免疫組織染色所見からみた原発性肝癌の癌部と非癌部における アポトーシス発現程度に関する研究

岐阜大学第2外科

高橋 禎 雅 山口 和 也 杉 山 保 幸
宮 喜 一 佐 治 重 豊

Study on Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma between Inside and Outside of Cancer Area Evaluated by Immunohistochemical Stain

Yoshinori TAKAHASHI, Kazuya YAMAGUCHI, Yasuyuki SUGIYAMA,
Kiichi MIYA and Shigetoyo SAJI

Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

原発性肝癌中、TAEによる腫瘍壊死部が比較的軽度で組織学的検索が可能であった43例を対象に、癌部と非癌部においてアポトーシス抑制因子からbcl-2を、誘導因子からBAXとAPOP TAGを用い、その発現程度を免疫組織学的に検索し、臨床病理学的所見、予後および既報⁷⁾のp53、PCNAとの関連を比較検討した。その結果、bcl-2は全例陰性で、BAXは32例(74.41%)が陽性であった。APOP TAG AI値は癌部が非癌部に比べ有意に高く、アルコール過飲歴有り群は癌部・非癌部とも高値を示し、アルコール過飲によりアポトーシスが促進される可能性が示唆された。また、腫瘍最大径が20mm未満群のAI値は以上群に比べ有意に高値で、20mm以上群でAI高値群の予後は低値群に比べ有意に不良であった。以上の結果、ウイルス感染やアルコール過飲が硬変併存率や多中心性発癌と密接に関連し、これらがアポトーシスとの関連で細胞増殖に影響を及ぼす可能性が推察された。

索引用語：アポトーシス (apoptosis), bcl-2, BAX, APOP TAG (TUNEL), 原発性肝癌 (hepatocellular carcinoma)

はじめに

本邦における原発性肝癌(以下本症)の多くはnon-A, non-B型肝炎, HCVが原因ウイルスとして注目され¹⁾, 頻度はHBsに比べ急増傾向にある²⁾。また, 本症は同時性あるいは異時性に多中心性発癌の形態を取る場合が多く, 切除範囲が転移との関連で論議されている³⁾。すなわち, 本症では非癌部でも何らかの遺伝子変異が手術時すでに存在し, 異時性再発は転移よりも多中心性発癌による可能性が高いとの考えである⁴⁾。一方, 近年アポトーシスによる枯死化現象⁵⁾が注目され, 癌は正

常細胞が枯死化現象を失った状態と理解されている。すなわち, 変異型p53が発癌過程でのプロモーションからプログレッションへの移行をアポトーシスとの関連で制御し, 遺伝子の多段階変異への進展をスイッチオンする役割を演じているとの考えである⁶⁾。

この観点から, われわれは教室経験例を対象に癌部と非癌部におけるproliferating cell nuclear antigen (以下, PCNA) と変異型p53蛋白 (以下, p53) の発現程度を免疫組織学的に検索し, 先に報告した⁷⁾。すなわち, HCV陽性肝癌ではPCNA labeling index (以下, LI) が癌部および非癌部で

高値を示し、p53陽性率が癌部で高値を示した、などである。そこで、今回アポトーシス抑制因子から bcl-2⁸⁾を、誘導因子から BAX⁹⁾と APOP TAG¹⁰⁾を用い、その発現程度を免疫組織学的に検索し、臨床病理学的所見、予後および既報⁷⁾の p53、PCNAとの関連を比較検討した。

対象と方法

1. 研究対象

対象は、1989年から8年間に教室で切除した原発性肝癌95例中、transarterial embolization (以下、TAE) による腫瘍壊死部が比較的軽度で、組織学的検索が可能であった43例 (臨床病期; I24例, II15例, III2例, 肉眼的病期; I6例, II26例, III11例, IV0例) である。なお、硬変併存肝癌で TAE非施行の5例と、転移性肝癌5例の計10を対照群として比較検討に用いた。

