において発現することを明らかにした。
4. 抗 CEA ペプチド MoAb P1-255 を用いた免疫組織染色では、非癌部肝細胞においては細胞質と毛細胆管に染色を認め、BGP I が肝細胞で産生され毛細胆管へ分泌されることが示唆された。
5. 肝細胞癌部においては、非癌部に比較して MoAb P1-255 の反応性が低く、Edmondson 分類上分化度の低下に伴って BGP I の発現レベルも低下する傾向であった。

謝 辞

御指導、ご校閲いただいた本学内科学第 1 講座谷内昭教授に深謝致します。また細胞株を御供与下さったがん研究振興財団 JCRB 細胞バンク、肝組織をご提供下さった北海道大学第 1 外科内野純一教授に深謝致します。

本研究は文部省科学研究費補助金がん特別研究 I (谷内)、重点領域研究 (今井) 及び一般研究 (C) (日野田) の補助による。

文 献

1. Svenberg T. Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int J Cancer* 1976, 17: 588-596.
2. Oikawa S, Nakazato H, Kosaki G. Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. *Biochem Biophys Res Comm* 1987, 142: 511-518.
3. Hinoda Y, Neumaier M, Hefta SA, Drezeniel Z, Wagener C, Shively L, Hefta LJF, Shively JE, Paxton RJ. Molecular cloning of a cDNA coding for biliary glycoprotein I: Primary structure of a glycoprotein immunologically cross-reactive with carcinoembryonic antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, 85: 6959-6963.
4. Neumaier M, Zimmermann W, Shively L, Hinoda Y, Riggs AD, Shively JE. Characterization of a cDNA clone for the nonspecific cross-reacting antigen (NCA) and a comparison of NCA and carcinoembryonic antigen. *J Biol*

- Chem 1988, 263: 3202-3207.
5. Sato C, Miyaki M, Oikawa S, Nakazato H, Kosaki G. Differential expression of carcinoembryonic antigen genes in human colon adenocarcinomas and normal colon mucosa. *Jpn J Cancer Res* 1988, 79: 433-437.
 6. 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* 1989, 58: 87-98.
 7. Higashide T, Hinoda Y, Itoh J, Takahashi H, Satoh Y, Ibayashi Y, Imai K, Yachi A. Detection of mRNAs of carcinoembryonic antigen and non-specific cross-reacting antigen genes in colorectal adenomas and carcinomas by *in situ* hybridization. *Jpn Cancer Res* 1990, 81: 1149-1154.
 8. Endo Y, Fujino M, Kodama T, Oda T, Burtin P. Carcinoembryonic antigen in benign liver diseases. In: Lehmann FG, editor. *Carcinoembryonic proteins I*, 1979, 91-96.
 9. Kodama T, Fujino M, Endo Y, Fukazawa M, Sugiura M, Oda T, Wada T, Burtin P. Carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-like substances in hepatobiliary diseases. In: Lehmann FG, editor. *Carcinoembryonic proteins II*, 1979, 93-98.
 10. Davis LG, Dibner MD, Battey JF. Guanidine isothiocyanate preparation of total RNA. In: Davis LG, Dibner MD, Battey JF, editors. *Basic methods in molecular biology*, 1986, 130-135.
 11. Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983, 6-13.
 12. 伊林由美子, 東出俊之, 今井浩三. 肝癌及びその他の肝疾患組織における AFP mRNA の発現. *札幌医誌* 1991, 60: 363-377.
 13. Hinoda Y, Imai K, Ban T, Endo T, Yachi A. Immunochemical characterization of adenocarcinoma-associated antigen YH206. *Int J Cancer* 1988, 42: 653-658.
 14. 菱川法之, 辻崎正幸, 今井浩三. 合成 peptide を用いた抗 carcinoembryonic antigen (CEA) モノクローナル抗体の作製と CEA 上の抗原決定基の解析. *札幌医誌* 1989, 58: 295-305.
 15. Tsutsumi Y, Onoda N, Misawa M, Kuroki M, Matsuoka Y. Immunohistochemical demonstration of nonspecific cross-reacting antigen in normal and neoplastic human tissues using a monoclonal antibody. Comparison with carcinoembryonic antigen localization. *Acta Pathol Jap* 1990, 40: 85-97.
 16. Yachi A, Imai K, Endo T, Hinoda Y. Immunohistochemical analysis of human adenocarcinoma-associated antigen YH206 detected by a monoclonal antibody. *Jpn J Med* 1986, 25: 127-134.
 17. 臨床・病理. 日本肝癌研究会編. 原発性肝癌取扱い規約 (第2版). 金原出版. 1987, 38-39.
 18. Barnett TR, Kretschmer A, Austen DA, Goebel SJ, Hart JT, Elting JI, Kamarck ME. Carcinoembryonic antigens. alternative splicing accounts for the multiple mRNAs that code for novel members of the carcinoembryonic antigen family. *J Cell Biol* 1989, 108: 267-276.
 19. Kuroki M, Arakawa F, Matsuo Y, Oikawa S, Nakazato H, Matsuoka Y. Three novel molecular forms of biliary glycoprotein deduced from cDNA clones from a human leukocyte library. *Biochem Biophys Res Comm* 1991, 176: 578-585.
 20. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 1982, 42: 3858-3863.
 21. Drzeniek Z, Lamerz R, Fenger U, Wagener C, Haubeck HD. Identification of membrane antigens in granulocytes and colonic carcinoma cells by a monoclonal antibody specific for biliary glycoprotein, a member of the carcinoembryonic antigen family. *Cancer Lett* 1991, 56: 173-179.
 22. Rojas M, Fuks A, Stanners CP. Biliary glycoprotein, a member of the immunoglobulin supergene family, functions in vitro as a Ca^{2+} -dependent intercellular adhesion molecule. *Gell Growth & Differentiation* 1, 1990, 527-533.
 23. Lin SH, Guidotti G. Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. *J Biol Chem* 1989, 264: 14408-14414.
 24. Margolis RN, Schell MJ, Taylor SI, Hubbard AL. Hepatocyte plasma membrane ecto-ATPase (pp120/HA4) is a substrate for tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 1990, 166: 562-566.
 25. Mowery J, Hixson DC. Detection of cell-CAM 105 in the pericanalicular domain of the rat hepatocyte plasma membrane. *Hepatology* 1991, 13: 47-56.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第1講座 高井康博