

간세포암종에 동반된 거대 재생결절의 클론성에 관한 연구

연세대학교 의과대학 병리학교실 및 외과학교실*

박 철·전 봉 균·이 우 정*
박 영 년·김 호 근·박 찬 일

Clonality of Large Regenerative Nodule Accompanied by Hepatocellular Carcinoma

Zhe Piao, M.D., Bong Kyun Chun, M.D., Woo Jung Lee, M.D.*
Young Nyun Park, M.D., Hoguen Kim, M.D. and Chanil Park, M.D.

Departments of Pathology and Surgery*, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

In order to clarify the preneoplastic nature of large regenerative nodules without dysplastic change, we analysed the clonality of hepatocellular carcinomas (HCCs) and large nodules, diameter ≥ 0.5 cm, of cirrhotic liver by X-linked human androgen receptor (HUMARA) gene assay, using the principle of random X chromosome methylation and inactivation in female. Ten cases of HCC and 5 cases of large nodules without dysplasia from 9 female patients were selected. All the tumors, large nodules and paired normal control cells were selectively micro-dissected from deparaffinized hematoxylin and eosin stained slides. Genomic DNA was isolated and digested with HhaI. Polymerase chain reaction(PCR) amplification of the HUMARA locus was performed using ^{32}P - α -dCTP containing PCR mixtures. The PCR amplified products were separated by gel electrophoresis and analysed by autoradiography. Nine HCCs from 8 patients were monoclonal and 1 case was polyclonal and the remaining 1 case was not polymorphic at the HUMARA locus. The HCC case which showed polyclonality contained many inflammatory cells. All the large nodules were polyclonal by HUMARA assay. These results suggest that all or most of the cells composing the large regenerative nodules without dysplasia are polyclonal. This assay may be informative for the differentiation between regenerative and preneoplastic nodules in cirrhotic liver and the size of nodule may be not important in hepatocarcinogenesis. (Korean J Pathol 1997; 31: 884~890)

Key Words: Hepatocellular carcinoma, Liver, Cirrhosis, Large regenerative nodule, Clonality

접 수: 1996년 7월 10일, 게재승인: 1997년 8월 5일

주 소: 서울시 서대문구 신촌동 134, 우편번호 120-752

연세대학교 의과대학 병리학교실, 박찬일

ISSN : 0379-1149

본 연구는 연세대학교 의과대학 1995년도 교수연구비로 이루어졌음.

서 론

악성종양의 클론성에 관한 연구는 종양의 발생원인 및 형성과정을 밝히기 위해 선행되어야 할 중요한 과제이다. 세포의 악성전환이 DNA 돌연변이나 염색체 재배열과 같은 드물게 일어나는 유전적 사건에 의해 발생한다는 것이 사실이라면 전환된 세포의 증식에 의한 종괴형성은 단클론성이어야 한다는 가설이 성립된다. 이와 관련하여 악성 림프종, 백혈병 및 여러 암종이 단클론성임이 증명된 바 있다¹⁻³.

간경변증은 그 원인에 따라 간세포암종 (hepatocellular carcinoma, HCC)으로 진행되는 빈도에 차이가 있지만 HCC와 밀접한 연관을 갖는다는 것은 잘 알려진 사실이며, 특히 B형 간염바이러스 (hepatitis B virus, HBV)에 의한 간경변증의 경우 HCC의 발생률이 45%에 이른다. 이것은 증식성 간세포암종 수를 여러가지 발암인자에 의한 유전자 변이가 일어나기 쉽기 때문으로 여겨진다⁴. 최근 간경변증 결절의 0.5%~43%가 단클론성으로 보고된 바 있으며⁵⁻⁷, 또한 거대 증식성 결절 (macroregenerative nodule, MRN) 또는 선종성 증식 (adenomatous hyperplasia, AH)중 일부에서 HCC로 진행되는⁸⁻¹¹ 것이 밝혀짐에 따라 간경변증의 재생결절 중 유난히 큰 결절에 대한 관심이 높아지고 있다.