2. 研究方法

1) 臨床病理学的所見の検索法

原発性肝癌取扱い規約¹¹⁾および全国原発性肝癌追跡調査報告¹²⁾に従い、アルコール過飲歴の有無、ウイルス性肝炎罹患の有無、腫瘍マーカー、腫瘍最大径 (20mm未満の細小肝癌と20mm以上)、被膜形成 (以下、fc) と被膜浸潤 (以下、fc-inf) の有無の6項目につき検討した。

2) 組織標本の作製法

手術時採取したホルマリ固定パラフィン包埋ブロックから既報の方法⁷⁾で癌部と非癌部から4μmの薄層切片を作製し、内因性ペルオキシダーゼ除去後、bcl-2⁸⁾, BAX⁹⁾, APOP TAG¹⁰⁾蛋白の発現程度を免疫組織学的に検索した。

3) 免疫組織染色の方法

bcl-2: 脱パラフィン後マイクロウェーブ処理

して内因性ペルオキシダーゼを不活化後、抗馬血清にてブロッキングし bcl-2 一次抗体 (BOEHRINGER MANNHEIM社製, clone 124) を添加後4℃で1晩反応させた。PBSで洗浄後マウス二次抗体で処理し、3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (以下、DAB) で発色させ、ヘマトキシリンにて核染色し封入・検鏡した (Fig.1a)。

BAX: 内因性ペルオキシダーゼを不活化後、山羊血清にてブロッキングし、BAX一次抗体 (N20, Working dilution 2.0μg/ml) 添加後、抗ウサギ二次抗体を反応させABC法にて染色し、DABにて発色・検鏡した (Fig.1b)。判定は癌部と非癌部での染色性の相対的濃度差から、染色性が高いものを陽性とした。

APOP TAG: 薄層切片をProteinase Kにて蛋白消化後、内因性ペルオキシダーゼを除去して緩衝液処理後、作業用TdT酵素 (S7101) を添加し37℃にて1時間反応させた。反応停止後抗ジギシゲニン・ペルオキシダーゼ処理し、DABにて染色後methyl greenにて発色した (TUNEL染色)。Apoptotic Index (以下、AI) は、細胞核1,000個中の陽性細胞数から算定し陽性率で表示した (Fig.1c)。

4) 統計学的検討の解析法

得られた測定値は、mean±standard deviation (SD) で表示し、Student's t-testにて検定した。また、順位のないカテゴリー変数による分析はχ²二乗検定を用い、累積生存率はKaplan-Meier法にて算出した。いずれも危険率5%未満を統計学的有意差ありと判定した。

Fig. 1 The positive expression of immunohistochemical stain on bcl-2, BAX, and APOP TAG protein

結 果

1. 臨床・病理学的所見の特徴

対象43例中アルコール過飲歴有りが15例、硬変併存が38例、HB陽性者が38例、HCV陽性者が28例（未検8例）であった。

2. アポトーシス関連蛋白の発現程度

1) bcl-2: 陽性細胞は、腫瘍浸潤リンパ球で観察されたが、幹細胞や肝癌細胞にはみられなかった。また、非癌部でも同様に染色陽性細胞は観察されなかった。

2) BAX: 非癌部を染色陽性と判定すると、癌部では32例、74.4%が陽性反応を示した。肝炎ウイルスとの関連で、HB陽性例は陰性例に比べBAXが陽性となる傾向が高く ($p=0.061$)、腫瘍マーカーで、PIVKA2陰性例は陽性例に比べBAXが陽性となる傾向を示した ($p=0.061$)。腫瘍最大径との関連で、BAX陽性例は 31.3 ± 19.3 mmと陰性例の 41.6 ± 18.8 mmに比べ低値であったが、両群間に有意差はみられなかった。病理組織学的所見でfc-inf(-)例は(+)例に比べBAX陽性例が有意に多かったが ($p=0.018$)、他の項目では各群間に有意の関連はみられなかった (Table. 1)。

3) APOP TAG: AI値は、癌部が 34.9 ± 29.3 と非癌部の 11.2 ± 7.7 に比べ有意の高値を示した ($p<0.001$)。また、TAE非施行例のAI値は癌部が 40.3 ± 27.5 と非癌部 (7.9 ± 5.3) に比べ有意の高値を示し ($p=0.0363$)、転移性肝癌例でも癌部 (15.3 ± 19.1) は非癌部 (4.5 ± 3.5) に比べ高値を示したが有意差はみられなかった。なお、癌部ではTAE非施行例が、非癌部ではTAE施行例が最も高いAI値を示し、転移性肝癌症例では癌部・非癌部とも最も低い値を示した (Table. 2)。

