

長期 AFP 産生性ヒト肝細胞癌の培養細胞株の 樹立ならびにその特性

京都大学医学部病理学教室 (主任: 翠川 修教授)

野原 隆彦, 岡本 英一, 沢田 真治, 翠川 修

京都大学医学部外科学教室第1講座 (主任: 戸部隆吉教授)

高三 秀成, 戸部 隆吉

[原稿受付: 昭和58年3月11日]

Establishment and Some Characteristics of AFP Producing Human Hepatoma Cell Line

TAKAHIKO NOHARA, EIICHI OKAMOTO, SHINJI SAWADA and OSAMU MIDORIKAWA

Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyoto University

HIDENARI TAKASAN, TAKAYOSHI TOBE

The 1st Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

α -Fetoprotein (AFP) was first discovered by Bergstrand et al. (1956) in the embryonic sera and was found also in the blood of hepatocellular carcinoma by Abelev et al. (1963) and Tatarinov et al. (1964). Thereafter, AFP has been investigated as carcino-embryonic protein, and utilized for detecting primary liver cancer or malignant teratoma. Though it is useful for clinical medicine, metabolism and significance of AFP production in carcino-embryonic cells have not been elucidated. So, we consider it very useful for these studies to establish the human hepatocellular carcinoma cell line that produces AFP, and the attempt has been made.

A piece of neoplastic tissue was obtained (June 8, 1978) from a patient undergoing right lobectomy for the hepatocellular carcinoma (Edmondson: Gr. II, Serum AFP: 100 μ g/ml) arising in the right lobe of a cirrhotic liver. And a continuously growing cell line was established (HH2). From HH2, three sublines were obtained, viz, "HH2-6", "HH2-4", "HH2-1".

AFP producing capacity has been maintained in subline HH2-1 and HH2-6, and further study was performed in HH2-6 cell line. Doubling time was 72 hours. The cells had the epithelial appearance and showed the piling up growth. Spent culture media contained AFP

Key words: Human hepatocellular carcinoma, α -Fetoprotein, Albumin, Cultured cell line, Transplantation to the nude mouse.

索引用語: 人肝細胞癌, アルファフェトプロテイン, アルブミン, 培養細胞株, ノードマウス移植.

Present address: Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

and albumin (ALB) from the cultured cells. Immunohistochemistry (PAP method) of the paraffin embedded section of cultured cells showed AFP and ALB in the same cell, thus confirming their origin. The transplantability was tested by inoculating 10^7 cultured cells to nude mice. After two months, distinct tumor growth was observed and their serum had high titer of AFP. Morphological appearances of original tumor, cultured cells and transplanted tumor was shown in the paper.

Many hepatoma cell lines have been established in various institutions, but only a few cell lines have produced AFP continuously for a long time. HH2-6 cell line has been maintained for about 4.5 years, the longest in the world. HH2-6 cell line is extremely useful for the study of AFP, ALB and other protein production in the hepatic cells.

緒 言

肝細胞癌は近年増加の傾向にあり、その予後は非常に悪いものとされている。現在の治療法は手術を主体として放射線療法や抗癌剤療法などを併用しているが、最近の手術手技の向上にも拘らず早期に発見された症例を除いて5年生存例は未だ多くは無い。早期診断法では、血中 AFP 値の測定、CT、血管造影法などに進歩が見られるものの、血中 AFP 値の測定は AFP 非産生肝癌には無効である。また、CT や血管造影法では、腫瘍の一定の大きさ ($\phi 2$ cm 以上) を必要とする。こうした臨床の現状に対し歴史的には、 α -Fetoprotein (AFP) は胎児性蛋白として発見され¹⁾、Abelev (1963年)²⁾ や Tatarinov (1964年)²⁷⁾ らによって肝癌にも見いだされる事が報告され、以来、癌胎児性蛋白として注目されて来た。そして、そこでは、①動物肝癌の胎生期～新生仔期に出現する AFP が、正常成熟動物では殆ど産生されなくなるにも拘らず、肝細胞癌や悪性奇形腫などで再び出現する²⁾ のは何故か、②肝細胞癌には AFP 産生型と非産生型が存在する¹²⁾ がその遺伝子レベルで差違があるか、③ AFP と Albumin (以下 ALB と略す) の類似性や関係の有無^{15,16,24,29)}、などが注目され、研究されて来たが未だ解明されるに至っていない。

そこで我々は、人肝癌に対して ① AFP 産生肝癌の場合には、治療の標的としての肝細胞癌を癌胎児性蛋白である AFP もしくは抗 AFP 抗体を用いる事によって、より小さな細胞単位での、且つ適確な標的となし得るのではなかろうか^{14,28)}。② AFP 非産生肝癌の場合では、AFP の発現や消退を人為的になし得る可能性^{7,8)} や、AFP 以外の腫瘍マーカー (癌蛋白としては

他に CEA の存在があげられるが、完全性に欠ける) の検索が可能となるのではなかろうか。このような観点から AFP 産生人肝癌の細胞の特性を調べる事は極めて重要な意義があると考えた。AFP 非産生肝癌細胞に於いても、AFP 産生の発現機構を研究する事は、AFP 産生細胞と AFP 非産生細胞の特性の相違を明らかにする事を通して AFP の動態が少しでも明らかになるならば、臨床的にも極めて高い意義があると言えよう。更にヌードマウスを用いる事によって腫瘍および AFP の in vivo に於ける動態の検索が可能となるであろう。また、人の正常肝細胞の機能について、多くの研究がなされているにも拘らず、未だ充分に解明されるに至っていないが、この事は、人の正常肝細胞を長期に培養する事が殆ど不可能である事も一因をなしており、この点からも人肝癌細胞の培養は、正常と癌との相違を充分に考慮に入れた上で正常肝細胞の機能を研究する事も可能である。これらの目的の為に、人肝癌細胞の長期培養および培養細胞のヌードマウスへの移植を試みた。

材料および方法

1) 材 料

肝細胞癌の診断の下に肝拡大右葉切除術を施行された50才男性の患者の手術摘出腫瘍組織を材料に供した。術前の検査成績では HBsAg 陽性、および HBsAb 陽性、血中 AFP 値は $100 \mu\text{g/ml}$ であった (図 1)。