따라서 본 연구에서는 X염색체상에 존재하는 human androgen receptor gene (HUMARA)의 short tandem repeat (STR)에 다형성 (polymorphism)이 있고 여성에 존재하는 2개의 X 염색체들 중 하나가 배아기에 무작위로 비활성화된다는 사실^{12,13}을 이용하여 HCC와 장경 0.5 cm 이상의 거대 재생결절 (large regenerative nodule)에 대한 클론성을 조사하여 HCC의 발생과정을 규명해 보고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구대상

연구재료로는 1990년 1월부터 1994년 12월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원에서 HCC의 진단하에 간 부분절제술이 시행된 46명의 환자 중 10명의 여성 환자로부터 얻은 간조직을 1차 대상으로 하였다. 각 예를 육안적으로 관찰하여 HCC 주변 간 조직에 간경변증이나 MRN 또는 기타 결절성 병변이 존재하는 지를 검색하였으며, 직경 0.5 cm 이상의 결절과 HCC조직 및 주위 간조직의 일부를 채취

하였다.

2. 병변의 조직학적 분류

연구대상 전례의 파라핀 포매 간조직을 4 μ m 두께로 박절한 후 hematoxylin-eosin (H-E)염색 및 trichrome 염색을 하여 3명의 소화기병리의사가 간경변증의 유무, 결절의 세포학적 및 구조적 이형성 유무, 그리고 HCC의 병리학적 분화도에 관하여 검색하였다.

3. DNA 추출

각 예의 파라핀 블록으로부터 6 μ m 두께의 절편을 만들어 H-E 염색을 시행한 후 graded alcohol로 함수하였다. 이후 덮개유리 없이 건조시킨 후 광학현미경으로 검색하여 병변을 정확하게 분리 표시하였으며, 조직학적 검사상 각 병변마다 염증세포의 침윤이 적은 부위를 선택하였다. Microdissection method¹⁴로 병변부위 조직을 채취하여 400 μ l의 xylene에서 15분간 파라핀을 제거하고 10,000 g로 2분간 원심분리한 후 xylene을 제거하였다. 남은 조직을 58°C에 15분간 방치하여 xylene을 완전히 제거하였고 0.5M tris (pH 8.9), 20 mM EDTA, 10 mM sodium chloride, 0.5 mg/ml proteinase K 및 1% SDS가 함유된 완충액에 넣어 하룻밤 동안 58°C에 둔 다음 100°C의 온수조에서 10분간 끓인 후 실온에서 phenol-chloroform으로 DNA를 분리하였다¹⁵. 분리한 DNA를 ethanol로 침전시킨 다음 3 mM tris (pH 7.5)와 0.3 mM EDTA가 함유된 완충액 30 μ l에 실험시작까지 녹인 후 spectrophotometer로 양을 측정하고 보관하였다.

4. DNA 전처리

제한효소로 처리하지 않은 DNA를 대조실험에 사용하였다. 나머지 DNA는 1~3시간동안 제한효소 HhaI 20U가 함유된 buffer로 처리한 후 phenol-chloroform으로 추출하고 ethanol로 침전시켰다.

5. 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용한 클론성 결정

각 병변의 클론성을 검사하기 위하여는 X염색체상에 존재하는 HUMARA의 STR이 있다는 사실을 이용하여 이부위를 DNA합성대상으로 정하였다. HUMARA STR 부위의 DNA 합성을 위해서는 용해된 대조 DNA와 HhaI 제한효소로 처리한 DNA 각 20 μ g를 template로 하여 primer AR-a (5'-CCGAGGAGCTTT-CCAGAATC3') 및 AR-b (5'-TACGATGGGCTTGGG-GAGAA3')¹⁶와 함께 50 μ l의 PCR reaction mixture

Table 1. Clinicopathological findings of the 10 female patients with hepatocellular carcinoma