3. bcl-2, BAX, APOP TAGとの関連

1) bcl-2染色: 全例染色陰性のため比較検討は不能であった。

2) BAXとAPOP TAG AI値との関連: BAX陽性例のAPOP TAG AI値は 36.2 ± 28.8 と陰性例の 30.9 ± 31.7 に比べ若干高値を示したが有意差はみられなかった (Table. 3a)。

3) アルコール過飲歴との関連: AI値は癌部で過飲歴有り群が 41.3 ± 29.1 と無し群の 31.4 ± 29.3

に比べ若干高値を示し、非癌部では過飲歴有り群 (14.3 ± 9.0) が無し群 (9.5 ± 6.5) に比べ高値を示す傾向がみられた ($p=0.053$, Table. 3b)。

4) 腫瘍最大径との関連: AI値は癌部では腫瘍径が20mm未満で 44.8 ± 30.1 と20mm以上の 30.9 ± 27.3 に比べ若干高値を示し、非癌部では両

Table. 1 The rate of positive expression of BAX protein by immunohistochemical stain according to clinico-pathological findings

		positive	negative	p-
cases		32(74.4%)	11(25.6%)	
alcohol	yes	13	2	
	no	19	9	$p=0.178$
cirrhosis	yes	28	10	
	no	4	1	$p=0.761$
HB	positive	30	8	
	negative	2	3	$p=0.061$
HCV	positive	19	9	
	negative	5	2	$p=0.856$
AFP	positive	18	9	
	negative	13	2	$p=0.158$
PIVKA2	positive	10	7	
	negative	18	3	$p=0.061$
CEA	positive	7	2	
	negative	25	9	$p=0.795$
max.diameter		31.3 ± 19.3	41.6 ± 18.8	$p=0.220$
fc	positive	25	10	
	negative	7	1	$p=0.347$
fc-inf	positive	13	9	
	negative	19	2	$p=0.018$

Table. 2 The comparison of APOP TAG apoptotic index (AI) between in the cancer area and out of cancer area

	in cancer	out of cancer	p-value
cases (n=43)	34.9 ± 29.3	11.2 ± 7.7	$p<0.001$
without TAE (n=5)	40.3 ± 27.5	7.9 ± 5.3	$p=0.0363$
metastatic liver (n=5)	15.3 ± 19.1	4.5 ± 3.5	$p=0.203$

Table. 3 The comparison of APOP TAG apoptotic index (AI) between the cancer area and out of one according to clinicopathological findings

a) between APOP TAG AI and BAX stain

	positive	negative	p-value
BAX	36.2 ± 28.8	30.9 ± 31.7	$p=0.607$

in out of cancer area, all samples showed positive stain

b) between APOP TAG AI and clinico-pathological findings

		in cancer	out of cancer
alcohol	positive	41.3 ± 29.1^a	14.3 ± 9.0^c
	negative	31.4 ± 29.3^b	9.5 ± 6.5^d
diameter < 20mm		44.8 ± 30.1^e	12.8 ± 10.3^f
≥ 20mm		30.9 ± 27.3^g	11.0 ± 4.8^h

a)-b): $p=0.293$, c)-d): $p=0.053$, e)-f): $p=0.203$, g)-h): $p=0.575$

群間に差はみられなかった (Table.3b)。

5) 肉眼的病期進行度との関連: Stageの進行に伴ってAI値は低下し, 各群癌で有意差が観察された (Table.3c)。

4. 予後との関連

AI値が34.8以上を高値 (以下, H) 群, 未満を低値 (以下, L) 群に分けると, H群はL群に比べ有意に予後不良であった ($p=0.007$, Fig. 2)。腫瘍最大径との関連では, 20mm以上群でH群がL群に比べ有意に予後不良であったが ($p=0.046$, Fig. 3a), 未満群でL群に癌死例はなく, H群で比べ予後良好であった (Fig.3b)。

