

総説

ヒト絨毛性ゴナドトロピンの臨床的意義と測定における問題点

澁谷 雪子¹⁾ 高松 邦彦^{2, 3)} 足高 善彦¹⁾

Clinical Significance of hCG and Problems in Measuring hCG Levels using Recent Immunological Detection Assays

Yukiko SHIBUYA¹⁾, Kunihiko TAKAMATSU^{2, 3)}, and Yoshihiko ASHITAKA¹⁾

SUMMARY

Human chorionic gonadotropin is a glycoprotein hormone composed of α and β subunits, and shows a seat-belt structure three-dimensionally. The α subunit is identical to those of pituitary glycoprotein hormones, FSH, LH, and TSH. The biochemical characteristics of hCG, the amino acid sequences, carbohydrate structures, and biosynthetic pathways, were clarified in the 1970's. Recent genomic studies demonstrated that hCG is coded by multiple copies of genes that form a cluster at 19q13.33 on chromosome 19. A novel hCG molecule with a different immunoreactivity has been identified. It has the same amino acid sequences as regular hCG (R-hCG), but has a higher carbohydrate content than regular hCG, and has therefore been named hyperglycosylated hCG (H-hCG). Although R-hCG is secreted by the syncytiotrophoblast, H-hCG is produced in the cytotrophoblast, and promotes the invasion of the fertilized ovum into the endometrium during the first two weeks of gestation. H-hCG is also secreted in choriocarcinoma and is related to malignancies.

By the 1980's, hCG was being measured immunologically using polyclonal antibodies. Sandwich immunoassays with monoclonal antibodies and improved detection systems have now replaced the old immunoassay systems. The new systems have enabled the detection and discrimination of not only R-hCG and H-hCG but also various previously identified hCG-related peptides that result from degradation. However, false negative and false positive results, which are caused by increased levels of the hCG-related peptides and heterophilic antibodies, respectively, have been reported in some cases. To increase the accuracy of these analyses, specific protocols using both serum and urine as test samples should be applied to the measurement hCG levels, especially for diagnosis and treatment of choriocarcinoma.

キーワード: regular-hCG、hyperglycosylated hCG、hCG関連ペプチド、モノクローナル抗体、腫瘍マーカー

1) 保健科学部医療検査学科 2) 短期大学部口腔保健学科
3) 神戸常盤大学ライフサイエンス研究センター

はじめに

ヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin) は2つの相異なるサブユニット α 、 β から成る分子量が36.7 KDaの糖蛋白ホルモン^{1,2)}である。下垂体前葉から分泌される黄体化ホルモン (luteinizing hormone, LH)、卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone, FSH)、甲状腺刺激ホルモン (thyroid stimulating hormone, TSH) も同様に糖蛋白で、 α 、 β サブユニットから成るが、これらの α サブユニットは共通である。これらのホルモンを6~10M尿素処理でサブユニットに分けると、ホルモン受容体で認識されなくなり生物活性を失うが、リン酸緩衝液中に両サブユニットを置くと再結合し、受容体への結合で β サブユニット由来の生物活性が回復する^{3,4)}。hCGは主として絨毛組織で産生され、妊娠の早期診断や子宮外妊娠の診断、切迫流産の予後判定や絨毛性疾患の診断と治療効果判定等で後述するhCG関連蛋白と共に測定が重要な検査となる。

幼若ラット卵巢重量法⁵⁾に代表される生物学的測定法の時代、赤血球やラテックス粒子の凝集阻止法に代表されるポリクローナル抗体を利用する免疫学的測定法⁶⁾の時代、それに平行して微量のホルモンを測定するRadio-immunoassay (RIA) 法^{7,8)}の時代を経て、現代ではホルモンの抗原決定基 epitope に由来するモノクローナル抗体で測定する時代に入った^{9,10)}。予定月経日を過ぎても月経が来ない場合に、妊娠の診断を行える妊娠反応キットはポイント・オブ・ケア検査 (point of care testing, POCT) の代表と考えられ、モノクローナル抗体が使用される。米国では home pregnancy test devices として2001年で22種類が販売され、一般家庭でも年間600万個の使用が見られる¹¹⁾。モノクローナル抗体の利用は疾患の診断に特異性が高いと考えられるが、いわゆる従来からの hCG の他に、多くの悪性腫瘍組織 (子宮、卵巢、消化管、乳房、肺や膀胱など) や非妊婦下垂体からも hCG 類似関連物質が分泌される事が判明しており、交差反応性が問題となる^{12,13)}。キッ

トでは使用するモノクローナル抗体が認識するエピトープが違うため、測定値に50倍もの開きを生じることがあると報告¹⁴⁾されており、臨床の現場では混乱をもたらしている可能性も否定できない。

他方、ヒト遺伝子の総数は2004年20,000~25,000個と推定され¹⁵⁾、現在までに多くの疾患関連遺伝子等が特定されつつある。そこで本稿では、hCG に関する最近の遺伝子解析も含め、これまでに得られた hCG の生化学的性質と共に、hCG 測定の現時点における臨床的意義と問題点についてまとめた。

1. 受精卵の発育と子宮内膜への侵入とhCG

非妊時のヒト卵巢黄体細胞の寿命は14±2日であるが、hCG 刺激で黄体の寿命が延長し、黄体細胞からは黄体ホルモンとエストラジオールの分泌が高められ、子宮内膜が肥厚して妊娠が維持される。卵管膨大部で受精した受精卵は卵割を繰り返して膨大化しつつ子宮腔に向って、卵管の蠕動運動と卵管上皮細胞の絨毛運動で移動し、受精後第4日目の桑実胚期に子宮腔に達し、第6日、即ち、最終月経初日から20日頃に子宮内膜に接触 (着床) し、更に子宮内膜内に侵入する。この頃の受精卵を胚盤胞と言ひ、胚盤胞内では腔が形成され、内細胞塊と外細胞塊 (栄養膜) に分化し、前者は胎児へと発育してゆく。栄養膜層は1細胞に1個の核をもつ cytotrophoblast (C細胞、栄養膜細胞、Langhans細胞) 層で、子宮内膜に最も早く接触してその中へ侵入する。受精後9日目頃の栄養膜細胞の外側には栄養膜細胞が互いに融合して、細胞境界が不明瞭になり、多核の細胞集団である syncytiotrophoblast (S細胞、栄養膜合胞細胞) へと変化し、両者が突起状になって子宮内膜機能層に侵入する (図1)¹⁶⁾。突起部を原始絨毛と呼び、妊娠15週 (妊娠第4ヵ月末) 頃には絨毛と母体子宮内膜機能層とで胎盤の形成が完成する。従来から hCG の産生場所はS細胞であると考えられてきたが、絨毛組織に抗 hCG ポリクローナル抗体を反応させて十分量の hCG を吸収後に、抗 hCG 抗体との交差率が僅かに1%の

