O-Serine および N-Asparagine 結合側鎖糖に 特異性を有する 2 種類の脱シアル化 hCG の 測定法の開発とその臨床応用

長崎大学医学部産婦人科学教室

(主任: 山辺 徹 教授)

今 村 定 臣

Development of Two Assay Systems of Desialylated hCG Specific for O-Serine or N-Asparagine Linked Carbohydrate Chain and Their Clinical Application

Sadaomi IMAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology,

Nagasaki University School of Medicine,

Nagasaki, Japan

(Director: Professor Tooru Yamabe)

Two specific and sensitive assays have been developed for the measurement of as-hCG in this study. These assay systems are immunoradiometric assays which utilize peanut lectin, *Arachis hypogaea* (PNA) or castor bean lectin, *Ricin communis* agglutinin (RCA-I), to selectively extract as-hCG and then directly quantify with purified and radiolabeled antiserum against hCG β COOH terminal peptide (β -CTP). PNA is highly specific for the terminal carbohydrate linkage Gal β -(1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc which is only exposed in hCG when the O-serine linked oligosaccharide of its unique β -CTP region are desialylated. RCA-I is also specific for the terminal carbohydrate β -D-Galp., especially the linkage of Gal β -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc, which is exposed in hCG when the N-asparagine linked oligosaccharide of its α and β subunits are desialylated. The assays (PNA-R525 and RCA-I-R525) are capable of reliably and accurately measuring as little as 0.01 and 0.002 pmoles as-hCG/ml without interference from hCG, respectively (crosreactivity: 0.1% and 0.03%).

The urine concentrates of a patient with choriocarcinoma and a normal pregnant woman were fractionated by Sephadex G-100 gel filtration and total hCG and as-hCG levels were measured. When the fractions were analysed by β -CTP RIA, there were two peaks of immunoreactive hCG in the urine of a patient with choriocarcinoma. The bigger molecular fractions were hCG of native size, and 16% of which was desialylated. The smaller molecular fraction was β -CTP, and practically all of that was desialylated. Whereas, β -CTP could not be observed, and only 1.5% of hCG of native size was desialylated in the urine of a normal pregnant woman.

Although the absolute levels of as-hCG in the urine specimens increased as total hCG increased, the proportion of as-hCG decreased as total hCG concentration increased. The proportion of as-hCG in urine specimens from choriocarcinoma patients was higher than specimens from patients with hydatidiform mole (including invasive mole) in both these lectin immunoradiometric assay (LIRMA) systems. Also, the proportion of as-hCG in urine specimens from molar patients was higher than those from normal pregnant women using PNA as extracting reagent. Whereas, when RCA-I was used, there was no significant difference between specimens from molar patients and those from normal pregnant women. These results indicate that using PNA-R525, it may be possible to discriminate between patients with choriocarcinoma and hydatidiform moles and women with normal pregnancies, and that using RCA-I-R525, it may be possible to discriminate patients with choriocarcinoma from molar patients and normal pregnant women.

ま え が き

ヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG) のペプチド鎖の一次構造^{4) 6) 14) 17) 18)}に続いて、糖鎖部の構造も決定され、 α および β subunit 中にそれぞれ 2 個の N-asparagine 結合糖鎖、さらに β subunit の C OOH terminal peptide (β -CTP) 中に 4 個の O-serine 結合糖鎖が含有されていることが明らかになっている^{12) 13)}。また、その最外側に結合するシアル酸は生物活性の発現に重要な役割を演じていることが明らかにされる^{16) 22) 23) 24)}。一方、hCG の脱シアル化が絨毛癌において著しく亢進していることが指摘され^{1) 15) 20)}、糖鎖の中でもシアル酸の有する意義はことに大きいように思われる。