2) 培養方法

手術摘出標本を無菌的に採取し、細切后、0.25% トリプシン (阪大微研) にて分解処理を施し、20% FCS (Grand Island Biological Company: USA) を加えた RPMI 1640 (白水製薬) medium にて培養した。

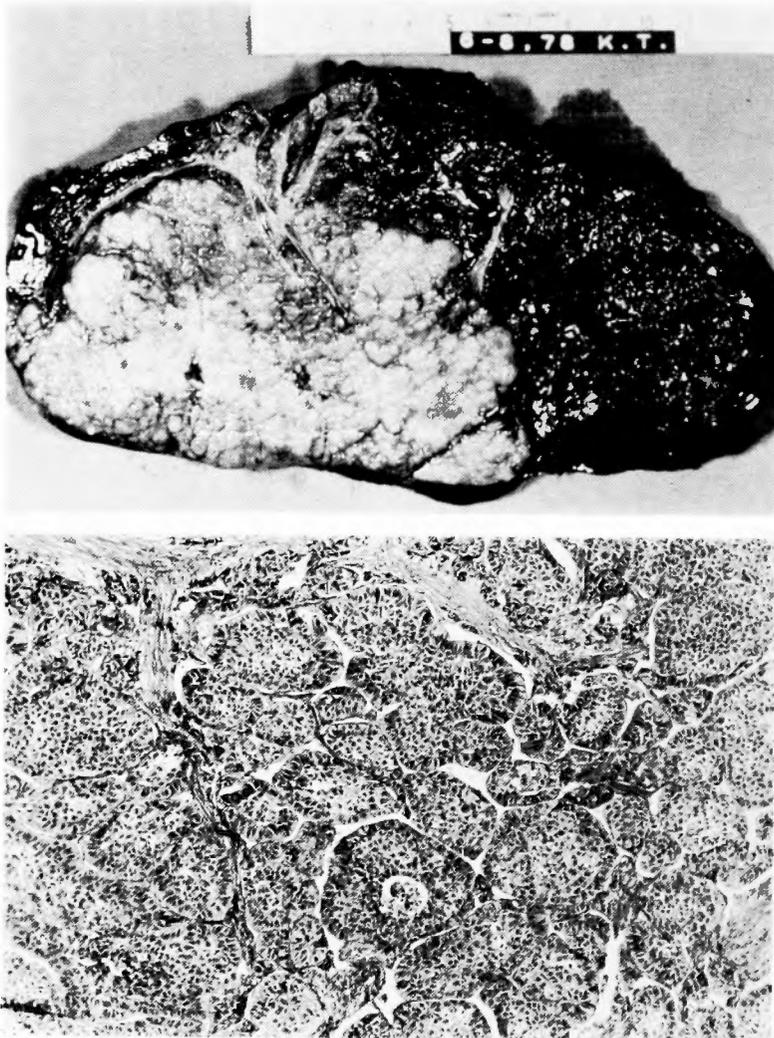


図1 上: Hepatoma の手術摘出標本
下: 摘出標本の組織像

この際、同一試料を10培養瓶に分注し密閉培養し、以後の継代培養も同一培地で継続し、培養340日後(継代7代)でクローニングを行った。

通常の分株はトリプシンを使用せずに行い、クローニングは single cell culture を行った後、検鏡で胞体内顆粒の豊富な細胞を選び出して培養を続けた。

3) 増殖曲線

0.25%トリプシン処理した細胞をレイTON管(17 mm×75 mm)に約 1×10^4 個播き、経時的にシリコンラバーで掻き出し0.05% crystal violet in 0.2 M citric acid で染色した後に検鏡し計測した。

4) 染色体分析

0.04 μ g/ml の濃度でコルヒチン処理を行い、37°Cで2時間 incubate した後、低張液(0.075 M-KCl)を加えた後、カルノア溶液による固定を行い、細胞浮遊液をスライドガラスの上ののせ、これを自然乾燥させた後、Giemsa 染色して検鏡した。

5) 透過型電顕(TEM)

原発肝癌組織および培養細胞について検索を行った。後者はシリコンラバーで層を壊さない様にかき出し細胞塊とし、2%グルタルアルデヒドおよび1%オスミウム酸の二重固定後、脱水、エポキシ包埋し超薄切を行

った。電子顕微鏡は、日立の HU-12A 型を使用した。

6) 走査電顕 (SEM)

カバーガラス上で培養した細胞を 2% グルタルアルデヒドおよび 1% オスミウム酸の二重固定後、脱水し、臨界点乾燥後、金イオン・スパッター・コーティングを施した。電子顕微鏡は日立 HFS-2S 型および S-450 型を用いた。

7) AFP 定性, 定量

Conditioned medium 中の AFP の同定および定量は、single radial immunodiffusion 法²²⁾ (FP プレート: エーザイ), 赤血球凝集法 (FP テスト: 持田製薬),

radioimmunoassay 法¹⁸⁾ (AFP-RIA キット: 栄研) を用いた。

8) アルブミン (ALB) 定量

Conditioned medium 中の定量は、ICS 法²¹⁾ (ALB-Reagent Test Kit: Beckman) を用い、抗体は抗ヒトアルブミン羊抗血清 (Beckman) を用いた。

9) 酵素抗体法による AFP, ALB の検索

手術標本およびヌードマウス腫瘍の組織検索はパラフィン切片で行い、培養細胞はカバーガラス上で細胞を培養し、その後、冷アセトン凍結、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定したものと、培養細胞を遠沈し 10