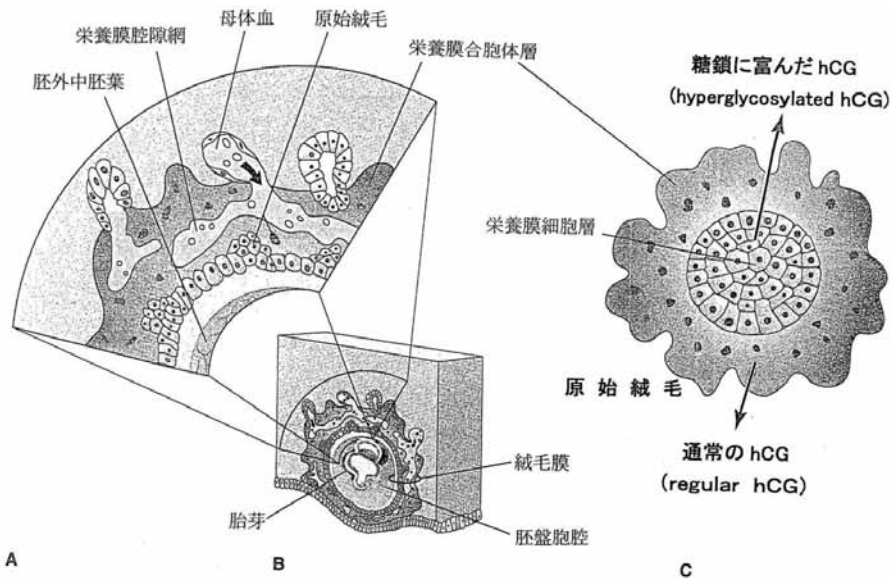


図1 受精後9日目頃の胚盤胞の断面図 (Moore KL. and Persaud TVN16) より引用、一部改図)

原始絨毛のS細胞からR-hCG (従来のhCG, regular hCG) が、C細胞からH-hCG (糖鎖を多く含むhCG, hyperglycosylated hCG) が分泌される³⁹⁾ことを示す
 A: 絨毛膜部分の拡大図、B: 胚盤胞、C: 原始絨毛の横断面

FITC 標識抗 hCG α 血清と反応させることにより、遊離型 hCG α の局在がC細胞でも確認された¹⁷⁾。その後の研究でC細胞がS細胞に変化する直前に先ず hCG α サブユニットが形成され、C細胞からS細胞への分化過程で hCG β サブユニットの形成が起り、両サブユニットの結合で hCG が形成されることが明らかにされた¹⁷⁾。

妊婦血中におけるポリクローナル抗体を用いて測定した hCG (後述する regular hCG、R-hCG) と、そのサブユニットの動態を図2^{8,18)}に示す。排卵後

約1週間、すなわち受精卵が母体と接触した頃から母体血中で hCG 検出が可能となり、以後そのレベルは急増して妊娠8~10週頃に最高値 (血中: $8 \sim 16 \times 10^4$ mIU/mL) を示す。その後、漸減して妊娠20週頃に底値 ($2 \sim 4 \times 10^4$ mIU/mL) となり、分娩までその程度の値を維持する。hCG β -mRNA が hCG 産生量を規定し、hCG β と結合しなかった余剰の hCG α が遊離型の形で母体の血中へ出ると考えられた¹⁸⁾。

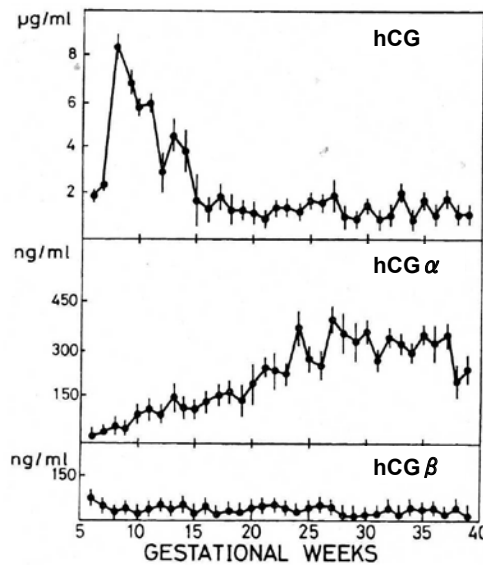


図2 妊娠経過に伴う妊婦血中hCG、hCG α 、hCG β の推移 (Ashitaka, Y. ら^{8,18)})
 1 μ g hCG は凡そ 12IU に相当する

2. hCGの生化学

1970年代初頭に精力的な hCG の純化精製と α 、 β 両サブユニットへの分離が試みられ、アミノ酸配列が決定され^{2,19,20)} (図3)、hCG の産生に際して必要な両サブユニットシグナルペプチドのアミノ酸配列も判明した²¹⁾ (図4)。なお、hCG β サブユニットと LH β サブユニットはN末端から111番までのアミノ酸残基配列が極めて類似しているが、LH β サブユニットは116番でC末端側が終了するのに対して、hCG β サブユニットでは更に34個のアミノ

酸残基が付加されるので、この部 (112番-145番) を hCG β C-terminal peptide (hCG β CTP) と呼ぶ。さらに、これらのサブユニットの結晶化により、セリン残基間のS-S結合の位置が確定した²²⁾。その結果を模式化した菅沼ら²³⁾の成績を図5に示す。シスチン残基間のS-S結合の部位を黒棒で示すと、 α サブユニットには5か所、 β サブユニットには7か所存在し、両サブユニットが結合して立体的にはシートベルト状の構造を示し、受容体で認識されて生物学的作用が発揮される²²⁻²⁴⁾。

hCG糖鎖にはN-アスパラギン結合型糖鎖とO-セ

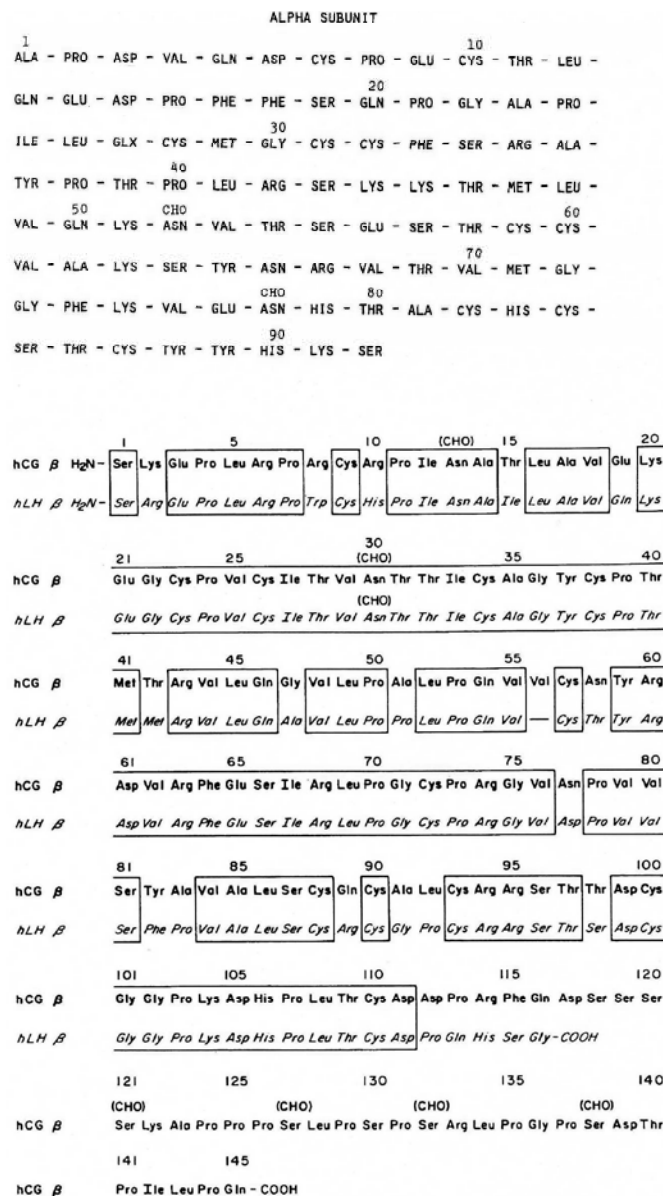


図3 hCG α サブユニットのアミノ酸配列 (上図) と、hCG β サブユニット並びに hLH β サブユニットのアミノ酸配列²⁾ (下図)