考 察

細胞は外界からの様々な刺激を受け, 増殖, 分

Fig. 2 The comparison of survival curves between the high APOP TAG apoptotic index (AI) (≥ 34.8) and the low AI (< 34.8)

Fig. 3 The comparison of survival curves between the high APOP TAG AI (≥ 34.8) and the low AI (< 34.8) according to maximum tumor diameter

化, 死滅, などの反応が惹起する。この中で細胞死には壊死と枯死が存在するが, 後者は発生過程における形態形成や, 成熟個体における細胞交替, 内分泌系における恒常性の維持, 免疫系の特異性と多様性の成立など, 生命機能維持に不可欠な細胞消去機構として存在している¹³⁾。この枯死化現象は1972年にCurrieら⁵⁾が, 細胞死に関する詳細な病理学的所見から組織内の特定の細胞が壊死とは異なった特徴的な形態変化をきたして散在的に死滅するのをギリシャ語の「木の葉や花びらが離れ落ちる」意からapo (離れる) とptosis (落ちる) を合わせアポトーシス (apoptosis) と名付けた。一方, 壊死 (ネクロシス) は細胞が膨張して細胞膜が破壊され, 細胞内顆粒などの内容物を放出し炎症反応が惹起される受動的な死であるが, アポトーシスでは細胞膜は破壊されずにミトコンドリアなどの細胞内顆粒はそのままに, DNAと核と断片化とアポトーシス小体が形成される。これはマクロファージなどの食食細胞に処理されるため炎症反応が少なく, 高度な制御機構のもとに行われる能動的な自己破壊と考えられている⁵⁾。

ところで, 遺伝子の多段階変異を伴う癌の増殖は, 正常細胞のアポトーシスからの回避現象によると考えられるようになり, プロモーションからプログレッションの過程でp53を介したアポトーシス制御機構の破綻が注目されている。そこで, 著者らは肝炎ビールスを誘因とする原発性肝癌症例で, 癌部と非癌部におけるアポトーシス発現の有無を免疫組織学的に検索し, 多中心性発癌の可能性を推察したわけである。

1. アポトーシス関連蛋白の発現状況

アポトーシス抑制遺伝子であるbcl-2蛋白の発現は、癌部・非癌部とも観察されず、誘導因子であるBAXは、非癌部を全例染色陽性と判定すると癌部では74.4%が陽性であった。臨床病理学的所見では、BAXはHB陽性例、KIVKA2陰性例、腫瘍径が小さく、fc-inf(-)例に頻度が高かった。すなわち、20mm未満の細小肝癌は早期癌に近く、HB陽性例は腫瘍増殖が緩慢¹⁴⁾と推察されているので、かかる症例でBAX陽性例が多かった結果は了解可能と思われる。

ところで、BAXはbcl-2を含むサブファミリーのうち第二ファミリーに属し、ヘテロ二量体を形成してBAX-BAXのホモダイマーを形成することによりアポトーシスを誘導すると考えられている⁹⁾。一方、BAXとbcl-2では二つの共通領域は比較的保たれているが、アミノ酸配列の全体的な相同性が低く、肝、脾、腎などではBAXは広範囲に存在するが、bcl-2は欠如していると考えられている¹⁵⁾。それゆえ、著者らの検索でもbcl-2は肝浸潤リンパ球に僅かに観察されたが、肝細胞や肝癌では染色陰性であったものと考えている。

APOP TAGは、アポトーシスの簡便な検査法としてのTUNEL法でDNA3'-OH末端をbiotin-dUDPとTdTを用いて標識することによって判定可能で¹⁰⁾、今回同様手技で検索した。その結果、AI値はTAE施行の有無に関わらず、また転移性肝癌症例でも癌部が非癌部に比べ高値を示し、その程度は癌部ではTAE非施行例で最高値を、転移性肝癌例で最低値を示した。腺腫の異型度別分類でアポトーシスは、低異型度より高異型度で有意に高く、増殖活性も同様に高異型度群で高値を示す場合が多い¹⁶⁾。この所見は一見矛盾してみえるが、高異型度腺腫では低異型度腺腫に比べDNA障害が頻発し、より多くの細胞がアポトーシスにより排除された結果と考えられる。自験例でもAI値は癌部で高値を示したが、この理由も同様機序によると推察している。一方、TAE非施行例で高値を示した理由は、TAEでは壊死が主体で周辺部の枯死化細胞も3週間以上の手術待機中に貪食・処理され、結果的にTAE群でAI値が低かったと推察している。また、TAEによる影響は今回の腫瘍周辺部