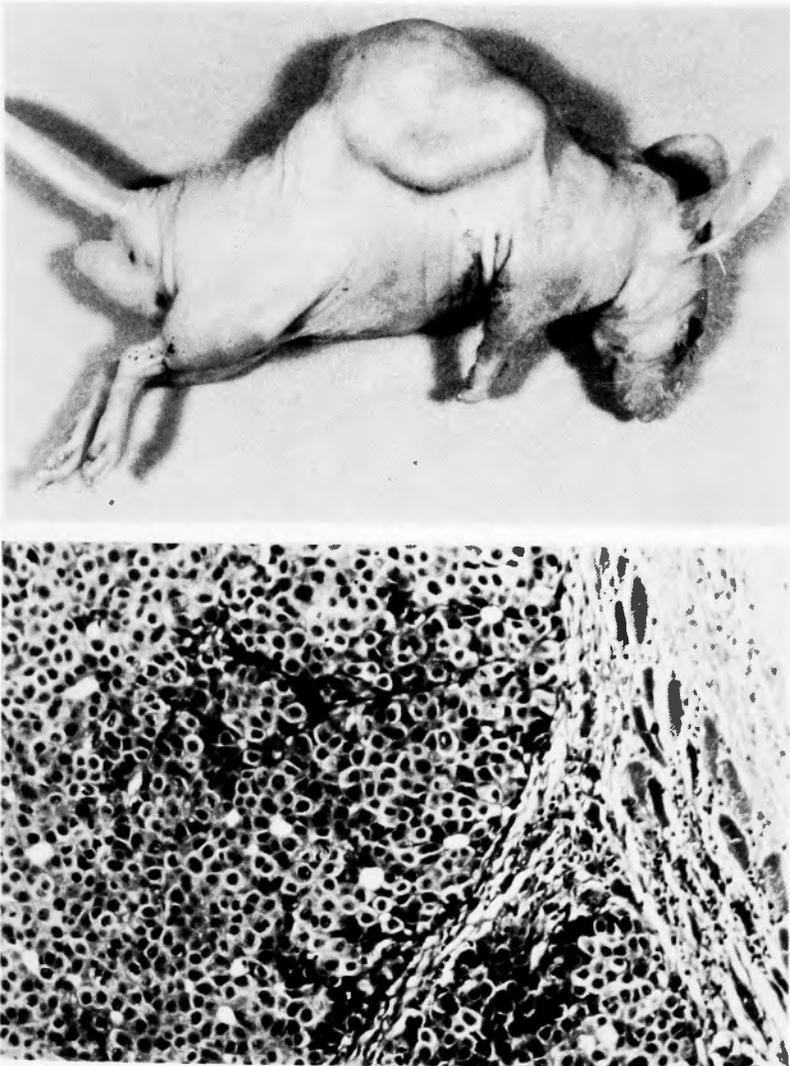


図2 上:ヌードマウス皮下移植腫瘍 3.5M♂, 移植2ヶ月後
下:移植腫瘍の組織像

多中性緩衝ホルマリン固定, パラフィン包埋切片について, それぞれ PAP 酵素抗体染色法にて検索した. 抗体としては, 抗ヒト AFP ウサギ抗血清 (DAKO) または, 抗ヒト ALB ウサギ抗血清 (MILES) の各標本を使用した. 発色には, DAB, 対比染色には Mayer ヘマトキシリンを用いた.

10) ノードマウスへの移植

第7継代の培養細胞 1×10^7 個を nu nu (BALB) 3.5 ヶ月令, 雄マウスの背部皮下へ移植し in vivo の腫瘍形成に成功した. 接種後2ヶ月で示指頭大の腫瘍を形成した. これを脱血屠殺後, 無菌的に腫瘍を摘出し, 継代移植すると共に一部腫瘍を10%中性緩衝ホルマリンに固定し, 一般組織学的検査ならびに免疫組織学的検索に使用した (図2).

11) 組織標本の光学顕微鏡的検索

手術摘出腫瘍組織およびノードマウスへの移植腫瘍は採取後10%ホルマリン固定後, パラフィン包埋し, 4μ 薄切切片についてヘマトキシリンエオジン染色で光学顕微鏡により観察した.

結 果

1) 人肝細胞癌の培養細胞株の樹立

1978年6月9日, 人肝細胞癌の初代培養を開始し, 9ヶ月后, 線維芽細胞およびマクロファージなどの間

葉系細胞を除いた上皮細胞成分だけの継代培養に成功し HH2-6 株と命名した. 更に, 本株は2ヶ月後にクローニングを行った. また, 同一試料から試みた他の培養瓶においても培養開始後10ヶ月で上皮細胞成分だけの継代培養に成功し HH2-4 株を樹立した. HH2-6 株と HH2-4 株は, 同一試料を材料とし, 共に上皮細胞成分より成るにも拘らず, 樹立直后より HH2-6 株は高い AFP 産生能を示し, HH2-4 株は AFP 産生能を余り示さなかった. その後, クローニングや代を重ねる事によって, HH2-6 株は AFP 産生株として, HH2-4 株は AFP 非産生株として, それぞれに性格が特徴づけられるに至った.

2) HH2-6 株の増殖態度

増殖曲線は図3の通り2日間の lag phase の後, 72 時間の doubling time を示した.

3) HH2-6 株の染色体分析

培養細胞の染色体分析では, 染色体数は2倍体, 4倍体, 6倍体が見られ, マーカークロモソームも見られた. (図4)

4) HH2-6 株の一般形態学的特徴

人肝癌細胞株 HH2-6 の細胞は位相差像において敷石状配列を示し, ガラス壁に良く壁着伸展した. 核は類円~卵円形でやや泡沫状, 核/胞体比は大きく複数個の明瞭な核小体を有し, 顆粒の豊富な原形質を示し