2種類の β サブユニットでアミノ酸の配列が一致する部位を棒線で囲んでいる。また糖鎖の付加する位置を CHO で示している。

胎盤性 hCG α のシグナルペプチド

-24 -20
 Met-Asp-Tyr-Tyr-Arg-Lys-Tyr-Ala-
 -16 -10
 Ala-Ile-Phe-Leu-Val-Thr-Leu-Ser-Val-
 -7 -1
 Phe-Leu-His-Val-Leu-His-Ser-

胎盤性 hCG β のシグナルペプチド

-20 -15
 Met-Glu-Met-Phe-Gln-Gly-Leu-Leu-
 -12 -5
 Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ser-Met-Gly-
 -4 -1
 Gly-Thr-Trp-Ala-

図4 胎盤性 hCG α と胎盤性 hCG β のシグナルペプチド (Birken, S. ら²¹⁾)

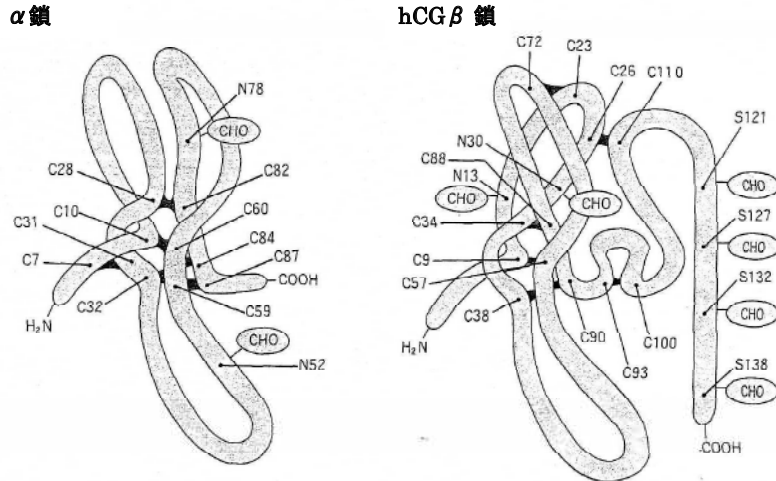
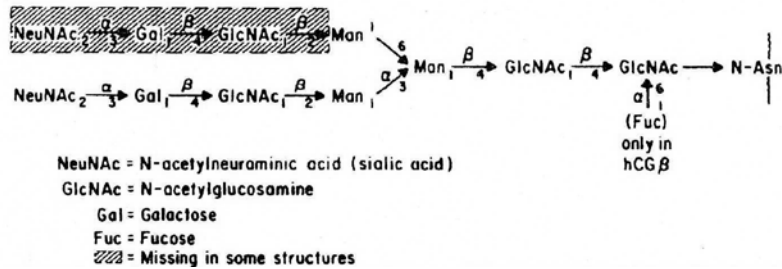


図5 α鎖と hCG β鎖の立体構造 (Lapthorn, A.J. ら²²⁾ の図をより単純化した菅沼信彦、古橋 円の論文²³⁾より引用
 S-S 結合の部位を黒棒で、糖鎖部位を CHO で示す

N-アスパラギン結合型糖鎖 (hCG α に 4 か所、hCG β に 2 か所存在する)



O-セリン結合型糖鎖 (hCG α CTP に 4 か所存在する)

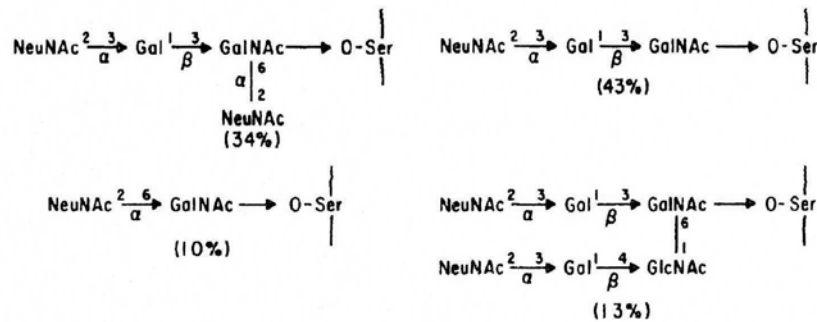


図6 N-アスパラギン結合糖鎖とO-セリン結合型糖鎖の構造 (Canfield, RE. ら¹⁰⁾)
 斜線部分の糖鎖は欠けている場合がある事を示している

リン結合型糖鎖がある。αサブユニットの52位のアスパラギン結合型糖鎖は、4種の糖蛋白ホルモンの受容体におけるc-AMPを介した情報伝達を担うために必須であるとされている²²⁾。マンノースに富むN-アスパラギン結合型糖鎖がhCGαの52位と78位、hCGβの13位と80位に結合する。O-セリン結合型糖鎖はhCGβのCTP側にある121、127、132、138位の4個のセリン残基に付着する^{19,25-28)}。Canfieldら¹⁰⁾はこの4個のO-セリン結合型糖鎖の構造が均一ではなく、4種類の付着様式が見られ、N-アスパラギン結合型糖鎖でも一部を欠損することを示した(図6¹⁰⁾)。他方、Coleら²⁹⁾は妊娠早期に原始絨毛のC細胞から絨毛癌細胞由来と同一の腫瘍性hCG(H-hCG: hyperglycosylated hCG)が分泌されていることを見いだした。H-hCGは正常妊娠hCGと同一のアミノ酸配列を示すが、より複雑化した糖鎖構造を持っている²⁹⁾。

3. hCG 遺伝子に関する最近の知見

1970年代後半から遺伝子レベルでの解析が行われて現代に至っており、そのまとめを図7と表1³⁰⁾に示す。表1は、ヒトゲノム配列におけるヒトCGA/CGB遺伝子のクラスター情報と遺伝子情報(遺伝子名、別名、遺伝子番号、染色体番号、染色体位