Case No.	Age	HBsAg	anti-HCV	E-S grade of HCC	Liver Cirrhosis	No. of Large Nodule (diameter $\geq$ 0.5 cm)	Nodule Size(cm)
1	53	+	ND	3	+	1	1.2
2	43	-	-	2	-	0	-
3	56	+	ND	2	+	1	0.7
4	52	-	ND	3	-	0	-
5	56	+	ND	2	+	2	0.6, 0.7
6	55	+	ND	1	+	0	-
7	36	+	ND	2	+	1	0.6
8	63	+	+	4	+	0	-
9	75	-	+	2	+	0	-
10	62	+	-	1	+	0	-

HBsAg: hepatitis B virus surface antigen, HCC: hepatocellular carcinoma, HCV: hepatitis C virus, E-S: Edmondson-Steiner, ND; not done

(10 mmol/L tris, pH 8.4; 50 mmol/L KCL; 20 μ g/ml gelatin; 1.5 mmol/L $MgCl_2$; oligonucleotide primer 0.3 μ mol/L; 0.2 mmol/L dATP; 0.2 mmol/L dGTP; 0.05 mmol/L dCTP; 0.2 mmol/L TTP)를 만들고 최종농도 60 nmol/L의 [^{32}P]dCTP 1800 Ci/mmol을 reaction mixture에 섞었다. Taq 중합효소 (BRL)를 섞기 전에 97°C에서 5분간 hot start preheat를 시행하고, 85°C에서 10분간 보관한 후 1.25U Taq 중합효소를 첨가하였다. Denaturation을 지속시키기 위해 95°C×4분, 55°C×45초, 72°C×90초로 3 cycle 반응시킨 후 95°C×30초, 55°C×45초, 72°C×90초로 29 cycle 반응시키고, 마지막으로 72°C에서 7분 동안 반응을 연장시켰다. 합성한 DNA를 600~900V로 8% denaturing polyacrylamide gel에 전기영동하여 분리한 후 이를 필름에 노출시켜 합성한 DNA의 크기를 검사하였다¹⁴.

연구 결과

1. 연구대상 환자의 특성

연구대상으로 선택된 환자 10명은 모두 여성으로서 평균연령이 51.1세였다. 연구대상 중 HBV 감염이 있었던 7예에는 모두 대결절형 간경변증이 동반되었다. HBV 감염의 증거가 없는 3예 중에서는 2예만 간경변증 소견을 보였다. 직경 0.5 cm 이상의 거대 재생결절은 4명의 간경변증 환자로부터 채취된 5개였으며, 이들은 모두 육안소견상 주위 결절과 비슷한 특성을 보였으며, 세포학적 및 구조적인 이형성을