ところで脱シアル化 hCG (asialo hCG, as-hCG) の測定法としては Birken ら⁷⁾により脱シアル化 β -CTP (as- β -CTP) に対する抗血清を使用した RIA が報告されているが、この RIA は測定感度が必ずしも充分ではなく、また臨床検体 (血清、尿など) を測定するためにはゲル濾過などの前処理を必要とし、直接には測定できないため実際に臨床的に使用することが困難である。さらに、この RIA では as- β -CTP に対する抗血清を使用しているため β -CTP に結合していない N-asparagine 結合糖鎖の脱シアル化については測定できない。

hCG に脱シアル化がおこると、その最外側の糖は O-serine および N-asparagine 結合糖鎖のいずれにおいても Galactose であるが、Galactose binding lectin のうち peanut より精製された *Arachis hypogaea* (PNA) は末端糖構造 Gal β -(1 $\rightarrow$ 3)-Gal NAc に特異性を有し、また *castor bean* より精製された *Ricinus communis* (RCA-I) は Gal β -(1 $\rightarrow$ 4)-Glc NAc に特異性を有することが知られている^{3) 11)}。すなわち、PNA は O-serine 結合糖鎖が脱シアル化された時これと結合し、一方 RCA-I は N-asparagine 結合糖鎖が脱シアル化された時これと結合することが予想される。このような観点から、solid phase に結合させた上記 lectin により、検体中より as-hCG を抽出し、その後放射性同位元素で標識した hCG に specific な抗体を determinant として用いる lectin immunoradiometric assay (LIRMA) により as-hCG を測定することが可能であると考え、その開発を試みた。

材 料 と 方 法

標準抗原および抗体

hCG, hCG β , as-hCG, as-hCG β および as- β -CTP の各標準物質、また β -CTP に対する抗血清

R 525および R 529は Birken および Canfield より提供をうけた。hLH (AFP 4543 B) は NIAMDD より入手した。hCG β に対する monoclonal 抗体は Armstrong より提供をうけた。標準物質の作製法と分析^{5) 8) 9)}、および抗体の作製法と分析は彼等により詳細に報告されている^{7) 8) 9) 10)}。

試薬

Agarose conjugated PNA (PNA-Agarose) および Agarose conjugated RCA-I (RCA-I-Agarose) は E-Y Laboratories Inc. (San Mateo, Ca., USA) より、CNBr activated Sepharose 4B は Pharmacia Fine Chemicals (Piscataway, NJ, USA) よりそれぞれ入手した。

臨床検体

Brigham and Women's Hospital の New England Trophoblastic Disease Center (Boston, Mass., USA) および Medical College of Wisconsin (Milwaukee, WI, USA) において採取された絨毛性腫瘍患者の早朝尿が冷凍下に Columbia University の The Presbyterian Hospital (New York, NY, USA) に空輸された。これらの患者は採尿が行われた前述機関において組織学的に全胞状奇胎 (全奇胎: 侵入全奇胎を含む。以下同じ) あるいは絨毛癌の診断がなされていた。また正常妊娠初期の妊婦の早朝尿が前記 The Presbyterian Hospital において採取された。これらの尿検体は全て測定に先立ち、 $3,000 \times g$ にて15分間遠沈して不溶物を除去後、NaOH により pH 7.4 に調整した。

測定方法

RIA および Immunoradiometric assay (IRMA): total hCG 値を測定するために、抗血清として R 529 を使用した RIA, および ^{125}I で標識した R 525 を使用した IRMA を行った。RIA は後述する尿検体をゲル濾過した際の各 fraction の hCG の測定に、IRMA は直接尿検体中の hCG を測定する際に使用した。

IRMA においては hCG β に対する monoclonal 抗体を結合させた複合体を用いて hCG を抽出し、その後 ^{125}I -R 525 を hCG の determinant として尿中の total hCG 量を測定した。CNBr Sepharose 4 B と monoclonal 抗体の結合は添付の説明書の指示にしたがって行った。また RIA と IRMA の測定法はそれぞれ Birken ら⁷⁾ および Armstrong ら²⁾ により報告されている。