置、鎖、転写開始点、転写終了点、OMIM番号、エクソン数、アミノ酸残基数)を示している。CGA遺伝子は、第6染色体(14.1位置)に1個が存在し、hCG、LH、FSH、TSHの何れのαサブユニットの産生もこの遺伝子に由来し、4エクソンから構成される。hCGβサブユニットをコードするCGB遺伝子は第19番染色体上の13.33位にあり、遺伝子としてはCGB1からCGB8まで報告されている。しかし、CGB7とCGB6は同一遺伝子の別名であり、実際にはCGB1からCGB8は7個の遺伝子から構成される(表1)³¹⁾。CGB3の別名はCGBであり、CGB4の別名はLHB(LHβ)と呼ばれている(表1)。これらの7つの遺伝子は、図7に示すように、染色体19q13.33にクラスターを形成し、すべて3エクソンから構成されている。CGB遺伝子ファミリーは、転写の方向などに規則性はない。しかし、アミノ酸配列の長さは155アミノ酸から165アミノ酸と10アミノ酸程の幅はあるが、アミノ酸配列は酷似している(data not shown)。胎盤でhCGβを発現する遺伝子で、強く発現するのはCGB3/5/8の3種類で、CGB1/2/7の発現は極めて弱い³²⁾。これについては、今後1人のヒトのゲノムシーケンスを行い、さらに詳細なアミノ酸シーケンスを行って決定するなど、将来の解析に期待したい。CGB4はmRNAの発現を下垂体で生じる。CGB7は正常の

表1 Feb. 2009(CRCh37 / h19)のヒトゲノム配列における、ヒトCGA / CGB 遺伝子クラスターの情報³⁰⁾
(遺伝子名、遺伝子番号、染色体位置、鎖(転写方向)、転写開始位置、転写終了位置、OMM番号示す)

CGAはhCG、LH、FSH、TSHのαサブユニットの遺伝子
CGB1~8はhCGβサブユニットの遺伝子

遺伝子名	別名	遺伝子番号	染色体番号	染色体位置	鎖	開始番号	終了番号	OMIM番号	エクソン数	アミノ酸残基数
CGA		NM_000735	6	6q14.3	-	87795222	87804824	118850	4	116
CGB1		NM_033377	19	19q13.33	-	49538827	49540191	608823	3	155
CGB2		NM_033378	19	19q13.33	+	49535130	49536494	608824	3	163
CGB3	CGB	NM_000737	19	19q13.33	-	49526127	49527593	118860	3	165
CGB4	LHB	NM_000894	19	19q13.33	-	49519238	49520347	152780	3	141
CGB5		NM_033043	19	19q13.33	+	49547102	48548567	608825	3	165
CGB7	CBB6	NM_033142	19	19q13.33	-	49557532	49558997	608826	3	165
CGB8		NM_033183	19	19q13.33	-	49550896	49552368	608827	3	165

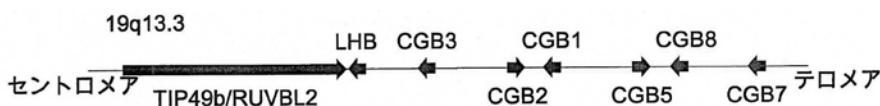


図7 ヒト染色体19番(19.3)のLHB / CGB 遺伝子クラスターにおけるゲノム構造³⁰⁾

乳房組織でも発現する³³⁾が、その意義は不明である。ヒト CGB3/5/8 isoform 遺伝子は弱いながらも下垂体でも発現する³⁴⁾。

4. モノクローナル抗体の利用で認められたhCG関連ペプチドに関する知見

ポリクローナル抗体により血中や尿中の hCG を測定していた時代 (1970年代) に続き、1980年初頭頃になると、正常絨毛中にも未完成の hCG 関連物質が存在することや、血中や腎臓で代謝された関連物質が溶出されてくる可能性が判明してきた³⁵⁾。その後、モノクローナル抗体が認識する抗原決定基が解明され (図8)^{10,36)}、これらの抗体を用いた hCG 関連物質の測定で、従来の hCG、hCG α や hCG β サブユニットに加えて、糖質を多く含む H-hCG や、後述する nicked hCG、hCG β core fragment、hCG β CTP が欠損した分画などの数多くの関連ペプチドの存在が明らかになった (図9)¹⁰⁾。

a) hyperglycosylated hCG (H-hCG)、hCG β core fragment (β CF) と nicked hCG :

Heip ら³⁷⁾ は、正確な妊娠週数と hCG 値の関係を調べるために、体外受精胚移植法 (IVF ET) が成功した妊娠例について、従来の hCG (regular hCG, R-hCG) 測定法で妊娠4週末の血清 hCG 値を測定した。平均205mIU/mLであったが、モノクローナル抗体を使用した方法ではその範囲が3~7,340mIU/mLと非常に広範囲に亘っていた。Cole

ら^{29,38-40)}は、妊娠初期には子宮内膜に絨毛が浸潤する約2週間に亘ってC細胞から hCG が分泌され、この hCG が通常の hCG とは異なり、浸潤性の強い絨毛癌由来培養細胞から抽出・純化したhCG (H-hCG) とアミノ酸配列や免疫学的性格は同一であることを示した。この hCG は前述したように R-hCG のアミノ酸配列は同じであるが、1.5倍量の N型と2倍量のO型結合糖鎖を有する分子量が41KDa~42KDaの hyperglycosylated hCG (H-hCG) である。Kovalevskaya ら^{41,42)}も Cole から提供された絨毛癌患者尿から精製した H-hCG を抗原として作成されたモノクローナル抗体を用いて同様の結果を報告した (図10)。精製 R-hCG、H-hCG と後述する下垂体由来の hCG に¹²⁵Iを標識して、抗 H-hCG 抗体への結合率を調べると、精製 R-hCG と下垂体 hCG の反応性が H-hCG の場合よりも悪かった (図10,A) のに対して、抗 R-hCG 抗体に対しては3種の hCG で上述とは逆の結果が得られた (図10,B)。さらに、最終月経後4週という極く妊娠早期には H-hCG がC細胞から分泌され、やや遅れてCとS細胞の共同作業で産生される本来の hCG (R-hCG) が分泌されるということが明らかになった (図11,A)⁴⁷⁾。また、妊娠成功例に較べて流産に至った症例では、R-hCG よりも H-hCG の分泌が低い事も判明した (図11,B)⁴²⁾。このように H-hCG は、妊娠の経緯や絨毛癌と関連する。H-hCG の測定系が確立した米国では hCG-H test (Quest

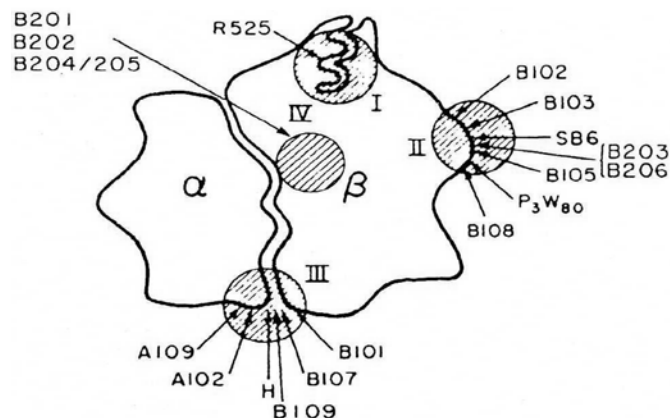


図8 各種モノクローナル抗体が認識する hCG のエピトープ (Canfield, RE. ら¹⁰⁾)

