

ピーナツレクチン Sepharose アフィニティークロマト グラフィーによる末端糖鎖不全 hCG の検出

神戸大学医学部産科婦人科学教室

宇都宮 卓 西村隆一郎 望月 真人

Binding of Human Chorionic Gonadotropin with Insufficient Terminal Sugar to Peanut Agglutinin

Taku UTSUNOMIYA, Ryuichiro NISHIMURA and Matsuto MOCHIZUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Kobe University School of Medicine, Kobe

概要 絨毛細胞の癌化に伴うヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の糖鎖変異の有無を、ピーナツより抽出された植物性凝集素である *Arachis hypogaea* (PNA) レクチンを利用して検討し、以下の成績を得た。

1. 基礎的実験として、まず正常初期妊婦尿より抽出した hCG (standard hCG) と、これを尿素処理して分離した α , β 両 subunits (standard α and β subunits) 及びこれらをノイラミニダーゼ処理して得た asialo 誘導体などについて PNA 結合態度を検討した。

standard hCG, α subunit, β subunit のいずれも、無処理では PNA 結合能を示さなかつた。ノイラミニダーゼ処理を行なうことによつて hCG と β subunit には新たに PNA 結合能が出現したが、 α subunit は PNA 結合能を示さなかつた。このことから、PNA は hCG の β subunit 部分にのみ存在する O-グリコシド型糖鎖のガラクトース (Gal) $\rightarrow$ N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 末端糖鎖を特異的に認識することが判明した。

2. 同一個体における血中と尿中 hCG の PNA 結合率を比較すると、血中 hCG のそれが有意に高値であつた。血中不完全シアロ hCG は肝で摂取代謝され易く、尿中には排泄されにくいものと考えられる。このことから血中 hCG 濃度が尿中に比して異常高値を示す場合には不完全シアロ hCG の存在を考慮すべきであろうと考えられた。

3. 正常妊婦及び胎状奇胎患者の血中や尿中 hCG の PNA 結合率は全ての例で1%以下であつたのに比べ、絨毛癌患者では6例中4例で1%以上の PNA 結合率を示し、その内2例では90%以上もの結合率を示した。

これらの結果は、正常絨毛や胎状奇胎で分泌される hCG の糖鎖はほぼ完全にシアル化されているのに対し、絨毛癌では不完全シアロ体として分泌される hCG の占める比率が異常に増加していることを示唆するものである。

以上の成績より PNA-Sepharose affinity chromatography は不完全シアロ hCG の簡便かつ特異的な検出法であり、臨床的にもそのことが絨毛癌診断の一助として有用な手段になることが示唆された。

Synopsis We have studied the binding of human chorionic gonadotropin (hCG) in sera and urine of normal pregnant women and patients with trophoblastic diseases to the lectin from peanut (*Arachis hypogaea*, PNA).

1. As the basic experiments, purified standard hCG and its α and β subunits were examined for binding to a PNA-Sepharose column. Both standard hCG and hCG- β adsorbed to the PNA-Sepharose only when they were treated with neuraminidase, whereas hCG- α was still not adsorbed even after treatment with neuraminidase.

2. The major proportions of hCG in sera and urine from normal pregnancy and hydatidiform mole were not adsorbed to the PNA-Sepharose column. On the other hand, the proportions of PNA binding fraction in sera and urine from choriocarcinoma were significantly elevated in 4 of 6 cases.

3. The PNA binding fraction was significantly higher in serum than in urine of each individual.

4. The PNA binding fractions were extracted and purified from urine of 2 patients with choriocarcinoma, and were quantitatively found to be asialo-hCG.

These results suggest that PNA-Sepharose affinity chromatography is an effective tool to use in detecting incompletely sialylated hCG and hCG- β and may be a useful index for the clinical diagnosis of choriocarcinoma.