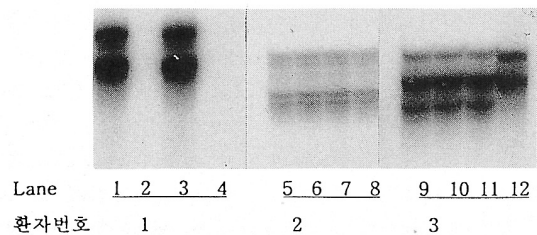


Fig. 1. HCC 및 간경변증 거대 재생결절의 클론성 검사. 각 예마다 환자의 정상 및 종양조직에서 DNA를 추출하였다. 첫번째 환자는 남자환자로서 1번 lane은 정상조직으로부터, 3번 lane은 종양조직으로부터 PCR로 합성한 DNA이고, 2번 lane은 정상에서 분리한 DNA를 HhaI로 자른 후 PCR로 합성한 DNA이며, 4번 lane은 종양에서 분리한 DNA를 PCR로 합성한 DNA인데 남자환자이기 때문에 2번 및 4번 lane에 PCR 합성물이 없었다. 두번째 환자의 5번 lane은 정상조직으로부터, 7번 lane은 거대 결절로부터 PCR로 합성한 DNA이고, 6번 lane은 정상 DNA를, 8번 lane은 거대 결절에서 분리한 DNA를 HhaI로 자른 후 PCR로 합성한 DNA인데 5, 6, 7, 8 lane 모두 두 종류의 합성 DNA가 관찰되어 다클론성임을 알 수 있다. 세번째 환자는 여자환자로서 9번 lane은 정상조직으로부터, 11번조직은 HCC조직으로부터 PCR로 합성한 DNA이고, 10번 lane은 정상 DNA를, 12번 lane은 HCC에서 분리한 DNA를 HhaI로 자른 후 PCR로 합성한 DNA인데 9, 10, 11 lane에는 2종류의 합성 DNA가 있으나 12번 lane에는 한개의 합성 DNA만 관찰되어 분리한 HCC조직이 단클론성임을 알 수 있다.

보이는 예는 없었다. HCC의 분화정도는 Edmondson-Steiner 등급 1인 것이 2예, 2인 것이 5예, 3 및 4인 것이 각각 2예 및 1예였다 (Table 1).

Table 2. Result of clonality study

Case No.	Clonality	
	HCC	Large nodule of cirrhotic liver (diameter ≥ 0.5 cm)
1	M	P
2	H	—
3	P	P
4	M	—
5	M	P, P
6	M	—
7	M	P
8	M	—
9	M	—
10	M	—

M: monoclonal P: polyclonal H: homozygous

2. HCC와 간경변증 거대 결절의 클론성

연구재료 및 방법에서 기술한 방법으로 HCC의 클론성을 검사한 결과 대상환자 10명 중 9명의 HUMARA 유전자 STR에 다형성이 존재하였다. HCC에서는 9명의 환자 중 8예에서 단클론성이 증명되었고, 1예의 HCC는 다클론성이었다. 간경변증환자 4명에서 채취된 5예의 거대 재생결절은 모두 다클론성이었다 (Fig. 1 및 Table 2).

고 찰

조직의 클론성을 알아내는 방법으로는 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) isoenzyme을 분석하는 방법¹⁷, DNA 재배열을 조사하는 방법^{18,19}, 종양세포 내에 삽입된 Epstein-Barr virus (EBV)와 같은 바이러스 유전자를 조사하는 방법²⁰⁻²², 그리고 restriction fragment length의 DNA에 다형성이 있는지를 조사하는 방법²³이 있다. G6PD isoenzyme을 조사하는 방법은 백혈병, 림프종, 자궁근종, 신경섬유종증 등에서 이용된 바 있으나 많은 종족에서 여성의 G6PD isoenzyme 이형접합체가 드물다는 제한이 있고, 면역글로불린이나 T림프구 수용체의 유전자 재배열을 조사하는 방법도 백혈병 및 림프종의 클론성을 알아내기에는 유용하지만 다른 종양에는 적용할 수 없으며, EBV 유전자를 찾는 방법도 EBV와 연관된 종양에서만 쓰일 수 있다는 한계가 있어, X염색체상

에 존재하는 유전자들의 다형성을 사용하는 방법이 가장 손쉽고 객관적인 결과를 얻을 수 있다고 알려져 있다²³.

본 연구에서 사용한 방법은 최근에 알려진 HUMARA 유전자의 STR을 이용한 것인데 최근에는 X염색체 상에 있는 HUMARA에 다형성 STR이 있음이 밝혀졌고²⁴, 이 부위는 기존에 사용되었던 HPRT와는 달리 이형접합체 빈도가 약 90%인 것으로 알려져²⁵, 보다 많은 종류와 수의 종양을 대상으로 클론성 연구를 할 수 있게 되었으며, 이는 본 연구에서도 확인되었다.