I : β CTP 部位を認識、II : 遊離 β サブユニットと intact hCG を認識、III : α と β サブユニットの結合を認識、IV : 遊離 β サブユニットと β fragment を認識する
A、B 等の記号と数字は抗体に固有に割り振られたものである

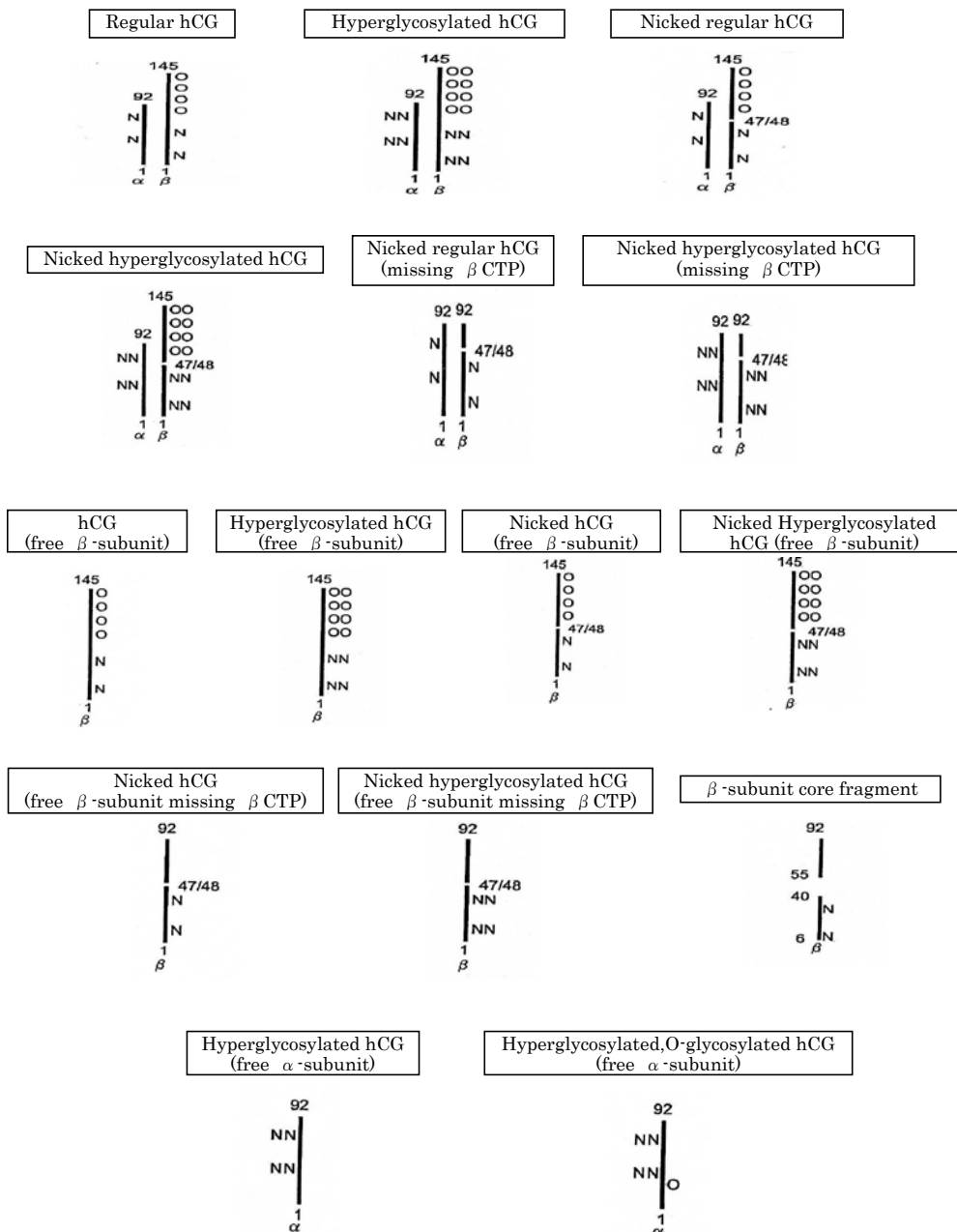


図9 各種 hCG の絨毛組織、血中、尿中（腎における）での代謝産物（Cole, LA. ら⁴³より一部改図）
 O：Oセリン結合型糖鎖、N：Nアスパラギン結合型糖鎖の部位

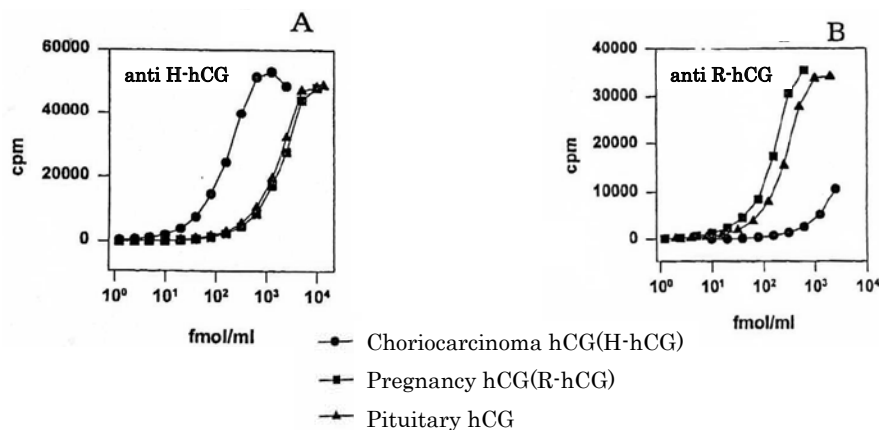


図10 H-hCG と R-hCG の免疫学的な反応性の差

¹²⁵I を標識した絨毛癌患者由来尿 hCG（純化精製された H-hCG）、正常妊婦 hCG（純化精製 R-hCG）、下垂体由来 hCG の抗モノクローナル H-hCG 抗体への反応性（図 A）と、抗モノクローナル R-hCG 抗体への反応性（図 B）を示す（Kovalevskaya, R. ら^{41,42}）

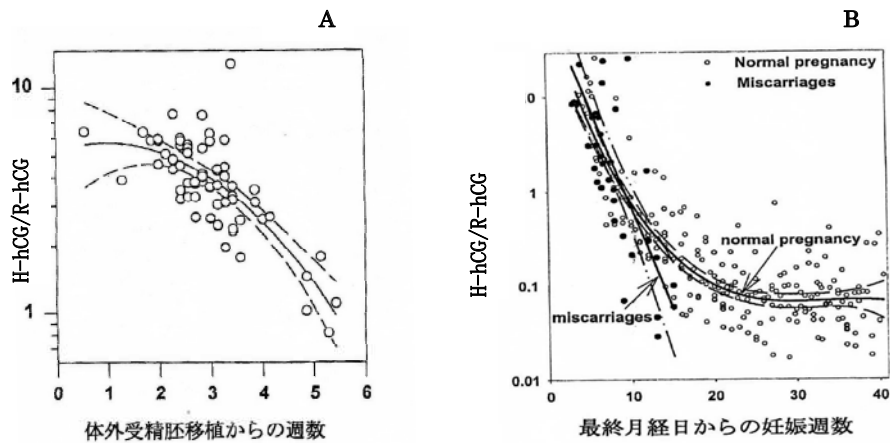


図 11 妊娠の経緯における H-hCG、R-hCG の変動

妊婦尿中 hCG 値を絨毛癌患者尿由来 hCG に対する抗体で測定した値 (H-hCG) を、正常妊婦尿由来 hCG に対する抗体で測定した値 (R-hCG) で除した値の妊娠時の推移を示した