Key words: Human chorionic gonadotropin • Peanut agglutinin • Sialic acid • Choriocarcinoma

緒 言

近年、細胞の癌化に伴い膜系や非膜系糖蛋白質の糖鎖構造に変異の生ずる事実が報告されるようになった¹³⁾¹⁵⁾¹⁹⁾²³⁾²⁴⁾。著者らはこのような研究のモデルとして絨毛細胞の性格とその産生糖蛋白であるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) との関連性を検討し、絨毛細胞の癌化に伴い hCG の糖鎖部分に変異の生ずる可能性を既に指摘してきた¹³⁾¹⁵⁾。その中で、絨毛癌患者の尿中にシアル酸を含まない hCG の存在を見出し、末端糖鎖不全としての不完全シアロ hCG の出現は癌化に伴う一変異ではないかと推定した¹⁵⁾。

しかし、現在迄行われている不完全シアロ hCG の検出方法では大量の尿よりこれを抽出し、シアル酸定量を行い得る程度まで高度に精製する必要があり、臨床応用への難点となっていた¹⁵⁾²²⁾。ところで、各種の植物性レクチンを用いて精製困難な糖蛋白質の糖鎖構造を推定する試みが多く行われている。ピーナッツより抽出される植物性凝集素である *Arachis hypogaea* (PNA) レクチンが、ヒト赤血球をそのままでは凝集しないが、ノイラミニダーゼ処理することにより初めて強く凝集するという現象が報告された後⁵⁾、種々の単糖や糖蛋白を用いてこの凝集阻止反応が検討され、PNA の特異的糖鎖認識部位はガラクトース (Gal)→N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) にあり、しかもこれが糖鎖末端に露出している必要のあることが知られるようになった¹¹⁾¹⁷⁾²¹⁾。以上の基礎的知見から、もしその分子中にシアル酸を欠いた O-グリコシド型糖鎖を有した hCG が存在するならば、PNA はこれを特異的に認識するであろうと推定した。

そこで絨毛細胞の癌化に伴う hCG 糖鎖構造変異の惹起、特に末端糖鎖不全を知るために、絨毛性疾患患者の血中や尿中 hCG の PNA レクチンへの親和性を正常妊婦の場合と比較検討し、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. PNA-Sepharose 4B カラムの作成

PNA-Sepharose の作成には E.Y. Laboratory (U.S.A.) 製の PNA レクチンと Pharmacia (Sweden) 製の CN-Br-activated Sepharose 4B を用いた。CN-Br-activated Sepharose 4B 3g を 600ml の 1mM HCl にて膨潤、洗浄した後、ガラスフィルター (G 3) 上で 0.5M NaCl を含む pH8.3, 0.1M NaHCO₃ 緩衝液 500ml にて更に洗浄した。これを pH8.3, 0.1M NaHCO₃ 緩衝液 30 ml で希釈し、同じ緩衝液に溶解した PNA 20mg と室温 2 時間、4℃ 12 時間静かに混和して PNA-Sepharose を作成した。

この PNA-Sepharose を 0.6×7cm (容量約 2 ml) のカラムに充填した後、pH7.5 のモノエタノールアミン 20ml を流して余剰活性基をブロックし、更に 0.2M NaCl, 0.02% NaN₃ を含む pH7.4, 0.05M sodium phosphate 緩衝液 (PNA-buffer) を用いて十分に緩衝化した。

2. 実験材料

a) standard hCG 及びその subunits

正常初期妊婦尿より既報の方法にて抽出精製した hCG を標準品 (standard hCG) として用い、これを尿素処理によつて分離して standard α subunit, standard β subunit とした。尚、実験に供した各抽出精製 hCG は全て standard hCG と同様の方法によつて作成したものである¹⁵⁾。