LIRMA: LIRMA を遂行するに際しての最適の条件をあらかじめ検討した。すなわち検体中より as-hCG を抽出する際に Specific Binding/Nonspecific Binding の ratio を最大にする PNA-Agarose あるいは RCA-I-Agarose (Lectin-Agarose) 量と反応時間、同様に上記 ratio を最大にする ^{125}I -R 525 の量と抗原抗体反応時間が検討された。その結果、Lectin-Agarose 量は 10% に希釈したものを $200 \mu\text{l}$ 使用するとき、また ^{125}I -R 525 は $50,000 \sim 100,000 \text{ CPM}/\mu\text{l}$ を使用するとき ratio は最大となった。lectin と as-hCG の結合は 1 時間で最大に達し、4 時間までは Specific Binding, Nonspecific Binding とともに一定の値を示したが、その後は徐々に Specific Binding が減少し ratio は低下傾向を示した。抗原抗体反応は 96 時間の incubation でも plateau に達しなかったが、48~72 時間で十分な測定感度と精度が得られた。また 10% の Lectin-Agarose の $200 \mu\text{l}$ は少なくとも $1,000 \text{ ng}$ の as-hCG と結合する capacity を有することが確認された。

実際の測定は以上の結果より次のように行った。標準 as-hCG あるいは尿検体の 4 ml を $12 \times 75 \text{ mm}$ の polystyrene tube に入れ、これに assay buffer (buffer A: 0.01 M PBS + 0.01 M EDTA + 0.1% Sodium azide + 0.1% Bovine γ -globulin, pH 7.4) によって希釈した 10% Lectin-Agarose を $200 \mu\text{l}$ 加えた。これを室温で振盪下に 1~2 時間 incubate して as-hCG を抽出し、 $3,000 \times g$ で 30 分間遠沈して上清を除去した。沈澱物を wash buffer (buffer B: buffer A + 1% Tween 20) にて洗浄後、b-

uffer A にて稀釈した 50,000 CPM/100 μ l の 125 I-R 525 を加えて 4 $^{\circ}$ C にて振盪化に 48~72 時間 incubate した。この後, Nonspecific Binding を減ずるために buffer B 2 ml で 2 回洗浄し, tube に残った radioactivity を測定した。

上記 RIA, IRMA および LIRMA のデータ処理はすべて four parameter logistic fit²¹⁾ によった。

Sephadex G-100 による絨毛癌患者および正常妊婦尿のゲル濾過

絨毛癌患者および正常妊婦の尿 100 ml を凍結乾燥後, 10 ml の 0.1 M NaCl を含む 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) に溶解した。これを 3,000 $\times$ g にて 15 分間遠沈して不溶物を除去後, 同 buffer にて平衡化した Sephadex G-100 column (2.5 $\times$ 196 cm) によりゲル濾過を行った。

溶出は 4 $^{\circ}$ C にて upward flow により 40 ml/hour の速度で行い, 採取した各 fraction は RIA により total hCG 値を PNA-R 525 および RCA-I-R 525 の 2 種の LIRMA により as-hCG 値が測定された。

Table 1. Comparison of recovery of as-hCG from buffer with that of urine.

added as-hCG (pmoles/ml)	estimated value using a standard curve of buffer (pmoles/ml)	estimated value using a standard curve of urine (pmoles/ml)
0.01	0.0027	0.0096
0.02	0.0051	0.019
0.04	0.011	0.039
0.08	0.024	0.081
0.16	0.051	0.165

成 績

LIRMA の標準曲線

Figure 1 に PNA-R 525 により測定した as-hCG の標準曲線を示した。最大結合の 10% および 90% を与える ED₁₀ と ED₉₀ の間を検量範囲として採用したが, これによると ED₁₀ は 0.01 pmoles/ml (0.39 ng/ml), ED₉₀ は 2.5 pmoles/ml (97.68 ng/ml) であった。特異性をみると as-hCG β および as- β -CTP とは 100% の cross-reactivity を示したが, hCG とは最大の結合を示した ED₄₀ において比較して 0.10%, 同じく hCG β とは ED₃₀ において比較して 0.03%, さらに hLH とは ED₁₀ において比較して 0.01% 以下の cross-reactivity を示すにとどまった。