での検索では無視可能と思われた。

2. 各種アポトーシス関連因子での検索結果

まず、BAXとAPOP TAGとの関連で、BAX陽性例のAI値は陰性例に比べ若干高値を示したが有意差はみられなかった。アルコール過飲歴との関連では過飲歴有り群のAI値は癌部で若干高く非癌部で高値を示す傾向がみられたが、腫瘍径別でAI値は癌部で20mm未満群が以上群に比べ若干高値を示した。肉眼的病期ではAI値はStage Iが最も高く、Stage IIIが最も低かった。予後は、AI高値群が低値群に比べ、腫瘍最大径が20mm以上群ではAI高値群が低値群に比べ共に有意に不良であった。この結果から、細小肝癌やStageの低い例でアポトーシスの頻度が高く、アルコール過飲は非癌部でのアポトーシスを促進する可能性が示唆された。後者はアルコールがDNA障害を促進し、結果的にアポトーシスに陥る細胞を増加させた可能性と、非癌部での多段階変異をアルコールが抑制した可能性が推察される¹⁷⁾。そこで、先に報告⁷⁾したPCNA AI値、p53陽性率とアポトーシスとの関連を検討した。その結果、BAX陽性群のPCNA LI値は陰性群に比べ低値で、APOP TAG AI値とLI値は有意の逆相関を示し、AI高値例ではLI値が低値を示し細胞増殖能が抑制されている可能性が示唆された(Fig. 4)。一方、アルコール過飲歴との関連では、過飲歴有り群のLI値は癌部、非癌部とも有意に低値で、AI値はともに高値を示し、とくに非癌部で有意差がみられた。この結果は、ア

Fig. 4 Correlation between PCNA labeling index and APOP TAG apoptotic index of the patients with hepatocellular carcinoma.

アルコール過飲により肝細胞の増殖活性が低下し、アポトーシスを誘導する可能性が示唆されたわけである。また、非癌部でその傾向が強かったことより、硬変併存肝癌例での術後アルコール過飲は、アポトーシスを促進することにより増殖活性を低下させ、残肝の遺伝子変異を抑制して多発癌の発生を防止できる可能性が示唆されたが、同様所見の報告はない。

変異型p53は、BAX陰性例で陽性となる傾向が示唆されたが、AI値はp53陽性例と陰性例の間に差はみられなかった (Table. 4)。すなわち、p53陽性肝癌はBAX染色が陰性で、BAX陰性例ではAI値が高く、AI値が低値を示す傾向がみられた。以上の結果、BAX陰性例ではp53によるアポトーシスの誘導が抑制され、細胞増殖活性が亢進したと推察されたが、p53によるアポトーシス誘導はBAXのみによるものではなく、BAX欠損マウスでも γ 線照射によりアポトーシスが発生することより¹⁸⁾、アルコール過飲とアポトーシスとの関連は複雑と思われる。

3. 予後との関連について

AI高値群の生存曲線は低値群に比べ有意に不良で、高頻度アポトーシス群は逆に細胞増殖が高く、DNA障害の頻度も高く、結果的に予後不良になったと推察された。また、20mm以上の肝癌ではAI高値群の予後は低値群に比べ有意に不良であったが、20mm未満の細小肝癌ではAI値と予後との間に有意の関連はみられなかった。肝癌の進行

に伴いAI値が増加する一見矛盾した現象は、癌遺伝子変異のみならず宿主由来の様々な抑制因子が複雑に関与している可能性が推察される。それゆえ、原発性肝癌の切除標本を用いたPCNA, p53, bcl-2, BAX, APOB TAGの検索は、癌の悪性度や残肝再発の予測に有用ではあるが、各病期により様々な反応を示すため、結果の判読には注意を要するものと思われた。