A: 体外受精胚移植後の H-hCG/R-hCG

両 hCG の比率から妊娠早期では H-hCG の分泌量の高い事が判る。

B: 全妊娠期間を通じての H-hCG/R-hCG

流産例ではその比率が早期に下がってきている

Diagnostics Inc., order code 4823) が絨毛癌の経過観察、妊娠の早期診断や子宮外妊娠、妊娠中期における Down 症の診断などに利用されている³⁹⁾。

b) nicked hCG と β core fragment: 絨毛で hCG が産生される際に、 β サブユニットの 47 位 (グリシン) と 48 位 (バリン) の間で結合が切れているが、他位のシスチン間の S-S 結合は保たれている hCG を nicked hCG と呼ぶ。血清中に放出されると遊離 α サブユニットと遊離 nicked β サブユニットに解離し、更に CTP 部分が外れるとなお一層の修飾を受けて N 側の 6 番 (アルギニン) から 40 番 (スレオニン) までのペプチドと、55 番 (バリン) から 92 番 (ロイシン) までのペプチドが 3 本の S-S 結合で繋がった β core fragment になって尿中に排泄される⁴³⁾。なお、1 番～5 番、41 番～54 番、93 番～145 番 (hCG β CTP 相当部分) は抗原性を持たず hCG β のエピトープとはならないことが判明しており、殆どの β サブユニットに由来するモノクローナル抗体で認識されることが core fragment と呼ばれる所以である。hCG β core fragment は分子量が約 15KDa の糖蛋白で、hCG β CTP 部分を欠くので抗 hCG β CTP 抗体には結合しない。正常妊婦でも絨毛癌患者でも、血中や尿中に hCG 関連ペプチドの代謝物が大量に排泄されるので⁴⁴⁾、モノクローナル

抗体を用いる二抗体法による hCG 測定法には後述するような新しい問題点を提起する事になった。なお、hCG の免疫学的測定法の利用ないし開発のために、WHO から WHO 標準物質としてこれらの関連蛋白が配布されるので、研究開発用にこれらの物質を利用することも可能である⁴⁵⁾。図 9 に 15 種類の hCG と hCG 関連ペプチドを略図で示す。

c) ヒト下垂体性 hCG: Birken ら¹²⁾ は 20 代女性の脳組織からヒト下垂体由来 hCG (human pituitary chorionic gonadotropin) を抽出・精製した。妊婦尿由来の R-hCG と同様に α と β サブユニットからなり、類似のアミノ酸配列を示し、 β CTP を有し、hCG の約 50% の c-AMP 活性を生じる事を見いだした。さらには更年期婦人でも同様に下垂体 hCG 様物質が分泌されている。それらの意義は未だ不明であるが、低エストロゲン状態では視床下部から分泌されるゴナドトロピン放出因子 (GnRH) の放出を抑制しないので、GnRH の放出を招き、LH と下垂体 hCG の放出を生じると言われている⁴⁶⁾。下垂体由来 hCG の isoform 遺伝子の存在も判明している³⁴⁾。

5. hCG の測定法と臨床における hCG モニタリングの実際

a) モノクローナル抗体を用いた hCG と hCG 関連ペプチドの測定法

hCG と LHは α サブユニットの共通性と β サブユニットの類似部分が多いために、ポリクローナル抗体を用いると、LH の交差反応性を有する。そのため測定感度を上昇させると LH を検出するおそれがあるため hCG 測定感度を1,000mIU/mL と低く設定する必要があった。現在の hCG 測定では LH には存在しない hCG β CTP に特異的なポリクローナル抗体⁴⁷⁾や、モノクローナル抗体の有効性が示されている⁴⁸⁾。現在医療現場で使用される hCG 関連の検査薬には表 2 に示す13種があるが、何れの抗原決定基を用いるかは企業秘密であり、測定された物を hCG そのものと考えすることは早計である。測定原理から1) 標識抗原抗体反応を用いた化学発光酵素標識免疫測定法 (chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA) (表 2、No.1 ~ 2) と電気化学発光免疫測定法 (electro chemiluminescent immunoassay, ECLIA) (表 2、No.3)、2) ラテックス凝集 (比濁) 法 (表 2、No.4 ~ 6)、3) イムノクロマトグラフィーを用いた金コロイドイムノクロマトグラフィー法 (表 2、No.7 ~ 9) と色素ラテックス粒子イムノクロマトグラフィー法 (表 2、No.10 ~ 12)、色素コロイド粒子イムノクロマトグラフィー法 (表 2、No.13) に分類される。定量分

析が可能な検査薬はNo.1 ~ 4で、自動分析装置が用いられる。No.1 ~ 3は2種類のモノクローナル抗体が抗原となる hCG 関連物質を挟む形のサンドイッチ法である。No.1は一般的な CLEIA 法とアビジン・ビオチン結合を組み合わせたキット固有の方法である。ビオチン化抗 hCG モノクローナル抗体と酵素標識抗 hCG モノクローナル抗体で hCG 関連物質を挟み、この複合体をウェルに固定化されたアビジンに結合させる。No.2は磁性ビーズに固定化した抗 hCG モノクローナル抗体と酵素標識抗 hCG モノクローナル抗体で hCG 関連物質を挟む。この2つのキットは最後に標識酵素に対する基質を反応させて発光させる。酵素には HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) やアルカリホスファターゼを用いる。(図12、①~②) No.3は一般的な ECLIA 法とアビジン・ビオチン結合を組み合わせたキット固有の方法である。ビオチン化抗 hCG モノクローナル抗体とルテリウム (電気発光物質) 標識抗 hCG モノクローナル抗体で hCG 関連物質を挟み、この複合体をアビジンコーティングした磁性マイクロ粒子に結合させ、最後に電解反応によりルテリウムを励起反応で発光させる。(図12、③) No.4は hCG 関連物質を抗 hCG 抗体感作ラテックスと反応、凝集させ、凝集による比濁度を測定する。このラテックス凝集免疫比濁法は感度の点で劣るが、後述するようにヒトの最終代謝産物である尿をも簡単に検体に用いることができる。