b) asialo 誘導体の作成

i) ノイラミニダーゼ処理

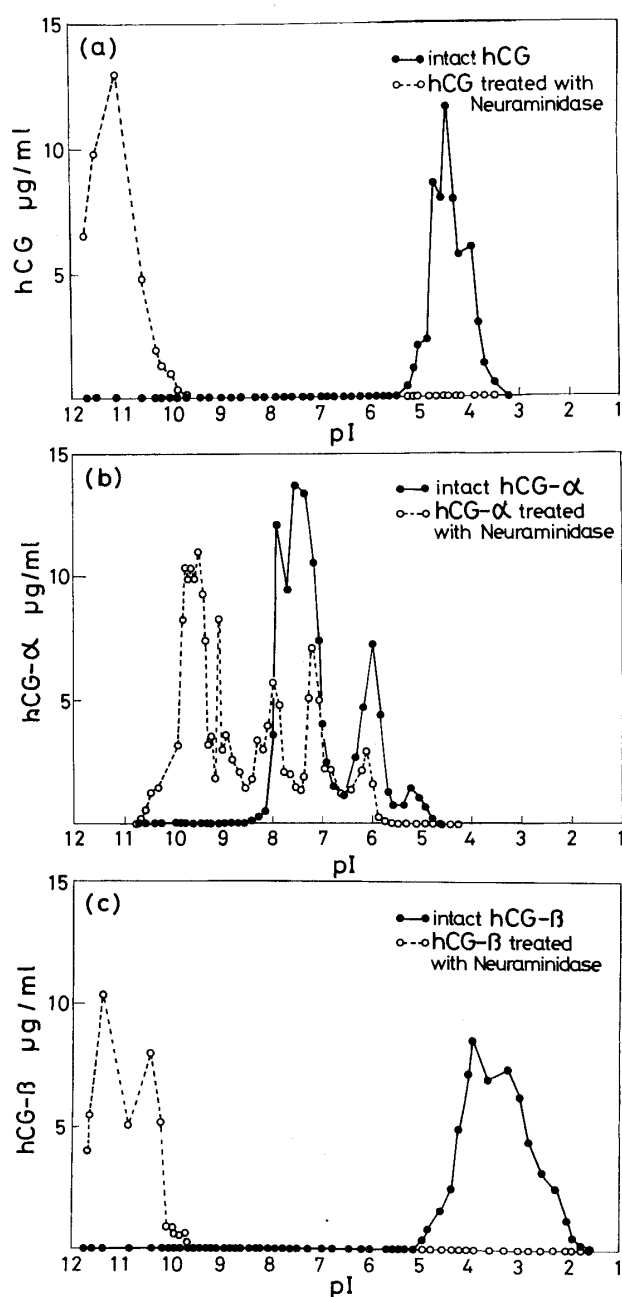
standard hCG, α subunit, β subunit 各々 5mg に 2units のノイラミニダーゼ (E.C.32, 1, 18 Lot V 2 H3007 半井化学) を加え pH5.0, 0.1M sodium acetate 緩衝液 200 μ l 中で 37℃ 12 時間 incubate した。

ii) 等電点電気泳動 (IEF)

ノイラミニダーゼ処理した標品はそのまま直ちに等電点電気泳動 (IEF) に供した。IEF は既報の

通り110mlの加藤型カラムを用いcarrier ampholyteに最終濃度1%のAmpholine (LKB) pH3.5-10を使用して400V12時間の初期泳動の後、750V48時間の本泳動を施行し、一分画1.5mlで分画採取した¹⁶⁾。全分画を夫々のRIAで測定した結果、hCGの場合はpI 10-12, α subunitではpI 9-10, β subunitではpI 10-12の分画に主たる免疫活性が認められ(図1 a, b, c)これらの分画

図1 standard hCG, α subunit, β subunit のノイラミナーゼ処理前(●—●), 後(○---○)における等電点電気泳動パターン。
(a=hCG, b=hCG- α , C=hCG- β)



を4°C蒸留水中で透析した後、凍結乾燥し-60°Cにて保存した。

iii) シアル酸含量の測定

各ノイラミナーゼ処理後の standard, 及び 2

図2 standard hCG, α subunit, β subunit (●—●) とそれらの asialo 誘導体(○---○)の PNA-Sepharose affinity chromatography 溶出パターン。
(a=hCG, b=hCG- α , c=hCG- β)