Figure 1 の右上に示したように buffer 中および尿中よりの as-hCG の recovery は同様であり, 2 つの標準曲線は統計学的に同一とみなされた。すなわち, その slope と ED₅₀ を比較すると, buffer においては 1.051 および 0.122 pmoles/ml (4.77 ng/ml), 尿においては 1.141 および 0.136 pmoles/ml (5.31 ng/ml) であった。

ほぼ ED₅₀ を与える 0.2 pmoles/ml (7.81 ng/ml) を正常男子尿に加えて検討したこの assay 系の variance は intraassay が 6.82%, interassay が 18.63% であった。

Figure 2 に RCA-I-R 525 により測定した as-hCG の標準曲線を示した。ED₁₀ および ED₉₀ はそれぞれ 0.002 および 0.2 pmoles/ml (0.078 および 7.81 ng/ml) であった。as-hCG β とは 100% の cross-reactivity を示したが, as- β -CTP とは 0.01% 以下, また hCG および hCG β とは最大の結合を示した ED₁₀ において比較して 0.03% の cross-reactivity を示すにとどまった。

Fig. 1. Characteristics of PNA-R525 assay system for measurement of as-hCG in buffer or urine. Comparisons of dose responses were made for the following hormones or fragments.

as-hCG (●—●), as-hCG β (○—○), as- β -CTP (□—□), hCG (▲—▲), hCG β (△—△) and hLH (×—×).

Figure on right upper corner illustrates measurement of as hCG in buffer (●—●) and normal male urine (○—○) using PNA-R525 system.

Fig. 2. Characteristics of RCA-I-R525 assay system for measurement of as-hCG in buffer or urine. Comparisons of dose responses were made for the following hormones or fragments.

as-hCG (●—●), as- β -CTP (□—□), hCG (▲—▲) and hCG- β (△—△).

Figure on right upper corner illustrates measurement of as-hCG in buffer (●—●) and normal male urine (○—○) using RCA-I-R525 system.

Figure 2の右上に示したように buffer 中および尿中の as-hCG を測定した成績では ED_{50} において尿中の as-hCG の recovery は buffer 中のそれに比較して25%にとどまり、両者の標準曲線は異なっていた。このため標準曲線の作成に際しては、検体量と等量の正常男子尿を加えて検量を行ない、Table .1に示す値を得たので、検量線として使用可能であることが判った。

ほぼ ED_{50} を与える0.05 pmoles/ml (1.95 ng/ml) の as-hCG を正常男子尿に加えて検討した variance は intraassay が5.11%, interassay が16.34%であった。

Fig. 3. Sephadex G-100 gel filtration of urine concentrates obtained from a patient with choriocarcinoma (left panel) and from a woman during normal pregnancy (right panel). Each 10ml of the urine concentrate was applied to a column (2.5 × 196cm) of Sephadex G-100 and eluted by upward flow (40ml/hour, 4°C) with 0.05M Tris-HCl buffer containing 0.1M NaCl (pH 7.4). Fractions of 6ml were collected and aliquots were assayed in three systems. R529-RIA (▲); PNA-R525 (●); RCA-I-R525 (○). The elution position of ^{125}I -hCG or ^{14}C -Glucose was determined from a separate run.

Sephadex G-100絨毛癌患者および正常妊婦尿のゲル濾過の測定成績

絨毛癌患者および正常妊婦の各1例の尿を Sephadex G-100によりゲル濾過して、RIAにより total hCG 値を、PNA-R 525および RCA-I-R 525により as-hCG 値を測定した成績を Figure 3に示した。絨毛癌患者尿の elution profile では2峰性の immunoreactive hCG を認めた。最初の hCG の peak は ^{125}I -hCG の elution volume (V_e) に一致し、これに対し as-hCG の peak は hCG の peak より少し遅れて溶出された。この peak の total hCG 量に対する as-hCG 量の割合は PNA-R 525測定系で17%, RCA-I-R 525測定系でほぼ同じ比率を示した。第2の peak においては、hCG および PNA-R 525系で測定した as-hCG の V_e は一致したが、RCA-I-R 525系では as-hCG を検出できなかった。この peak における as-hCG 量の割合は PNA-R 525系で110%であった。