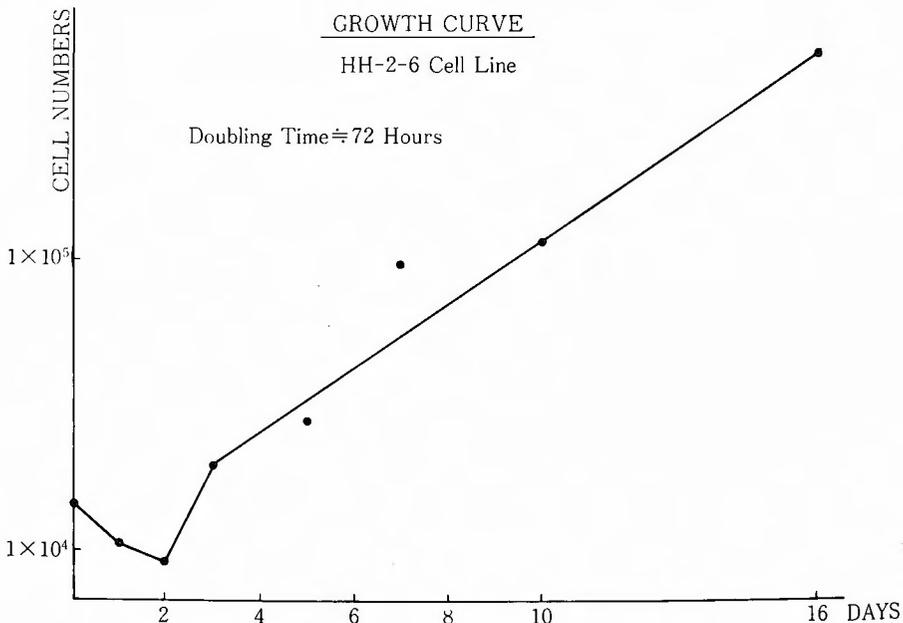


図3 HH2-6 株の増殖曲線



図4 HH2-6 株培養細胞の染色体：矢印はマーカークロモソーム

た。これらの細胞は典型的な敷石状配列をとって増殖し、増殖中心部では piling up の傾向が顕著であった(図5)。

5) 電子顕微鏡所見

a) 透過電顕観察により、原発肝癌組織は、毛細胆

管を形成しており、microvilli が豊富に見られるが(図6)、培養細胞塊に於いても遊離縁には microvilli が見られ、一部には毛細胆管様構造も見られる(図7)。又、原発肝癌細胞に於いても培養細胞に於いても desmosome はよく発達し、胞体内小器管は豊富で、ミ

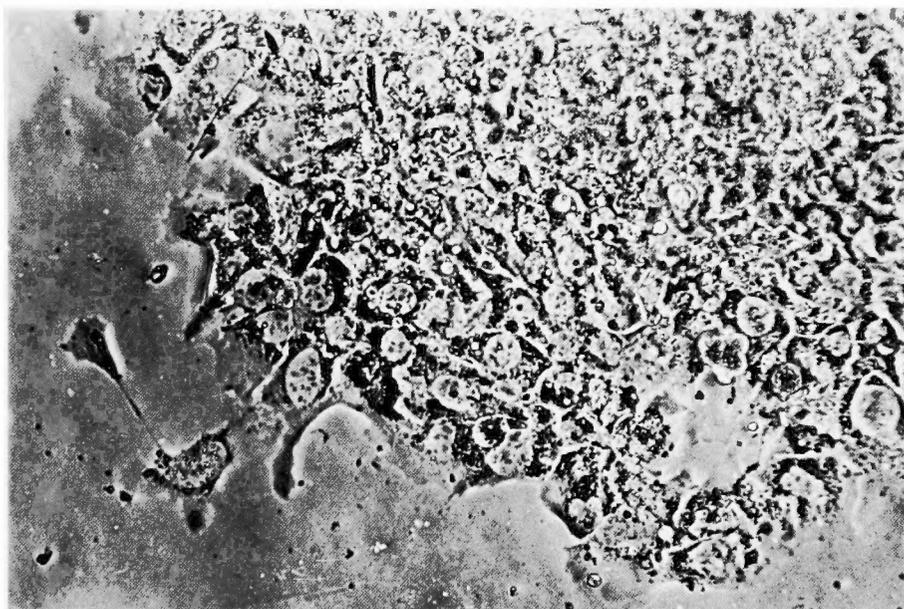


図5 HH2-6 培養細胞の位相差像 (X100)

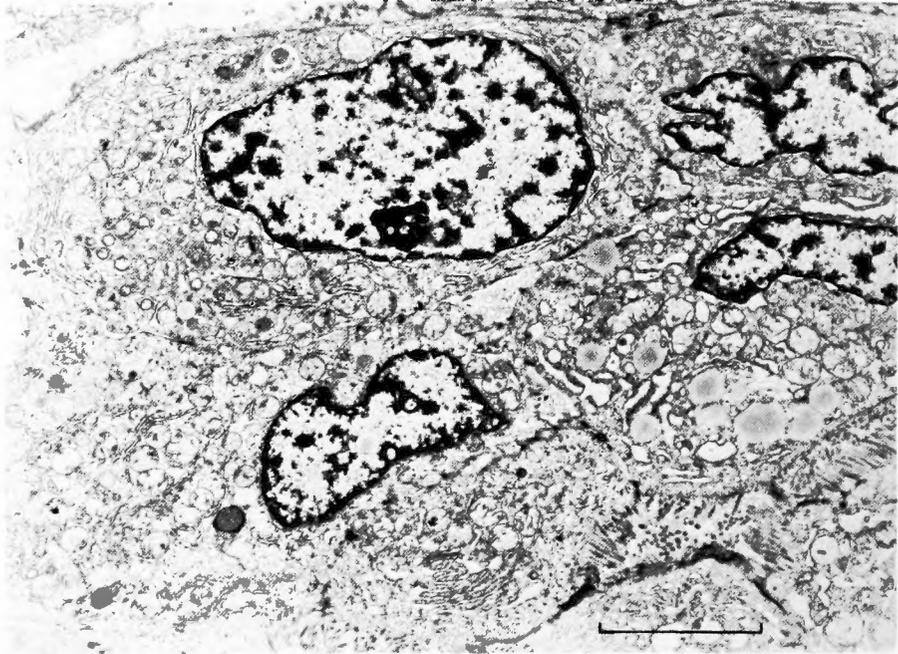


図6 手術摘出標本の透過電顕像 (Scale: 5 μ)