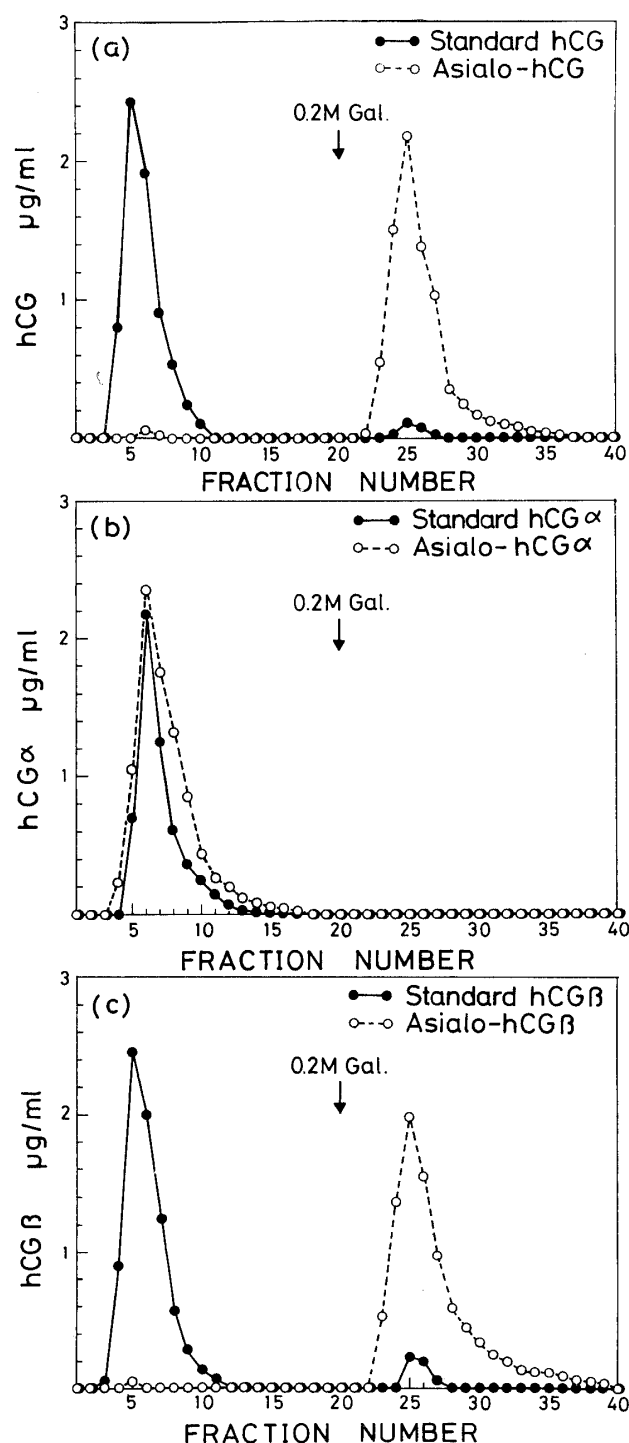


表1 各期正常妊婦の血中及び尿中 hCG の PNA 結合率

	Serum hCG		Urinary hCG	
First Trimester	0.65±0.12	0.61±0.07	0.43±0.13	0.34±0.06
Second Trimester	0.50±0.09		0.23±0.05	
Third Trimester	0.68±0.13		0.38±0.10	

The values in the Table are mean value (in %)±S.E. obtained by determining four samples.

例の絨毛癌患者 hCG のシアル酸含量は 0.2M H_2SO_4 80℃ にて 30 分間脱水した後 thiobarbituric acid 法にて測定した²²⁾.

c) 血清及び尿

各期正常妊婦 (12 名), 胞状奇胎患者 (2 名), 絨毛癌患者 (6 名) の血液及び尿 (尿由来精製物) を PNA-Sepharose affinity chromatography に供した. 血液は凝固後 3,000rpm 10 分間遠沈して血清を採取し, 尿も同様に 3,000rpm 10 分間遠沈した後の上清を採取し夫々 -20℃ で保存した.

3. PNA-Sepharose affinity chromatography

添加する sample には精製 hCG の場合 10 μg を 200 μl の PNA buffer に溶解して用い, 血清や尿は 5-10 μg の hCG を含有する量を用いた. 各 sample をカラムに添加し, まず PNA buffer 単独を溶出液として 1 分画 0.5ml で 20 分画採取した. 引き続き溶出液を 0.2M ガラクトースを含んだ PNA buffer に交換して同様に 20 分画採取した. 得た全分画を hCG, α subunit, β subunit 夫々の RIA にて測定した²⁾¹⁴⁾.