一方、正常妊婦尿の elution profile においては hCG および as-hCG のいずれも1峰性の peak を認めるのみで低分子領域には peak を認めなかった。hCG の peak は ^{125}I -hCG の V_e に一致し、PNA-R 525および RCA-I-R 525により測定した as-hCG の peak は hCG のそれより少し遅れて溶出された。この peak の total hCG 量に対する as-hCG 量の割合は PNA-R 525系の測定値で1.5%, RCA-I-R 525系の測定値で1.4%であった。

Fig. 4. Comparison of the quantity of as-hCG measured by PNA-R525 (Y axis) to the total hCG content determined by IRMA (X axis). Plotted symbols are choriocarcinoma (●), hydatidiform mole including invasive mole (▲) and normal pregnancy (○), respectively. The upper line is a regression of values for choriocarcinoma patients, the middle line is that of values for mole and the lower line is that of values for women during normal pregnancy.

Fig. 5. Comparison of the quantity of as-hCG measured by RCA-I-R525 (Y axis) to the total hCG content determined by IRMA (X axis). Plotted symbols are choriocarcinoma (●), hydatidiform mole including invasive mole (▲) and normal pregnancy (○), respectively. The upper line is a regression of values for choriocarcinoma patients, also two regression lines for mole and normal pregnancy are indicated by arrows.

臨床検体の測定成績

Figure 4に IRMA により測定した total hCG 値と PNA-R525により測定した as-hCG 値の関係を示した。これらの回帰直線および相関係数は絨毛癌： $Y=0.46X+0.22$, $\gamma=0.91$, 全奇胎： $Y=0.27X+0.15$, $\gamma=0.84$ および正常妊娠： $Y=0.18X-0.16$, $\gamma=0.68$ であり, 3 者間に有意の差を認めた ($P<0.05$)。

Figure 5に同じく IRMA により測定した total hCG 値と RCA-I-R525により測定した as-hCG 値の関係を示した。これらの回帰直線および相関係数は絨毛癌： $Y=0.75X-1.20$, $\gamma=0.97$, 全奇胎： $Y=0.37X-0.95$, $\gamma=0.89$ および正常妊娠： $Y=0.32X-0.67$, $\gamma=0.89$ であり, 絨毛癌と他の 2 者間には有意差を認めた ($P<0.05$) が, 全奇胎と正常妊娠の間には有意差を認めなかった。

Figure 6に PNA-R525および RCA-I-R525により測定した as-hCG 値の相関を示した。回帰直線と相関係数はそれぞれ $Y=1.09X-0.61$ および $\gamma=0.83$ であり, 両測定系により測定した as-hCG の値は必ずしもよく一致した値をとるものではないことを示している。

Fig. 6. Comparison between as-hCG values obtained by PNA-R525 (X axis) and RCA-I-R525 (Y axis). Quantities plotted on log scales for each assay. Regression analysis was $Y=1.09X-0.61$, $r=0.83$.

考 察

絨毛癌患者の尿中には正常妊婦のそれに比較して著しく高率に as-hCG が検出されたという報告^{1) 15) 20)} はきわめて少数例についての検討であるが, もしこれがある程度普遍的な現象であるとすれば as-hCG は有力な tumor marker となりうるはずである。このような観点から現在ではまだ臨床レベルでの実用化には至っていない as-hCG の測定法の開発を試みた。

PNA および RCA-I の 2 種の lectin は予想されたように as-hCG と結合し, solid phase に結合させたこれらの lectin により抽出された as-hCG は hCG の unique determinant である ^{125}I -R 525 との結合量をみることにより測定が可能であった。

これら 2 種の測定系の感度は PNA-R 525 系および RCA-I-R 525 系でそれぞれ 0.01 および 0.002 pmoles/ml (0.39 および 0.078 ng/ml) であり, Birken ら⁷⁾ の RIA の 0.8 pmoles/ml (31.26 ng/ml) に比較して, 前者が 80 倍, 後者が 400 倍上昇している。