현재까지 X 염색체의 무작위 비활성화를 이용하여 클론성을 분석한 결과를 보면 대장선암종 및 선종은 단클론성이지만 가족성 선종성 용종증의 각 선종은 서로 다른 클론으로 구성되어 증명된 바 있고²⁶, 부갑상선종, 유방암종, 유방유두종, 자궁내막암종, 자궁경부암종 및 난소의 상피성 종양도 모두 단클론성이라고 보고되는²⁷⁻³⁰ 등 각종 종양의 단클론성 규명에 관한 연구는 비교적 활발하다. 이에 반해 HCC와 간암발생 이전의 간세포증식성 병변들을 대상으로 한 클론성 연구로는 간세포에 삽입된 HBV DNA의 양상을 이용한 보고가 있을 뿐³¹ X 염색체를 이용한 본격적인 클론성 연구가 드물다. 1995년 Kawai등³²은 27예의 간암조직을 대상으로 X 염색체와 연관된 phosphoglycerate kinase (PGK) 유전자 부위를 이용하여 클론성을 조사한 결과 11예에서 이형접합체를 발견하였고 이들 중 9예가 단클론성임을 밝혔다. 본 연구에서는 HUMARA 유전자를 이용한 결과 10예 중 9예에서 이형접합체를 확인하였고, 이형접합체가 확인된 9예 중 8예의 HCC가 단클론성임을 밝혔다. 이러한 결과를 통하여 HUMARA 유전자는 이형접합체의 빈도가 매우 높기 때문에 클론성 검사를 위해 적합한 유전자임을 알 수 있었고, HCC 역시 다른 악성종양과 마찬가지로 단클론성임을 증명할 수 있었다. 본 실험에서는 1예의 HCC가 다클론성으로 나타냈는데 종괴를 현미경으로 재검토한 결과 많은 수의 염증세포가 존재하였던 것으로 보아 침윤된 염증세포들 때문에 다클론성을 보였던 것으로 생각하였다.

간경변증 환자에서는 HCC의 발생률이 높으므로⁴ 간경변증에서 발생한 비교적 큰 크기의 결절들은 간암발생과정에서 중요한 역할을 할것으로 기대된다. 이러한 결절에는 MRN 또는 AH라고 불리우는 병변⁸⁻¹¹과 거대 재생결절^{33,34}이 포함된다.

MRN 중 세포학적 및 구조학적 비정형성이 있는 제 II형에서는 결절이 HCC병소를 내포하는 경우가

드물지 않으며^{10,11}, 세포증식능³⁵⁻³⁸ 및 DNA 비배수성의 빈도³⁹가 높아 전암병변의 특성이 인정되고 있다. 그러나 비정형성이 없는 제 I형에서는 이러한 특성이 없기 때문에 그 생물학적 특성이 모호한 부분이 없지 않으며¹⁰ 또한 거대 재생결절과의 감별이 어려운 경우도 보고되어 있다^{11,40}. 거대 재생결절은 아직 그 확실한 발생기전은 밝혀져 있지 않으나, 간경변증 결절들 중 장경 0.5 cm 이상의 큰 결절을 지칭한다³³. HBV에 의한 간경변증 결절의 0.5%~31%가^{5,6}, 그리고 HCV에 의해 발생한 간경변증 결절의 43%가 단클론성이며, 단클론과 다클론성 결절 사이에 병리조직학적 차이가 없다는 보고를 고려하면⁷ 간경변증, 특히 HCC가 발생한 간경변증의 거대 재생결절에 대한 클론성 검사는 HCC 초기의 간암발생과정을 이해하는데 도움이 될 것으로 보인다. 본 연구에서는 HCC주변에 있는 간경변증 재생결절 중 장경 0.5 cm 이상인 5개의 거대 재생결절에 대하여 조사하였는데, 이들 결절에는 이형성이 없었으며 모두 다클론성이었다. 이와 같은 소견은 간의 거대 재생결절이 방사선학적 추적 관찰 중 소실될 수 있다는 보고⁴⁰를 설명해 줄 수 있는 소견으로 생각한다. 간경변증에서 발견되는 거대 재생결절들 중 이형성이 없는 것은 대부분 다클론성의 증식성 병변임을 알 수 있으며, 따라서 결절의 크기는 HCC발생의 전암성 여부를 결정하는 데 중요하지 않을 것으로 생각한다.