実験成績

1. asialo 誘導体

ノイラミニダーゼ処理後の hCG, α subunit, β subunit の等電点は図 1 a, b, c に点線で示した如く, それぞれ pI 10-12, pI 9-10, pI 10-12 の分画に主たる免疫活性を持ち, 実線で示したノイラミニダーゼ処理前の standard 標品の等電点に比し大きく塩基性に移動していた.

これら主分画中のシアル酸含量を測定したところ, シアル酸は全く検出できなかった.

2. standard hCG, α subunit, β subunit とこれらの asialo 誘導体の PNA 結合態度

standard hCG, α subunit, β subunit は図 2 a, b, c に実線で示した如くいずれも PNA とは結合

表2 胞状奇胎患者の血中及び尿中 hCG, ならびに同一尿より抽出精製した hCG の PNA 結合率

Hydatidiform mole	Materials	PNA binding fraction (%)
case (1)	serum	0.4
	urine	0.1
	purified urinary hCG	0.7
case (2)	serum	0.2
	urine	0.2
	purified urinary hCG	0.5

表3 絨毛癌患者の尿中 hCG および尿より抽出精製した hCG の PNA 結合率

Choriocarcinoma	Urinary PNA binding fraction (%)
No. 1	25.4
No. 2	5.0
No. 3	0.9
No. 4	0.8
No. 5	98.0
No. 6	90.6

せず, その殆どが非結合分画に溶出された. asialo 誘導体では, hCG 及び β subunit には新たに PNA 結合能が出現し, 図 2 a, c に点線で示した如く非結合分画には殆ど溶出されず, 0.2M ガラクトースを含む溶液ではほぼ完全に溶出された. 一方 α subunit ではその asialo 誘導体にも図 2 b に点線で示した如く PNA 結合能の出現を認めなかった.

3. 正常妊娠各期の妊婦尿中及び血中 hCG の PNA 結合態度 (表 1)

5 週から 40 週迄の 12 例について検討したが, 妊娠全経過を通じて hCG の PNA 結合分画は尿中, 血中共に hCG 含量の 1% 以下に過ぎなかった. また尿中 hCG の PNA 結合分画は血中に比べ有意

に低率であつた。

4. 胞状奇胎患者尿中及び血中 hCG の PNA 結合態度 (表 2)

2 例の胞状奇胎患者の尿中及び血中 hCG も、正常妊婦と同様に PNA 結合分画は全体の1%以下に過ぎなかつた。それらの尿中より抽出精製した hCG の PNA 結合率は夫々0.7%, 0.5%を示した。

5. 絨毛癌患者尿中及び抽出 hCG の PNA 結合態度 (表 3)

正常妊婦や胞状奇胎患者 hCG の PNA 結合率は、全て1%以下を示したのに比べ、絨毛癌患者 hCG では 6 例中 4 例で1%以上、中でも 2 例の患者で90%以上もの結合率を示した。

図3 絨毛癌症例 (表3-No. 2) の血中 (●—●) 及び尿中 (○---○) hCG の PNA-Sepharose affinity chromatography 溶出パターン。