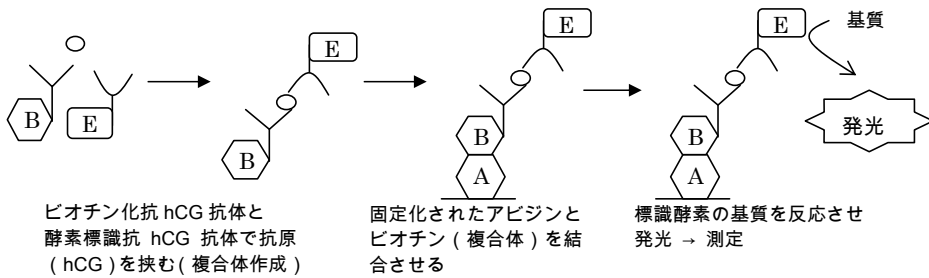
表 2 医療機関向け妊娠診断薬一覧表

No.	商品名	発売元	検体	測定方法	形態	測定範囲 mIU/mL	定量測定	測定時間	確信性を生じる濃度
1	ビトロス®HCGII	Ortho Clinical Diagnostics	血清(血漿)	化学発光・酵素免疫測定法CLEIA (改良法)	自動分析装置	2.39~15,000	○	約20分	
2	Eテスト「TOSOH」II (βHCG)	東ソー	血清(血漿)	化学発光・酵素免疫測定法CLEIA	自動分析装置	0.5~400	○	約15分	200,000mIU/mL以上
3	エクルーシスの試薬 HCG+βII	Roche Diagnostics	血清(血漿)	電気化学発光免疫測定法 ECLIA (改良法)	自動分析装置	0.1~10,000	○	約20分	750,000mIU/mL以上
4	IX試薬 栄研 hCG-II	栄研化学	血清(血漿)、尿	ラテックス凝集免疫比濁法 LA	自動分析装置	25~1500	○	4分	
5	グステート® スライド 栄研	栄研化学	血清、尿	ラテックス凝集法 LA	スライド	1~3,000		3分	
6	ハイツインクロン® hCG 栄研	栄研化学	尿	ラテックス凝集法 LA	トレイ	2~		2時間	1,000,000mIU/mL以上
7	チェックワン® ファスト	アラクス	尿	金コロイド免疫 クロマトグラフィー法	スティック	25~3,000,000		1分	
8	hCGテストテジー®	アラクス	尿	金コロイド免疫 クロマトグラフィー法	スティック	25~3,000,000		2分	
9	GチェックCA	ニプロ	尿	金コロイド免疫 クロマトグラフィー法	ストリップ	50~1,000,000		1分	
10	クイックビュー® フォンステップhCG test	アルフレックスファーマ	尿	色素ラテックス粒子免疫 クロマトグラフィー法	カセット	25~		3分	
11	ゴナステックW	持田製薬	尿	色素ラテックス粒子免疫 クロマトグラフィー法	ストリップ	25~		3分	1,000,000mIU/mL以上
12	クリアビュー EASY HCG	インバネス・メディカル・ジャパン	尿	色素ラテックス粒子免疫 クロマトグラフィー法	スティック	25~500,000		3分	500,000mIU/mL以上
13	HCGテストバック・プラス®OBC	三和化学研究所	尿	色素コロイド粒子免疫 クロマトグラフィー法	ディスク	25~		5分	1,000,000mIU/mL以上

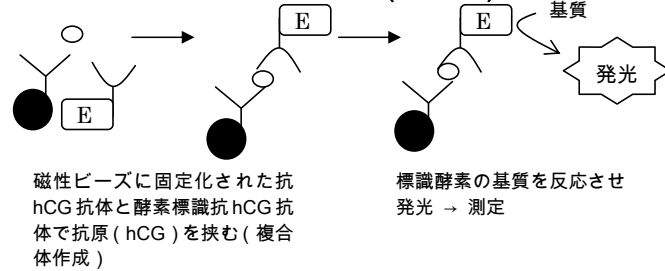
標識抗原抗体反応

① 表2、No.1のキットの測定原理

CLEIA法とアビジン・ビオチン結合を組み合わせたキット固有の方法 (CLEIA法の改良法)



② 表2、No.2のキットの測定原理 (CLEIA法)



③ 表2、No.3のキットの測定原理

ECLIA法とアビジン・ビオチン結合を組み合わせたキット固有の方法 (ECLIA法の改良法)

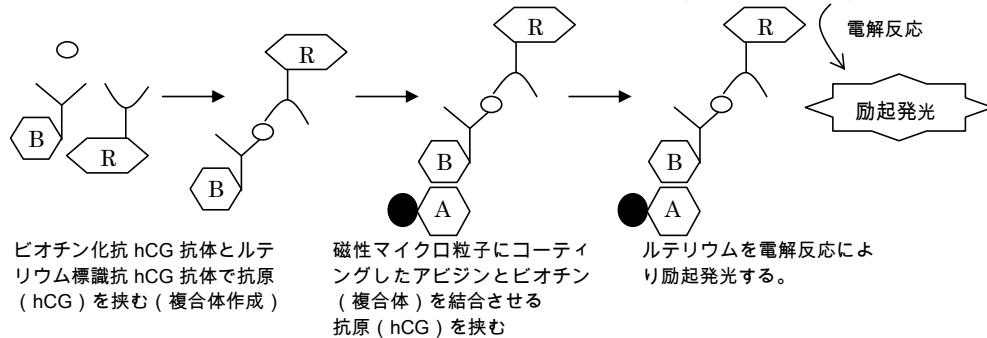
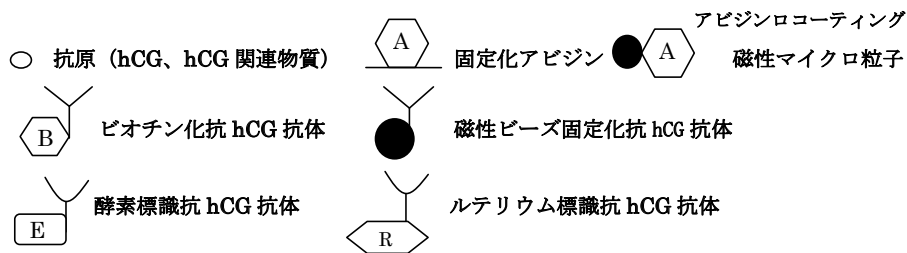


図12 hCGとhCG関連蛋白測定法の原理 (標識抗原抗体反応)



b) 臨床におけるhCGとhCG関連抗原測定の実際

産婦人科診療ガイドライン産科編2008⁴⁹⁾によれば、現在の妊娠反応テストは尿中 hCG が25mIU/mL に感度が調整されており、妊娠4週でも妊娠反応が陽性になる。超音波検査で子宮内に妊娠構造物を確認できない場合は、正常妊娠、流産、子宮外妊娠の三者を鑑別する必要があり、このことを患者に伝え、数日後に再度経膈超音波検査を行う事を奨めている。hCG が1000mIU/mL 以上 (尿中および血

中) の場合は通常、経膈超音波で胎嚢が子宮内に確認される。妊娠5～6週以降で胎嚢が子宮腔内に確認できなければ子宮外妊娠と流産を念頭にフォローする、とされている。妊娠早期に hCG を定量し、48時間後にその値が2倍以上に上昇しなければ子宮外妊娠の可能性が高い⁵⁰⁾。化学的流産 (chemical abortion) や妊娠早期の流産の可能性は全ての妊婦に該当する共通の問題であるから、「次回予定月経日から4日間は妊娠反応の実施をしないで待ちな