결 론

HCC와 직경 0.5 cm 이상되는 간경변성 거대 재생결절의 클론성을 조사함으로써 이형성변화가 없는 거대 재생결절이 HCC의 전암성 변화인지 여부를 알아보기 위해 여성에서 한개의 X염색체가 methylation되어 비활성화된다는 사실과 X 염색체상에 존재하는 HUMARA 유전자의 STR에 다형성이 있다는 사실을 이용하여 클론성을 검사하였다. 그 결과 HCC 9예중 8예는 단클론성이었으나 거대 재생결절 5예는 모두 다클론성임을 확인하였다. 이러한 결과로 보아 간경변증에서 발견되는 거대 재생결절들 중 이형성이 없는 것은 다클론성의 증식성 병변이며, 재생결절의 크기는 HCC발생의 전암성 여부를 결정하는데 중요하지 않을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Linder D, Gartler SM. Glucose 6-phosphate dehydrogenase mosaicism: Utilization as a cell marker in the study of leiomyoma. *Science* 1965; 150: 67-8.
2. Atkin NB, Baker MC. Chromosome abnormality as primary events in human malignant disease: Evidence from marker chromosome. *J Natl Cancer Inst* 1966; 36: 539-51.
3. Korsmeyer SJ, Arnold A, Bakhshi A, et al. Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemia of T cell and B cell precursor origins. *J Clin Invest* 1983; 71: 301-13.
4. Craddock VM. Cell proliferation and induction of liver cancer. In : Remmer H, Bolt HM, Bannasch P, Popper H, eds. *Primary liver tumors*. Lancaster : MTP Press, 1978; 19: 377-83.
5. Aoki N, Robinson WS. States of B viral genomes in cirrhotic and hepatocellular carcinoma nodules. *Mol Biol Med* 1989; 6: 395-408.
6. Yasui H, Hino O, Ohtake K, Machinami R, Kitagawa T. Clonal growth of hepatitis B virus-integrated hepatocytes in cirrhotic liver nodules. *Cancer Res* 1992; 52: 6810-4.
7. Aihara T, Noguchi S, Sasaki Y, Nakano H, Imaoka S. Clonal analysis of regenerative nodules in hepatitis C virus induced liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 107: 1805-11.
8. Furuya K, Nakamura M, Yamamoto Y, Toge K, Otsuka H. Macroregenerative nodules of the liver. *Cancer* 1988; 61: 99-105.
9. Eguchi A, Nakamura O, Okudaira S, Sugihara S, Kojiro M. Adenomatous hyperplasia in vicinity of small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1992; 15: 843-8.
10. Theise N. Macroregenerative (dysplastic) nodules and hepatocarcinogenesis: theoretical and clinical considerations. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 360-71.
11. Hytioglou P, Theise ND, Schwartz M, Mor E, Miller C, Thurg SN. Macroregenerative nodules in a series of adult cirrhotic liver explants : Issues of classification and nomenclature. *Hepatology* 1995; 21: 703-8.
12. Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev* 1972; 47: 1-35.
13. Lyon MF. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene expres-