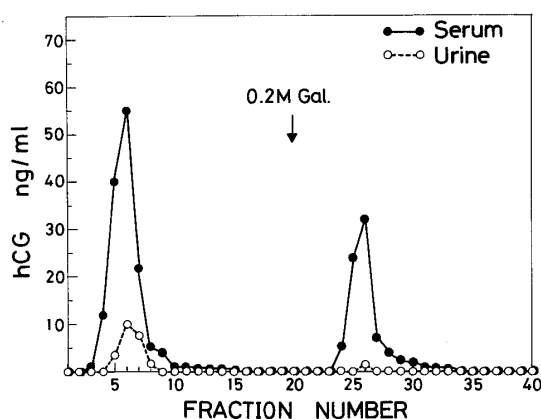


図4 絨毛癌症例 (表3-No. 5) の尿中 hCG の PNA-Sepharose affinity chromatography 溶出パターン。

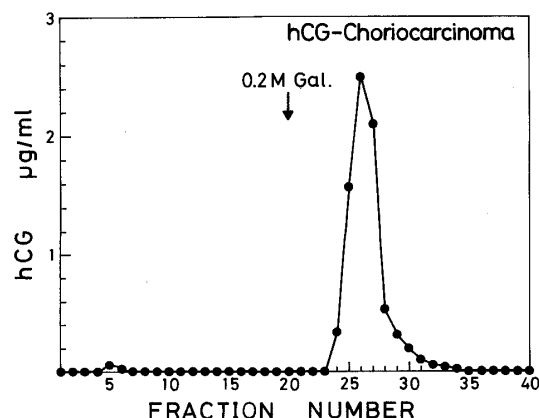


表3-No. 2の症例の血中及び尿中 hCG の溶出パターンを図3に示すが、PNA 結合率は血中で36%, 尿中で5%と両者の間に大きな差異が認められた。

98%の PNA 結合率を示した症例 No. 5の精製 hCG の溶出パターンを図4に示すが非結合分画には殆ど溶出されず0.2M ガラクトースによつて急峻なピークとなつて溶出された。またこの症例と90.6%の PNA 結合率を示した症例の hCG のシアル酸含量は測定感度以下であつた。

考 案

hCG は絨毛細胞より分泌される糖蛋白ホルモンであり、 α , β 二つの異なるサブユニットの非共有結合で構成され、その約30%を糖部分が占めている²⁾⁴⁾。 α subunit は2本の N-グリコシド型アスパラギン結合糖鎖を有するが、 β subunit はこれに加えて C 末端部分に4本の O-グリコシド型セリン結合糖鎖を有している⁴⁾¹²⁾。

今回の実験の結果 hCG 及び β subunit の場合には、無処理では PNA 結合能を示さなかつたが、ノイラミダーゼ処理によつて初めて PNA 結合能が出現し、 α subunit の場合にはノイラミダーゼ処理の有無にかかわらず PNA 結合能を示さなかつた。このことは β subunit にのみ存在する O-グリコシド型結合糖鎖の構造が NANA $\rightarrow$ Gal $\rightarrow$ GalNAc $\rightarrow$ Ser であるとされることから、その末端糖鎖であるシアル酸がノイラミダーゼ処理によつて除去され Gal $\rightarrow$ GalNAc 構造が糖鎖の末端に存在するようになったために PNA レクチンへの特異的結合能が出現したものと理解できる¹¹⁾¹²⁾。また、脱シアル化した N-グリコシド型結合糖鎖の方はその末端構造が Gal $\rightarrow$ GlcNAc となり PNA には認識されないものと考えられる⁹⁾。

正常妊婦や胞状奇胎患者の血中や尿中 hCG は全例で1%以下の PNA 結合率しか示さないところから、ほぼ完全にシアル化されているものと考えられる。これに対して絨毛癌患者では90%以上もの PNA 結合率を示した2例をはじめ、6例中4例で1%以上を示し、絨毛癌患者の血中や尿中には O-グリコシド型結合糖鎖のシアル酸を欠いた

不完全シアロ hCG が存在していることが判明した。

一般に、分泌される糖蛋白の糖鎖転移は、蛋白部分が mRNA より転写された直後かその転写中より開始され、小胞体やゴルジ体で段階的糖鎖転移の行われた後、末端へのシアル酸転移が分泌直前に細胞膜部分で起こると考えられている。細胞膜上の糖部分に関して、特にその末端糖の変異が癌化によつて生ずることが報告され、その転移酵素の活性異常が示唆されている²³⁾。分泌性糖蛋白である hCG においてもその糖鎖転移過程は膜糖鎖の場合に比して大差がないとされているところから、末端糖鎖異常としての不完全シアロ hCG の分泌は癌化に伴うものではないかと推定される。事実、絨毛癌や卵巣癌由来の培養細胞系で様々なシアル酸含量を示す hCG が分泌されているという報告がなされており、著者らも既に絨毛癌患者尿中にシアル酸を全く含まない hCG の存在することを報告した⁷⁾¹⁰⁾¹⁴⁾。さらに最近、Amr et al.も絨毛癌患者尿中で β subunit C 末端部分の O-グリコシド型結合糖鎖にシアル酸を欠く hCG の存在を報告している¹⁾。