トコンドリア, 粗面小胞体, lysosome, freeribosome, micro-filamentなどを多数認め, これらの点でも HH

2-6株培養細胞は原発性肝癌細胞に良く類似していた.
b) 培養細胞の走査電顕像では敷石状の配列が明瞭

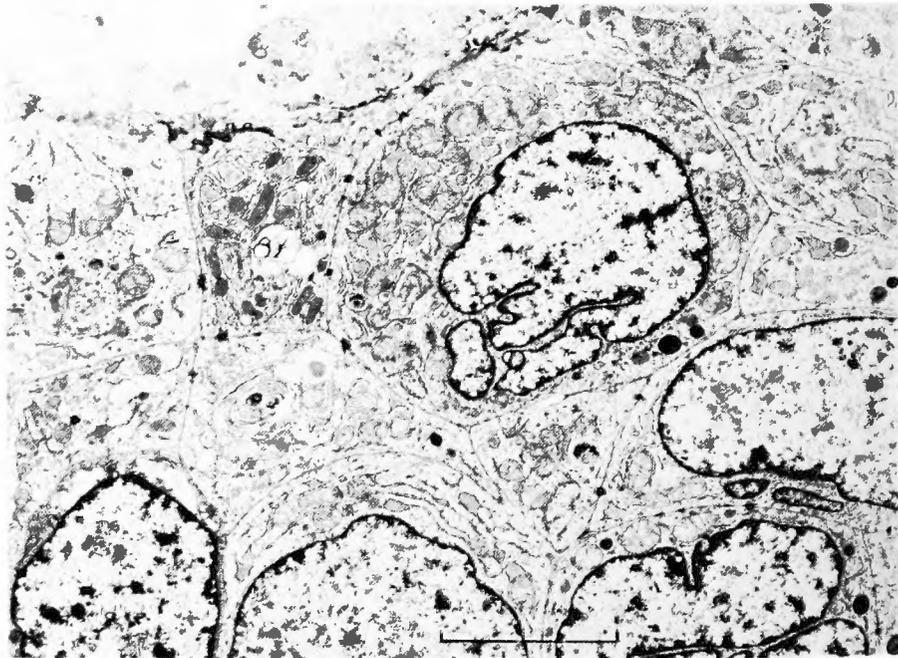


図7 HH2-6培養細胞の透過電顕像 (Scale: 5 μ)

で、樹枝状突起は平坦であり、microvilli に比較的乏しく、lamellipodia および filopodia に際立った特色は見られなかった (図 8)。

6) AFP および ALB の免疫組織学的所見

酵素抗体 (PAP) 法で染色した AFP は一般には胞

体内に褐色色素が微細顆粒状に染色される。手術組織標本では集簇性に染色される傾向であったが、培養細胞では約半数の細胞に陽性で、反応に強弱はあるが、かなり強く染色される細胞も多く認められた。また、抗ヒト ALB による PAP 法では培養細胞の半数以上



図 8 HH2-6 培養細胞の走査電顕像 (Scale : 5 μ)

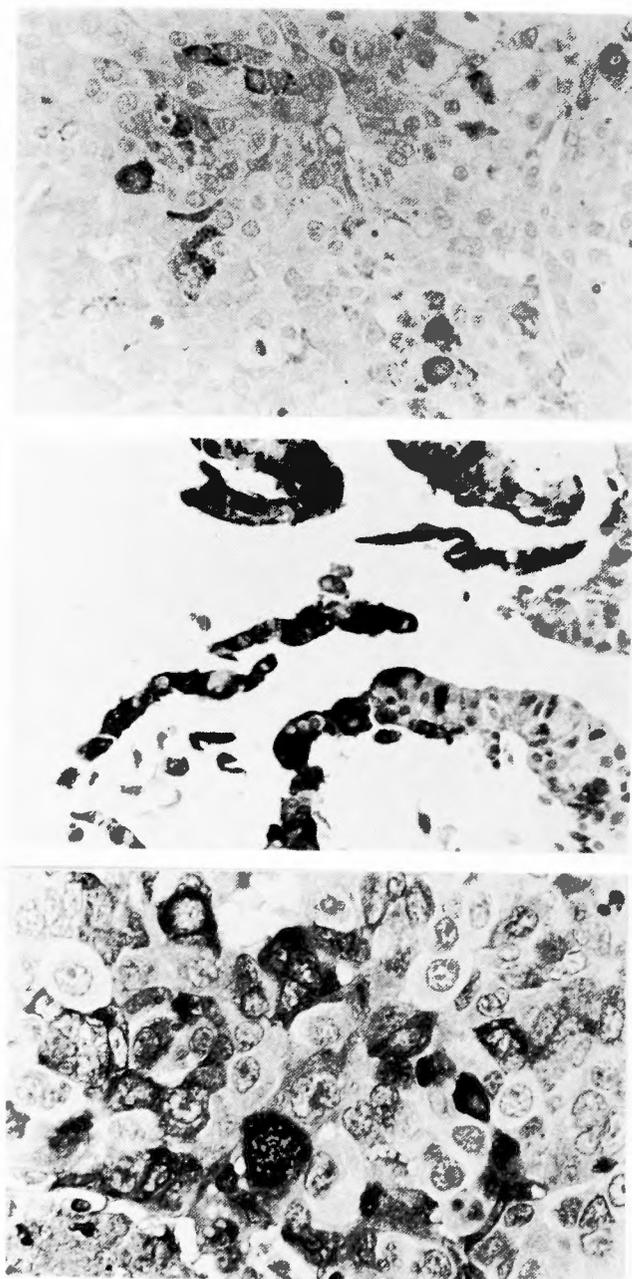


図9 上段：手術摘出標本のパラフィン切片
PAP 法によるヒト AFP 特異染色 (×100)
中段：HH2-6 培養細胞のパラフィン切片
PAP 法によるヒト AFP 特異染色 (×40)
下段：ヌードマウス皮下移植腫瘍のパラフィン切片
PAP 法によるヒト AFP 特異染色 (×200)

が陽性で ALB および AFP を同時に産生している細胞が存在するものとみなされた (図9, 図10).

7) 培養細胞のヌードマウス移植腫瘍の HE による組織像は手術摘出標本に比して, やや多核の細胞が多くなり, 腫瘍内細血管の分枝に若干差違がみられるが線維性間質は殆どなく, 髄様構造を示し基本的には同一の組織像を示していた. 手術摘出標本は, 組織分類から Edmondson grade II であったが, ニードマウス移植腫瘍は, Edmondson grade III とみなされた^{11,26)} (図11). また, 初代移植腫瘍の酵素抗体法でも PAP

法を用いて AFP および ALB が染色された (図9, 11). PAP 法による ALB 染色は, 培養細胞で強く染色されたが, ニードマウス移植腫瘍の組織標本ではやや弱く染色された (図10).

8) Ouchterlony 法では, HH2-6 系培養細胞の conditioned medium, 初代移植ヌードマウス血清, および AFP 陽性肝癌患者血清で, 抗体との間に特異沈降線が見られた (図12).