結 語

1989年から8年間の間に肝切除した原発性肝癌中、TAEによる腫瘍壊死部が比較的軽度で組織学的検索が可能であった43例を対象に、癌部と非癌部でbcl-2, BAX, APOB, TAG蛋白の発現程度を免疫組織学的に検索し、臨床病理学的所見や予後との関連を比較検討した。

その結果、bcl-2は全例陰性で、BAXは32例 (74.41%) が陽性であった。APOB TAG AI値は癌部が非癌部に比べ有意に高く、アルコール過飲歴有り群は癌部・非癌部とも高値を示し、アルコール過飲によりアポトーシスが促進される可能性が示唆された。また、腫瘍最大径が20mm未満群のAI値は以上群に比べ有意に高値で、20mm以上群でAI高値群の予後は低値群に比べ有意に不良であった。

以上の結果、ウイルス感染やアルコール過飲が硬変併存率や多中心性発癌と密接に関連し、これらがアポトーシスとの関連で細胞増殖に影響を及ぼす可能性が推察された。

参考文献

- 1) 小俣政男：日本の肝癌。外科治療73：487-492, 1995
- 2) Takano S, Yokosuka O, Imazeki F, et al: Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: A prospective study of 251 patients. Hepatology 21: 650-655, 1995
- 3) 小菅智男, 高山忠利, 山本順司他：肝切除後の残肝再発。外科57：1306-0309, 1995
- 4) Belghiti J, Panis Y, Farges O, et al: Intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis. Ann

Table. 4 Relationship between apoptotic activity evaluated by BAX and APOB TAG AI and the activity of cancer proliferation by PCNA LI and p53 using immunohisto chemical stain

a) BAX and cancer proliferation		positive BAX	negative BAX	
PCNA LI		75.3 $\pm$ 16.9	86.2 $\pm$ 12.0	p=0.057
p53 positive	7		5	
negative	25		6	p=0.133
b) APOB TAG AI and cancer proliferation in the cancer area				
	positive p53	negative p53		
AI value	33.2 $\pm$ 29.4	35.5 $\pm$ 29.7		p=0.819
	high PCNA	low PCNA		
AI value	28.7 $\pm$ 27.4	45.1 $\pm$ 30.3		p=0.077
c) APOB TAG AI and cancer proliferation in out of cancer area				
	high PCNA	low PCNA		
AI value	9.6 $\pm$ 5.6	14.0 $\pm$ 10.0		p=0.069

- Surg 214: 114-117, 1991
- 5) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
 - 6) Vogelstein B, Kinzler KW: p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 523-526, 1992
 - 7) 高橋禎雅, 若原正幸, 梅本敬夫他: PCNAと変異型p53の免疫組織学的所見からみた原発性肝癌における癌部と非癌部の特徴について. *日外科系連会誌* 23: 795-802, 1998
 - 8) Tsujimoto Y, Croce CM: Analysis of the structure, transcripts, and protein products of Bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5214-5218, 1986
 - 9) Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ: Bcl-2 Heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619, 1993
 - 10) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
 - 11) 日本肝癌研究会: 原発性肝癌取り扱い規約, 改訂第3版. 東京, 金原出版, 1992, p16-39
 - 12) 日本肝癌研究会: 原発性肝癌に関する追跡調査—第11報—. *肝臓*, 36: 208-218, 1995
 - 13) Williams GT, Smith CA: Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* 74: 777-779, 1993
 - 14) Oka H, Kurioka N, Kanno T, et al: Prospective study of early detection of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Hepatology* 12: 680-687, 1990
 - 15) Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, et al: Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* 145: 1323-1336, 1994
 - 16) Arai T, Kino I: Role of apoptosis in modulation of the growth of human colorectal tubular and villous adenomas. *J Pathol* 176: 37-44, 1995
 - 17) Yamauchi M, Nakahara M, Maezawa Y, et al: Prevalence of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis and prior exposure to hepatitis C. *Am J Gastroenterology* 88: 39-43, 1993
 - 18) Kundson CM, Tung KSK, Tourtellotte WG, et al: Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 270: 96-99, 1995