一方、hCG の抽出精製過程における人工産物としての脱シアロ化の可能性も考慮しておく必要がある。Nwokoro et al.は正常妊婦尿から高度に精製した hCG でもその等電点には heterogeneity が存在していることを報告し、これがシアル酸含量の変化にもとづくものであろうと推察している¹⁸⁾。本研究では2例の胎状奇胎患者について抽出操作前の尿中 hCG と、同一尿より単離した精製 hCG の PNA 結合率を比較検討することで人工的に生ずる脱シアロ化の程度を調べてみた。その結果我々の用いた抽出精製過程によつても若干の人工的脱シアロ化が生ずるものの、その程度は全体の0.5%以下に過ぎないことを確認した。

脱シアロ化によつて hCG の生物活性や免疫活性が受ける影響に関しては、in vitro で hCG を段階的に脱シアロ化したモデルで検討され、ノイラミニダーゼ処理によつて免疫活性は殆ど影響を受けないのに対し、in vivo における生物活性は極度に低下してしまうことが明らかにされてい

る⁸⁾²⁰⁾。これはシアル酸除去によつて糖鎖末端に露出したガラクトースが肝のガラクトースレセプターに摂取され、極めて迅速に血中より消失してしまうためと考えられている³⁾。

今回の成績で血中 hCG の方が尿中 hCG よりも高い PNA 結合率を示したことから、血中不完全シアロ体は肝で摂取代謝され易いために、尿中へは排泄され難いものと考えられる。従つて大量の不完全シアロ hCG が分泌されているような症例ではその hCG 濃度が尿中におけるよりも血中で高値となるものと考えられ、臨床的にも尿中と血中で hCG 濃度に大きな差異を認める場合には不完全シアロ hCG の存在を考慮しておく必要がある。

今回検討した絨毛癌患者の中でも2例に正常妊婦と同じく1%以下の PNA 結合率しか示さないものが認められたことから、不完全シアロ hCG の分泌を絨毛癌に特異的な現象と断定することには若干の問題が残る。今後更に症例を重ね、病態との関連などをも含め検討を加える必要があろう。

以上の成績から PNA-Sepharose affinity chromatography は不完全シアロ hCG の簡便でかつ特異的な検出方法であり、hCG の質的分析からみた絨毛癌診断上の有用な手段となり得ると考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究に多大なる御協力を頂いた田辺恭三、浜本 保両博士に深謝致します。

文 献

1. Amr, S., Wehmann, R.E., Birken, S., Canfield, R.E. and Nisula, B.C.: Characterization of a carboxyterminal peptide fragment of human chorionic gonadotropin β subunit excreted in the urine of a woman with choriocarcinoma. J. Clin. Invest., 71: 329, 1982.
2. Ashitaka, Y., Nishimura, R., Endo, Y. and Tojo, S.: Subunits of human chorionic gonadotropin and their radioimmunoassays. Endocrinol. Jpn., 21: 429, 1974.
3. Ashwell, G. and Morell, A.G.: The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. Adv. Enzymol., 41: 99, 1974.
4. Bellisario, R., Garsen, R.B. and Bahl, O.P.: Human chorionic gonadotropin linear amino acid sequence of the α subunit. J. Biol. Chem.,