9) 培養系における AFP および ALB の定量的検索

① HH2-6 株のコロニー間で AFP, ALB の産生

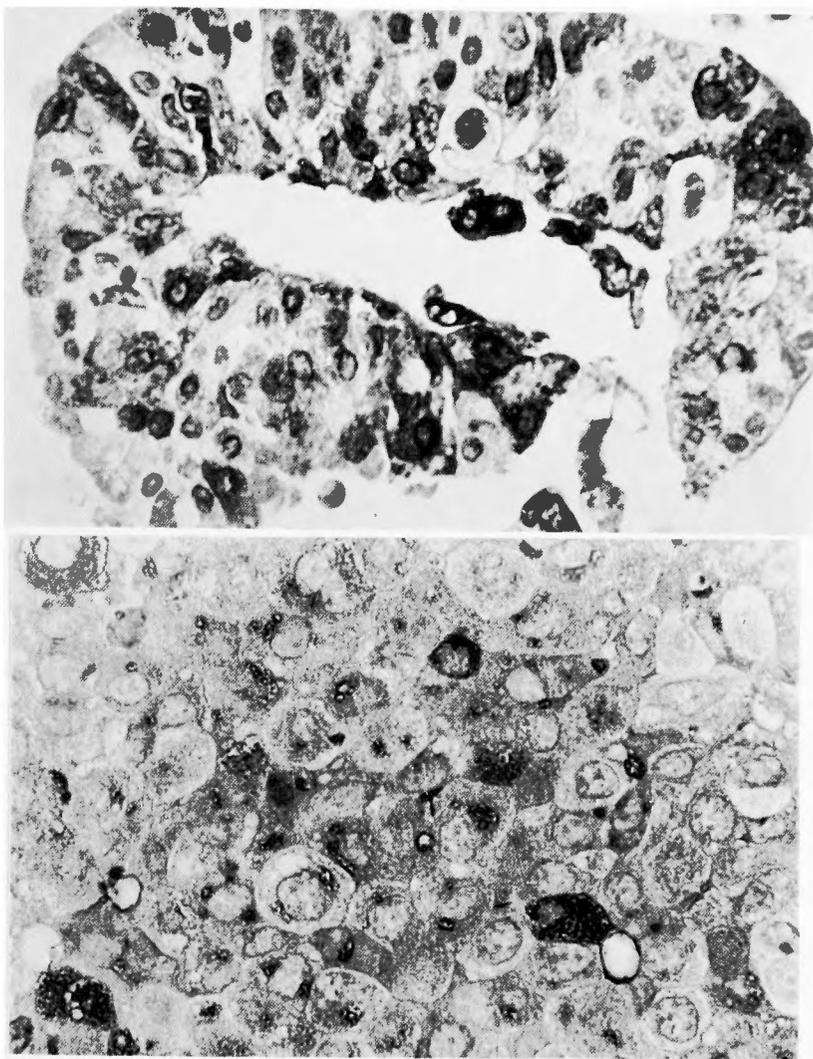


図10 上段: HH2-6 培養細胞のパラフィン切片
PAP 法によるヒト ALB 特異染色 (×100)
下段: ニードマウス皮下移植腫瘍のパラフィン切片
PAP 法によるヒト ALB 特異染色 (×200)

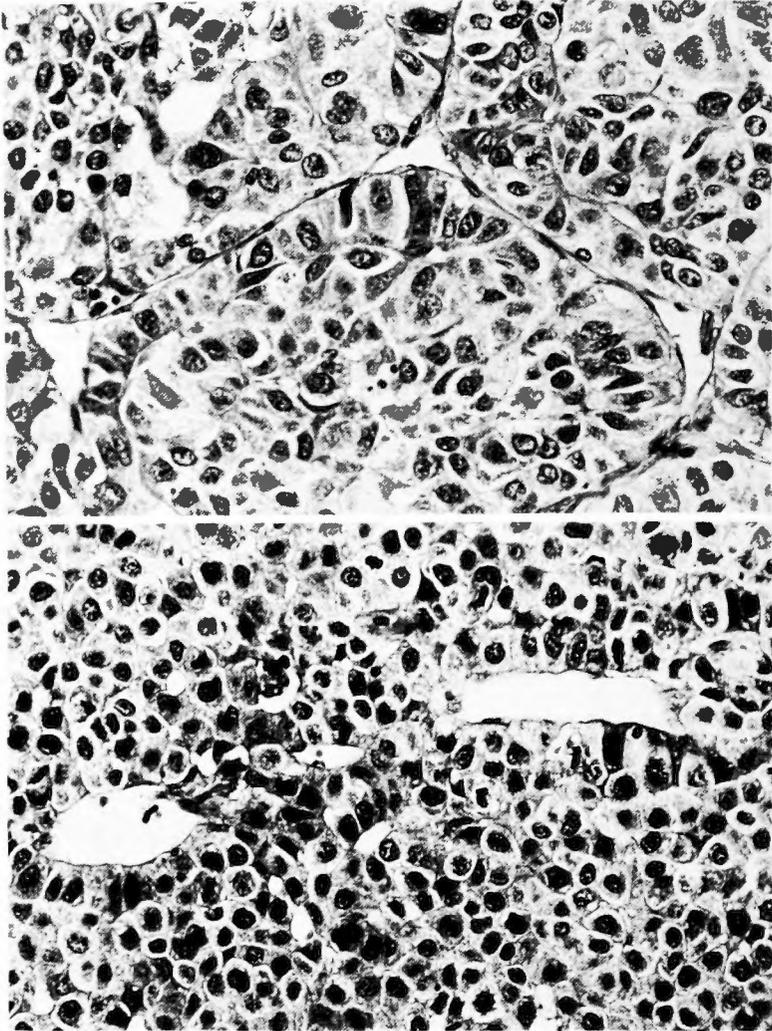


図11 上段：手術摘出標本の HE 染色による組織像 ($\times 100$)
下段：ヌードマウス移植腫瘍の HE 染色による組織像 ($\times 100$)

表1 HH2-6 株の亜株による AFP と ALB 産生量の差異

cell lines	ALB (ng/cell)	AFP (ng/cell)
HH2-6-6K	7.5	1.0×10^{-2}
HH2-6-6M	12.4	0.5×10^{-2}
HH2-6-8N	12.0	0.4×10^{-2}
HH2-6-13Y*	113.0	4.8×10^{-2}

*HH2-6-13Y は特別にクローニングを行なった。

表2 HH2-6 株の細胞増殖と AFP 産生量の変化

Incubation time	cell number	AFP (ng/cell)
1 DAY	1.0×10^4	58.0×10^{-4}
2 DAYS	0.9×10^4	83.3×10^{-4}
3 DAYS	2.0×10^4	33.5×10^{-4}
5 DAYS	2.8×10^4	26.0×10^{-4}
7 DAYS	9.5×10^4	6.5×10^{-4}