尿中よりの as-hCG の recovery は PNA-R 525 系においては buffer 中よりの recovery と同様であったのに対し, RCA-I-R 525 系では 25% の recovery しか得られず, 尿中に RCA-I と as-hCG の結合を阻害する因子の存在が推測された。しかしながら RCA-I-R 525 系においても測定する尿検体と等量の正常男子尿を標準 as-hCG に加えることにより as-hCG の定量には支障をきたさなかった。

特異性の検討では, 両測定系ともに hCG, hCG β および hLH とはほとんど無視できる cross-reactivity しか示さなかった。一方, lectin の特異性により, PNA は脱シアル化 O-serine 結合糖鎖と結合するため as-hCG とともに as-hCG β および as- β -CTD も同様に認識するのにに対し, RCA-I は脱シアル化 N-asparagine 結合糖鎖と結合するため, この構造を有しない as- β -CTP は認識されない。Figure 3 に示した Sephadex G-100 による絨毛癌患者と正常妊婦尿のゲル濾過の elution profile に認められる ^{125}I -hCG の V_e に少し遅れて溶出された immunoreactive as-hCG の peak は native size hCG の脱シアル化産物すなわち as-hCG そのものと考えられる。 V_e の遅れは脱シアル化による分子量の減少と水に対する溶解度が幾分減少した結果であると推測される。一方, 絨毛癌患者尿のゲル濾過において認められた低分子領域の peak は PNA-R 525 系で検出され, RCA-I-R 525 系で検出されないことから, 前述した理由により as- β -CTP と考えられる。Amr ら¹⁾ は絨毛癌患者尿 2 例を同じく Sephadex G-100 でゲル濾過し, 各 fraction の immunoreactive hCG および immunoreactive as-hCG を抗 β -CTP 抗体および抗 as- β -CTP 抗体を使用した RIA により測定している。これによるとそのうちの 1 例においては immunoreactive hCG および immunoreactive as-hCG とともに 2 峰性の peak を示し, そのいずれの peak においてもほとんどすべての immunoreactive hCG が脱シアル化されている。他の 1 例は immunoreactive hCG および immunoreactive as-hCG とともに 1 峰性の peak を示し, 低分子領域には peak を認めていない。また, この peak の hCG は 20% 強が脱シアル化されている。彼等も他の実験成績とあわせて ^{125}I -hCG の V_e に少し遅れて溶出される物質は as-hCG であり, 低分子領域に認められる immunoreactive as-hCG は as- β -CTP であろうと推論している。本研究における絨毛癌患者の例では β -CTP と考えられる物質は実質的にそのすべてが脱シアル化されているが, native size hCG と考えられるものでは 16~17% 程度が脱シアル化されているにすぎない。前述の Amr らの 2 例と比較してみると, 本症例の場合は丁度その中間的な性質をもっているように考えられ, native size hCG あるいは β -CTP の脱シアル化の程度は個々の症例でかなり異なっていることが推察される。また, Figure 6 に示したように PNA-R 525 系と RCA-I-R 525 系で測定した as-hCG の値が $Y = 1.09X - 0.61$, $\gamma = 0.83$ と必ずしもよく一致した値をとらない原因の一つとして, 本症例にみられるような PNA-R 525 系では検出でき, RCA-I-R 525 系では検出できない as- β -CTP が尿中に存在していることが考えられる。さらにそれに加えて, 部分的に O-serine 結合糖鎖のみが脱シアル化されているときは PNA-R 525 系でのみ検出され, 一方部分的に N-asparagine 結合糖鎖のみが脱シアル化されている場合は RCA-I-R 525 系でのみ検出されるといことも両測定系による測定値の不一致の原因として考えられる。

絨毛性疾患例および正常妊婦例の尿検体の測定成績によると, Figure 4 および 5 に示したように PNA-R525 系と RCA-I-R525 系の両測定系において as-hCG 値は total hCG 値の増加に伴い増加した。しかしながら, 回帰直線の slope が 1 より小さいことから判るように as-hCG の増加率は total hCG の増加率に比較して低値を示した。このことは total hCG 値が高くなる程 as-hCG がその中に占める割合は低くなることを意味している。また両測定系における回帰直線の slope は絨毛癌, 全奇胎および正常妊娠のいずれの場合においても, PNA-R525 系に比較し RCA-I-R525 系の方が大であった。このことは total hCG 値が高い場合は O-serine 結合糖鎖に比べ, N-asparagine 結合糖鎖の方が脱シアル化され易いことを示しているものと考えられる。