- 248 : 6796, 1973.
5. Bird, G.D. : Anti-T in peanut. *Vox Sang.*, 9 : 748, 1964.
 6. Braunstein, G.D., Kamdar, V.V., Kanabus, J. and Rasor, J. : Properties of human chorionic gonadotropin produced in vitro by ovarian carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47 : 326, 1978.
 7. Bridson, W.E., Ross, G.T. and Kohler, P.O. : Immunologic and biologic activity of chorionic gonadotropin synthesized by cloned choriocarcinoma cells in culture. *J. Clin. Endocr.*, 33 : 145, 1971.
 8. Dufau, M.L., Catt, K.J. and Tsuruhara, T. : Retention of in vitro biological activities by desialylated human lutenizing hormone and chorionic gonadotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44 : 1022, 1971.
 9. Endo, Y., Yamashita, K., Tachibana, Y., Tojo, S. and Kobata, A. : Structures of the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin. *J. Biochem. (Tokyo)*, 85 : 669, 1979.
 10. Hammond, J.M., Bridson, W.E., Kohler, P.O. and Chrambach, A. : Physical characteristics of immunoreactive chorionic gonadotropin produced in culture. *Endocrinology*, 89 : 801, 1971.
 11. Irimura, T., Kawaguchi, T., Terao, T. and Osawa, T. : Carbohydrate-binding specificity of the so-called galactose-specific phytohemagglutinins. *Carbohydr. Res.*, 39 : 317, 1975.
 12. Kessler, M.J., Mise, T., Ghai, R.D. and Bahl, O. : Structure and location of the O-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin. *J. Biol. Chem.*, 254 : 7809, 1979.
 13. Mizuochi, T., Nishimura, R., Derappe, C., Taniguchi, T., Hamamoto, T., Mochizuki, M. and Kobata, A. : Structure of the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin produced in choriocarcinoma. *J. Biol. Chem.*, 258 : 14126, 1983.
 14. Nishimura, R., Asitaka, Y. and Tojo, S. : The clinical evaluation of human chorionic gonadotropin (hCG) and its alpha-subunits in sera of patients with trophoblastic diseases. *Endocrinol. Japon.*, 26 : 575, 1980.
 15. Nishimura, R., Endo, Y., Tanabe, K., Ashitaka, Y. and Tojo, S. : The biochemical properties of human chorionic gonadotropin from patients with trophoblastic diseases. *J. Endocrinol. Invest.*, 4 : 349, 1981.
 16. Nishimura, R., Hamamoto, T., Morimoto, N., Ozawa, M., Ashitaka, Y. and Tojo, S. : The characterization of alpha-subunit of glycoprotein hormone produced by undifferentiated carcinoma. *Endocrinol. Japon.*, 29 : 11, 1982.
 17. Novogrodsky, A., Latan, R., Ravid, A. and Sharon, N. : Peanut agglutinin, a new mitogen that binds to galactosyl sites exposed after neuraminidase treatment. *J. Immunol.*, 119 : 1243, 1975.
 18. Nwokoro, N., Chen, H.H. and Chrambach, A. : Physical, biological, and immunological characterization of highly purified urinary human chorionic gonadotropin components separated by gel electrofocusing. *J. Clin. Invest.*, 71 : 329, 1982.
 19. Takasaki, S., Ikehira, H. and Kobata, A. : Increase of asparagine-linked oligosaccharides with branched outer chains caused by transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92 : 735, 1980.
 20. Tsuruhara, T., Van Hall, E.V., Dufan, M.L. and Catt, K.J. : Ovarian binding of intact and desialylated hCG in vivo and in vitro. *Endocrinology*, 91 : 463, 1972.
 21. Ulhenbruck, G., Pardoe, G.I. and Bird, G.W. G. : On the specificity of lectins with a broad agglutination spectrum. II. Studies on nature of the T-antigen and specific receptors for the lectin *Arachis hypogaea* (ground-nut). *Z. Immunitaetsforsch.*, 138 : 423, 1969.
 22. Warren, L. : The thiobarbituric acid assay of sialic acid. *J. Biol. Chem.*, 234 : 1971, 1959.
 23. Warren, L., Fuhrer, J.P. and Buck, C.A. : Surface glycoproteins of normal and transformed cells: A difference determined by sialic acid and a growth-dependent sialyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69 : 1838, 1972.
 24. Yoshima, H., Mizuochi, T., Ishii, M. and Kobata, A. : Structure of the asparagine-linked sugar chains of α -fetoprotein purified from human ascites fluid. *Cancer Res.*, 40 : 4276, 1980.

(No. 5513 昭59・5・9 受付)