- sion. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1989; 36: 119-30.
14. Jen J, Kim H, Piantadosi S, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 213-21.
15. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 130: 118-26.
16. Mutter GL, Boynton KA. PCR bias in amplification of androgen receptor alleles, a trinucleotide repeat marker used in clonality studies. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 1411-8.
17. Raskind WH, Fialkow PJ. The use of cell markers in the study of human hematopoietic neoplasia. *Adv Cancer Res* 1987; 49: 127-67.
18. Crossman J, Uppenkamp M, Sundeen J, Coupland R, Raffeld M. Molecular genetics and the diagnosis of lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 117-27.
19. Knowles DM. Immunophenotypic and antigen receptor gene rearrangement analysis in T cell neoplasm. *Am J Pathol* 1989; 134: 761-85.
20. Katz BZ, Raab-Traub N, Miller G. Latent and replicating forms of Epstein-Barr virus DNA in lymphomas and lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 1989; 160: 589-97.
21. Gulley ML, Raphael M, Lutz CT, Ross DW, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus integration in human lymphomas and lymphoid cell lines. *Cancer* 1992; 70: 185-91.
22. Gutierrez MI, Bhatia K, Magrath I. Replicative viral DNA in Epstein-Barr virus associated Burkitt's lymphoma biopsies. *Leuk Res* 1993; 17: 285-9.
23. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Feinberg AP. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science* 1985; 27: 642-5.
24. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation of five in four human population groups. *Genomics* 1992; 12: 241-53.
25. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII & HpaI site near the polymorphic CAG repeat in the human androgen receptor gene correlates with X chromogen inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1229-39.
26. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987; 238: 193-7.
27. Arnold A, Staunton CE, Kim HG, Gaz RD, Kronenberg HM. Monoclonality and abnormal parathyroid hormone genes in parathyroid adenoma. *N Engl J Med* 1988; 318: 658-62.
28. Noguchi S, Motomura K, Inagi H, Imaoka S, Koyama H. Clonal analysis of human breast cancer by means of the polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1992; 52: 6594-7.
29. Noguchi S, Motomura K, Inagi H, Imaoka S, Koyama H. Clonal analysis of solitary intraductal papilloma of the breast by means of polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1994; 144: 1320-5.
30. Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Nomura T, Shroyer K. Analysis of clonality by amplification of short tandem repeats: carcinomas of female reproductive tract. *Diagn Mol Pathol* 1994; 3: 292-7.
31. Tsuda H, Hirohashi S, Shimozato Y, Terada M, Hasegawa H. Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1988; 95: 1664-8.
32. Kawai S, Imazeti F, Yokosuka O, et al. Clonality in hepatocellular carcinoma : Analysis of methylation pattern of polymorphic X-chromosome-linked phosphoglycerate kinase gene in females. *Hepatology* 1995; 22: 112-7.
33. International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1995; 22: 983-93.
34. Wada K, Kondo Y, Kondo F. Large regenerative nodules and dysplastic nodules in cirrhotic livers : a histopathologic study. *Hepatology* 1988; 8: 1684-8.
35. Grigioni W, D'Errico A, Bacci F, et al. Primary liver neoplasms: evaluation of proliferative index using MoAb Ki67. *J Pathol* 1989; 158: 23-9.
36. Terasaki S, Terada T, Nakanuma Y, Nonomura A, Unoura M, Kobayashi K. Argyrophilic nuclear organizer regions and alpha-fetoprotein in adenomatous hyperplasia in human cirrhotic livers. *Am J Clin Pathol* 1991; 95: 850-7.
37. Terada T, Nakanuma Y. Cell proliferative activity of adenomatous hyperplasia in the liver and small hepatocellular carcinoma : An immunohistochemical study demonstrating proliferating cell nuclear antigen. *Cancer* 1992; 70: 591-8.
38. Bail BL, Belleannee G, Bernard P-H, Saric F, Balabaud C. Adenomatous hyperplasia in cirrhotic livers : histological evaluation, cellular density and proliferative activity of 35 lesions in the cirrhotic explants of 10 adult French patients. *Hum Pathol* 1995; 26: 897-906.
39. Orsatti G, Theise ND, Thung SN, Paronetto F. DNA image cytometric analysis of macroregenerative nodule (adenomatous hyperplasia) of the liver : evidence

- in support of their preneoplastic nature. Hepatology 1993; 17: 621-7.
40. Kondo F, Ebara M, Sugiura N, et al. Histological features and clinical course of large regenerative nodules: evaluation of their precancerous potentiality. Hepatology 1990; 12: 592-8.
-