量にかなりの差が見られた。高い AFP 産生を示すコロニーを選びながら継代を行った系は、他系に比べ

で非常に高い AFP 産生能を維持している (表1)。

② AFP 量を経目的に測定した結果では、培養細

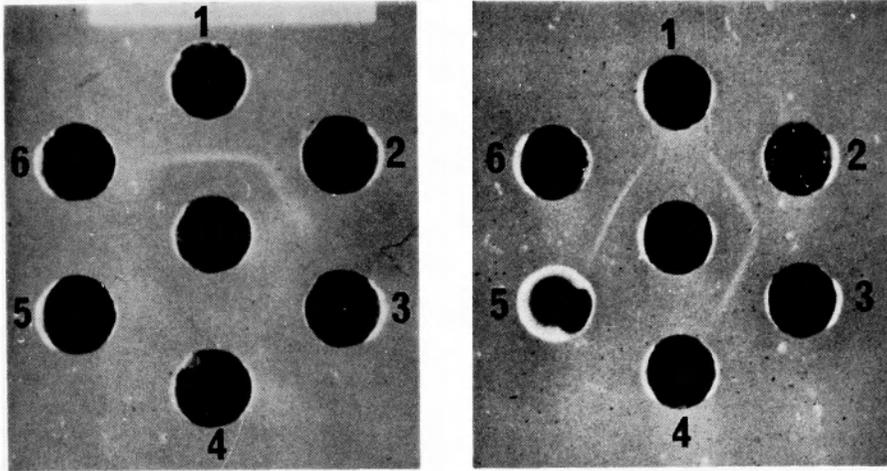


図12 Ouchterlony 法による AFP 定性

左図 中心孔：Conditioned medium の100倍濃縮液

- 1: 抗 AFP ウサギ抗血清 (原液)
- 2: // (1/2希釈)
- 3: // (1/4希釈)
- 4: // (1/8希釈)
- 5: // (1/16希釈)
- 6: 生食水

右図 中心孔：抗 AFP ウサギ抗血清 (原液)

- 1: 生食水
- 2: 移植ヌードマウス血清 (血中濃度：38 mg/dl)
- 3: Conditioned medium (4 μg/ml を100倍濃縮)
- 4: Conditioned medium (4 μg/ml)
- 5: 正常人血清
- 6: 肝癌患者血清

胞当りの AFP 産生量は継代 2 日目にピークとなり、以後、下降線を辿る事が、わかった (表 2)。

考 察

1) 今日、樹立された人肝癌培養細胞株はいくつか報告されており^{3,9,13,17} 例えば Alexander cell line (PLC/PRF/5) の様に HB virus 肝炎の研究に多大の貢献をしているものもあり、遺伝子レベルまで掘り下げられて来ている^{5,6,10}。併し乍ら、他の実験系では特に癌化の問題については、膜酵素の変化²⁵ や薬剤添加^{8,17} による増殖力の変化に用いられている程度で必ずしも多くはない。この事は HB virus が、人間や霊長類など感染範囲が限られている事により、人肝細胞以外は殆ど実験が不可能という事によるが、HB virus 以外の実験系ではマウスやラットの方が樹立も維持もはるかにやり易い事によると思われる。併し乍ら、人肝癌の解明や治療に関する研究には、断然、人肝細胞が有用である。更に肝細胞の蛋白産生についての研究には、抗体作製などで、人の方が有利と思われる。

ところで、今述べた様に、今迄報告された人肝癌培養細胞株には、PLC/PRF/5 の様な HBs 産生株の他に、AFP 産生株がわずかにあるが、しかし消退してしまった例のみである^{9,20}。それに比して、HH2-6 株

は、5年弱を経た今日、尚、高い AFP 産生機能を維持しているのみならず、ALB や他の蛋白を良く産生しており、このような株は、今日、他に全く無く、蛋白産生に関する研究には非常に有用であると考えられる。

2) この細胞株は長年の経過を有しているが本質的な形態変化は認められない。併し乍ら、ヌードマウスへの移植腫瘍や培養株の亜株の中の一部では多株細胞が増加しており、染色体数も増加する傾向が見られる事から、初代培養時の細胞に比べて若干の脱分化の傾向にあると言えよう。この事は、栄養条件や環境条件によっては、癌細胞が時間経過と共に脱分化する一般的傾向と一致する。と同時に、十分な条件を与える事によって、この傾向を差し止める事も可能であるかも知れない。事実、この細胞株は、形態学的のみならず、機能的にも初期の状態をかなり良好に維持している。

形態学的には、位相差像およびギムザ染色で、光顕的に上皮細胞の性格を良く表現している。敷石状配列もその中の1つであるが、この事は同時に人の間葉系細胞やマウス、ラットの細胞に比して、細胞が1ヶ1ヶになりにくく、contact inhibition が、かかり易い事が考えられる。また、この細胞は monolayer に増殖するが、同時に piling up も多く見られ、これらの事から doubling time が他細胞に比べ、延長していると

思われる。また、胞体内顆粒が豊富である事は、電顕像でミトコンドリアが豊富な事やグリコーゲン顆粒が多い事と関連して旺盛な蛋白産生機能を有する事と関係があるかも知れない。電顕像では、毛細胆管形成が良く見られ、この部で villi の発達や desmosome が多く見られるが、他の遊離縁では、毛細胆管形成部に比べ、villi や desmosome の数が少ない事は興味ある所見である^{19,23)}。

3) HH2 株には現在3つの株 (HH2-1, HH2-4, HH2-6) があるが、これらの AFP 産生量には、かなりの差違が認められ、HH2-6 株は非常な高値を示し、HH2-4 株は AFP negative となっている。更に、HH2-6 株は ALB も高値に産生し AFP 高値の細胞は ALB 産生能も高く、AFP と ALB 産生量の間には、相関が成り立つ ($\gamma=0.9$ 平均) データーもあるが、稿を改めたい いづれにせよ、HH2-6 株は AFP や ALB 或は transferrin 等多くの蛋白産生能を有しているので、蛋白産生能力や、肝癌細胞の産生する種々の蛋白間の相関を調べる研究にとっては極めて有用な細胞株と考えられる。