絨毛癌患者の尿中の as-hCG の割合は PNA-R525 系および RCA-I-R525 系のいずれにおいても全奇胎あるいは正常妊娠例に比較して有意に高値を示した。また PNA-R525 系においては全奇胎患者の尿中の as-hCG の割合は正常妊婦尿のそれよりも高値を示したが, RCA-I-R525 系では全奇胎例と正常妊娠例の間には有意の差を認めなかった。すなわち, total hCG 量に対する as-hCG 量の割合は PNA-R525 系により測定すると, 絨毛癌 > 全奇胎 > 正常妊娠の順に高率であり, 一方 RCA-I-R525 系により測定すると, 絨毛癌 > 全奇胎 $\approx$ 正常妊娠という成績が得られた。このことは total hCG 値を知り, 加えて as-hCG 値を PNA-R525 系で測定すれば 3 者を区別でき, as-hCG 値を RCA-I-R525 系で測定すれば絨毛癌と他の 2 者を区別できることを示している。

症例の追加により, このことが確認されれば絨毛性疾患の診断と管理に重要な情報を提供できる方法となるであろう。

結 語

Lectin immunoradiometric assay による as-hCG の測定法を開発し, さらにそれを臨床応用に供して次の知見を得た。

- 1) Gal β -(1 $\rightarrow$ 3)-GalNAc に特異性を有する PNA により, O-serine 結合糖鎖部の as-hCG を, また Gal β -(1 $\rightarrow$ 4)-GlcNAc に特異性を有する RCA-I により, N-asparagine 結合糖鎖部の as-hCG を個別に測定できた。
- 2) 2 種類の as-hCG 測定系は高感度および高特異性を有し, また臨床検体(尿)の測定も可能であった。
- 3) 絨毛癌患者の尿中の as-hCG 含有率(対 total hCG)は両測定系においていずれも全奇胎患者および正常妊婦のそれに比して高く, as-hCG は絨毛癌の腫瘍マーカーとして有用であると考えられた。

標準抗原および抗血清をご提供いただいた Columbia 大学内科, R.E.Canfield 教授および S.Birken 博士, monoclonal 抗体をご提供いただいた同病理学, E.G.Armstrong 博士, ならびに本研究にあたって終始貴重な助言と指導をいただいた上記 Canfield 教授および Armstrong 博士に対し謝意を表します。また本稿をご校閲いただいた長崎大学産婦人科, 山辺徹教授に感謝致します。

文 献

- 1) Amr, S., Wehmann, R.E., Birken, S., Canfield, R.E. and Nisula, B.C.: Characterization of a carboxyterminal peptide fragment of the human chorionic gonadotropin β subunit

- excreted in the urine of a woman with choriocarcinoma. *J. Clin. Invest.* 71: 329–339, 1983.
- 2) Armstrong, E.G., Ehrlich, P.H., Birken, S., Schlatterer, J.P., Siris, E., Hembree, W. and Canfield, R.E.: Use of a highly sensitive and specific immunoradiometric assay for detection of human chorionic gonadotropin in urine of normal, non-pregnant and pregnant individuals. Submitted to *J. Clin. Endo. Met.* 3) Baenziger, J.U. and Fiete, D.: Structural determinants of ricinus communis agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 254: 9795–9799, 1979. 4) Bellisario, R., Carlsen, R.B. and Bahl, O.P.: Human chorionic gonadotropin: Linear amino acid sequence of the subunit. *J. Biol. Chem.* 248: 6796–6807, 1973. 5) Birken, S. and Canfield, R.E.: Labeled asialo-human chorionic gonadotropin as a liver scanning agent. *J. Nucl. Med.* 15: 1176–1178, 1974. 6) Birken, S. and Canfield, R.E.: Isolation and amino acid sequence of COOH-terminal fragments from the beta subunit of human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.* 252: 5386–5392, 1977. 7) Birken, S., Canfield, R., Lauer, R., Agosto, G. and Gabel, M.: Immunochemical determinants unique to human chorionic gonadotropin: Importance of sialic acid for antisera generated to the human chorionic gonadotropin β -subunit COOH-terminal peptide. *Endo.* 106: 1659–1664, 1980. 8) Birken, S., Canfield, R., Agosto, G. and Lewis, J.: Preparation and characterization of an improved β -COOH-terminal immunogen for generation of specific and sensitive antisera to human chorionic gonadotropin. *Endo.* 110: 1555–1563, 1982. 9) Canfield, R.E. and Ross, G.T.: A new reference preparation of human chorionic gonadotropin and its subunit. *Bull. World Health Org.* 54: 463–472, 1976. 10) Ehrlich, P.H., Moyle, W.R., Moustafa, Z.A. and Canfield, R.E.: Mixing two monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen. *J. Immunol.* 128: 2709–2713, 1982. 11) Goldstein, I.J. and Hayes, C.E.: Lectins: Carbohydrate binding proteins. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35: 127–277, 1978. 12) Kessler, M.J., Reddy, M.S., Shah, R.H. and Bahl, O.P.: Structures of N-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.* 254: 7901–7908, 1979. 13) Kessler, M.J., Mise, T., Ghai, R.D. and Bahl, O.P.: Structure and location of the O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.* 254: 7909–7914, 1979. 14) Keutmann, H. and Williams, R.: Human chorionic gonadotropin amino acid sequence of the hormone-specific COOH-terminal region. *J. Biol. Chem.* 252: 5393–5397, 1977. 15) Mizuochi, T., Nishimura, R., Derappe, C., Taniguchi, T., Hamamoto, T., Mochizuki, M. and Kubota, A.: Structures of the asparagine linked sugar chains of human chorionic gonadotropin produced in choriocarcinoma. *J. Biol. Chem.* 258: 14126–14129, 1983. 16) Morell, A.G., Gregoriadis, G., Scheiberg, I.H., Hickman, J. and Ashwell, G.: The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in circulation. *J. Biol. Chem.* 246: 1461–1467, 1971. 17) Morgan, F.J., Birken, S. and Canfield, R.E.: Human chorionic gonadotropin: A proposal for the amino acid sequence. *Mol. Cell. Biochem.* 2: 97–99, 1973. 18) Morgan, F.J., Birken, S. and Canfield, R.E.: The amino acid sequence of human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.* 250: 5247–5258, 1975.

- 19) Moyle, W.R., Ehrlich, P.H. and Canfield, R.E.: Use of monoclonal antibodies to subunits of human chorionic gonadotropin to examine the orientation of the hormone in its complex with receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 2245–2249, 1982.
- 20) Nishimura, R., Endo, Y., Tanabe, Y., Ashitaka, Y. and Tojo, S.: The biochemical properties of urinary human chorionic gonadotropin from the patients with trophoblastic diseases. *J. Endocrinol. Invest.* 4: 349–358, 1981.
- 21) Rodbard, D.: Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin. Chem.* 20: 1255–1270, 1974.
- 22) Shimohigashi, Y. and Chen, H.C.: Carbohydrate structures in the β -subunit of human chorionic gonadotropin play a dominant role in hormonal activity. *Febs Letters* 150: 64–68, 1982.
- 23) Van Hall, E.V., Vaitukaitis, J.D., Ross, G.T., Hickman, J.W. and Ashwell, G.: Immunological and biological activity of hCG following progressive desialylation. *Endo.* 88: 456–464, 1971.
- 24) Van Hell, H., Geverde, B.C., Schuurs, A.H.W.M., DeJager, E., Matthijsen, R. and Homan, J.D.H.: Purification, characterization and immunochemical properties of human chorionic gonadotropin. *Nature* 212: 261–262, 1966. (受付日: 59. 12. 10)