4) スードマウスへの移植実験では、前項で述べた様に形態学的にも若干の脱分化の傾向を認めたが、時間経過によるものか、それとも移植された環境等の変化によるものか、不明であるが興味深い。更に、移植初代では極めて高い AFP 産生が示された (136 $\mu\text{g}/\text{ml}$) にも拘らず、二代目以后に AFP を産生しなくなった (1 ng/ml 以下) 事も、脱分化の事実と関連するかも知れない。

結 語

AFP 陽性の肝細胞癌患者の手術摘出標本を用いて初代培養を試み、その培養細胞株の樹立に成功し、HH2 株と命名した。HH2 株は培養当初に分注した培養瓶により、HH2-6, HH2-4, HH2-1 の亜株に分けられた。

HH2-6 株は、72時間の doubling time を有し、高い AFP 産生能を示した。HH2-4 株は、AFP の産生を示さず、AFP 非産生株となった。HH2-6 株の中でも各コロニー間で AFP および ALB 産生能には明らかな差が見られた。

本稿では、HH2-6 株の特性について、その特性を生物学的、形態学的に検索し、ついで一部で AFP および ALB の産生能に言及した。また、HH2-6 株のスードマウス皮下への移植を試み、これに成功したの

で、スードマウス移植腫瘍の光顕像についても若干の検索を試みた。

HH2-6 株は極めて長期間の培養にも拘らず、AFP や ALB などの蛋白産生能を良く保持しており、AFP の研究のみならず、肝細胞の蛋白産生能の研究に極めて有用と考えられる。

文 献

- 1) Abelev GI, Perova SD, et al: Production of embryonal α -globulin by transplantable mouse hepatoma. *Transplantation* **1**: 174-180, 1963.
- 2) Abelev GI, Assekritova V, et al: Embryonal serum α -globulin in cancer patients. *Int J Cancer* **2**: 551-558, 1967.
- 3) Alexander JJ, Bey EM, et al: Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. *S Afr Med J* **50**: 2124-2128, 1976.
- 4) Bergstrand CG, and Czar B: Paper electrophoretic study of human fetal serum protein with demonstration of a new protein fraction. *Scand J Clin Lab Invest* **9**: 277-286, 1957.
- 5) Brechot C, Pourcel C, et al: Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* **286**: 533-535, 1980.
- 6) Chakravorty PR, Ruiz-Opazo N, et al: Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg-producing human hepatocellular carcinoma cell line. *Nature* **286**: 531-533, 1980.
- 7) Chiu JF, Massari RJ, et al: Hormonal modulation of α -fetoprotein gene expression in newborn rat livers. *Nucl Acids Res* **9**: 691-693, 1981.
- 8) Chou JY, Mano T, et al: Inhibition of synthesis of α -fetoprotein by glucocorticoids in cultured hepatoma cells. *J Cell Biol* **93**: 314-317, 1982.
- 9) Doi I, Namba M, et al: Establishment and some biological characteristics of human hepatoma cell lines. *GANN* **66**: 385-392, 1975.
- 10) Edman JC, Gray P, et al: Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. *Nature* **286**: 535-538, 1980.
- 11) Edmondson HA, and Steiner PE: Primary carcinoma of the liver: A study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* **7**: 462-503, 1954.
- 12) Endo Y, et al: Diagnoses of primary liver cancer by demonstrating α -fetoprotein in the serum. *Kanzo* **10**: 143-146, 1969.
- 13) Glasgow JE, Bagdasarian A, et al: Functional alpha 1 protease inhibitor produced by a human hepatoma cell line. *J Lab Clin Med* **99**: 108-117, 1982.

- 14) Heyningen VV, Barron L et al: Monoclonal antibodies to human α -fetoprotein: Analysis of the behaviour of three different antibodies. *J Immun Meth* **50**: 123-131, 1982.
- 15) Higgins PJ, and Borenfreund E: Alpha-fetoprotein and albumin synthesis by heterotransplanted rat liver tumor cells. *Expl Cell Biol* **49**: 68-77, 1982.
- 16) Hirai H, Nishi S, et al: Some chemical, experimental, and clinical investigations of α -fetoprotein. *GANN Monograph on Cancer Research* **14**: 19-34, 1973.
- 17) Huh N, and Utakoji T: Production of HBS-antigen by two new hepatoma cell lines and its enhancement by dexamethasone. *GANN* **72**: 178-179, 1981.
- 18) Ishii M: Radioimmunoassay of α -fetoprotein. *GANN Monography on Cancer Research* **14**: 89-98, 1973.
- 19) Johannessen JV: Electron microscopy in human medicine. Vol. 8, The liver, McGraw-Hill International Book Company, 1979.
- 20) Macnab GM, Alexander JJ, et al: Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line. *Br J Cancer* **34**: 509-515, 1976.
- 21) Nakamura K, et al: Rate-immunonephelometry (Beckman ICS) による Albumin 測定について. *Rinsho-byori* **30**: 300, 1982.
- 22) Nishi S: Isolation and characterization of a human fetal α -globulin from the sera of fetuses and hepatoma patient. *Cancer Research* **30**: 2507-2513, 1972.
- 23) Okamoto E, et al: Observation of long-term cultured human hepatoma cells by the freeze-fracture technique. *J Electron Microsc* **29**: 286, 1980.
- 24) Ruoslahti E, and Engvall E: Immunological crossreaction between α -fetoprotein and albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 4641-4644, 1976.
- 25) Schwartz AL, Fridovich SE, et al: Characterization of asialoglycoprotein receptor in a continuous hepatoma line. *J Biol Chem* **256**: 8878-8881, 1981.
- 26) Sugahara K, Kashii A, et al: Clinical significance of α -fetoprotein especially in the treatment of hepatic cancer. *GANN Monograph on Cancer Research* **14**: 99-105, 1973.
- 27) Tatarinov VS: New data on the embryo-specific antigenic components of human blood serum. *Vopr Med Khim* **10**: 584-589, 1964.
- 28) Tsukada Y, Bishof WKD, et al: Effect of a conjugate of darnomycin and antibodies to rat α -fetoprotein on the growth of α -fetoprotein-producing tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 621-625, 1982.
- 29) Valet JP, Marceau N, et al: Restricted specialization of differentiating hepatocytes in terms of albumin and alpha-fetoprotein production. *Cell Biology International Reports* **5**: 307-314, 1981.