さい」という医師もいる⁵¹⁾。妊娠中期に減少する H-hCG 値が Down 症では正常域値の 9 倍も高いと言われている⁵²⁾。

胎状奇胎、侵入奇胎、絨毛癌は hCG を産生する絨毛性疾患として知られ、これらの疾患の診断やフォローに hCG の測定が不可欠である。hCG が 50 万 mIU/mL 以上であれば胎状奇胎の可能性が高く、100 万 mIU/mL 以上であればほぼ確実であるとされているが、hCG に異常値を示さない例もあり、病理診断で確認する必要がある。奇胎娩出後 5 週間で 1,000 mIU/mL、8 週で 100 mIU/mL、20 週でカットオフ値以下をチェックポイントとし、hCG 値が何れのポイントをも下回っておれば経過順調型とされる。経過非順調型では病巣の発見に努めると共に、化学療法や手術療法が考慮される⁵³⁾。hCG 値が下垂体 LH レベルまで低下すると、上述の hCG β CTP 測定が役に立つ^{47,48)}が、最近では R-hCG や H-hCG の測定よりも、尿中に大量に排泄されるこれらの代謝産物である hCG β core fragment (β CF) が動態を追跡する事を有効とする報告が多数^{54,55)}みられる。

絨毛由来抗原の一つである hCG が絨毛関連以外の悪性腫瘍患者血中でも検出されるが、従来は概して抗 hCG β 抗体で測定した腫瘍性 hCG 濃度が低値で、陽性率も低く、臨床的有用性に乏しかった。他方、hCG の様々な抗原決定基に対する抗体を用いた研究から、多くの婦人科腫瘍で hCG 関連物質の分泌が報告^{12,56-58)}されるようになり、代謝物である尿中 hCG β core fragment が妊婦や絨毛性疾患患者のみならず、膀胱腫瘍や腎盂尿管腫瘍でも高い陽性率が報告されている⁵⁹⁾。本邦でも卵巣癌や子宮頸癌、子宮体癌で高値を示す頻度が高く、hCG 関連ペプチドが代謝されて尿中に出るためか、血中値が低くても、血中の腫瘍マーカーである CA125、CA19-9、SCC 等との組合せで検出率が高まることが判明した⁶⁰⁾。

c) 測定上の問題点

1. **false positive 例** : Cole ら⁶¹⁾は血中 hCG 測定の結果から絨毛性疾患と診断され、不必要な化学療法

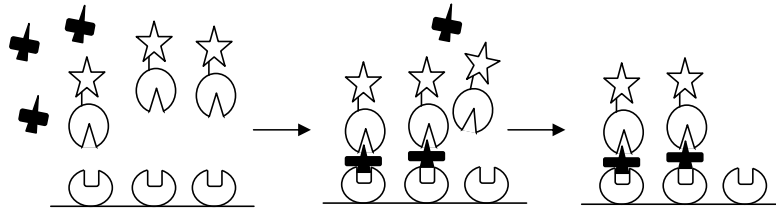
や子宮摘出術を受けた 12 例の false positive 例を報告し、モノクローナル抗体を用いるサンドイッチ免疫測定法の欠点を指摘した。詳細は不明であるが、健康人の約 3.4% がヒト以外の動物に対する異好性抗体 (例えば抗マウス IgG 抗体) を保有すると言われ、モノクローナル抗体 (マウス抗体) を使用する場合は図 13 に占めすような干渉反応を起こす可能性が示されている。このため必ず血清と尿の両者を検体に用いて測定することを提案している。

2. **false negative 例** : 臨床的に問題になるのは抗原量が極端に多い場合で、例えば H-hCG は妊娠初期にしか表れないが、R-hCG は妊娠初期にピークを示すも、妊娠中期になるとその代謝産物である hCG β core fragment が大量に尿中に出現してくる。従って切迫流産例で尿中 hCG を測定した場合に、2 抗体サンドイッチ法では、捕捉抗体が hCG β core fragment にも反応する抗体であれば、hCG が反応する場を hCG β core fragment に奪われる。この時、検出抗体が core 以外のエピトープを認識する抗体である場合は反応できず、結果的には hCG が陰性を示すことになる (high dose hook effect)⁶²⁾ (図 13)。従って、測定結果をそのまま引用するのではなく、必ず稀釈尿での測定を行って、測定値を再評価することが必要である。

おわりに

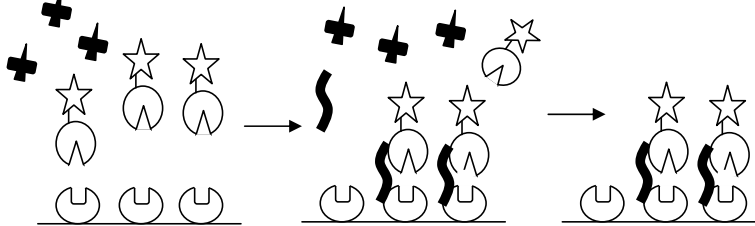
妊娠早期には従来の hCG (R-hCG) とともに絨毛癌で認められる多糖類の H-hCG が分泌される。H-hCG は妊娠の経緯や病態と関連することから、その測定は臨床的に重要である。また種々の hCG 関連ペプチドの存在も明らかにされている。近年、モノクローナル抗体を利用する方法の開発により、これらの hCG や hCG 関連ペプチドを区別して測定できることが可能となった。しかしながら、これらの最新の方法による測定によっても、偽陰性や偽陽性の例が報告されており、症例によっては血清測定のみでの hCG の追跡は誤った判断に陥る可能性があることについて述べた。

A 正常の反応



2 抗体サンドイッチ法における偽陽性反応メカニズム

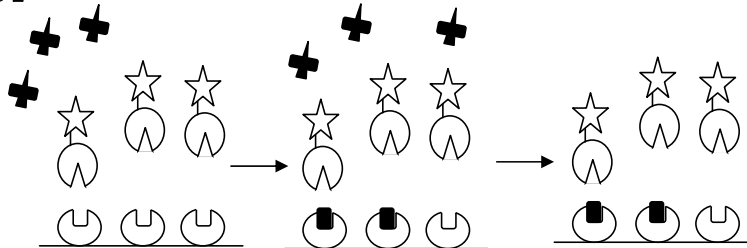
B-1 異好性抗マウス抗体による偽陽性反応



標識抗 hCG 抗体と固定相抗 hCG 抗体が異好性抗マウス IgG 抗体により結合し偽陽性となる

2 抗体サンドイッチ法における偽陰性反応メカニズム

B-2



固定相抗 hCG 抗体と他の物質と結合し偽陰性となる

図 13 hCG 測定における偽陽性反応メカニズムと偽陰性反応メカニズム



文 献

- 1) Bahl, O.P.: Human chorionic gonadotropin. I. Purification and physicochemical properties., J. Biol. Chem., 244(3), 567-574, 1969.
- 2) Birken, S. and Canfield, R.E.: Chemistry and immunochemistry of human chorionic gonadotropin. In *Chorionic Gonadotropin*, S.J. Segal Ed., 65-88, Plenum Press, New York and London, 1980.
- 3) Swaminathan, N. and Bahl, O.P.: Dissociation and recombination of the subunits of human chorionic gonadotropin., Biochem. Biophys. Res. Commun., 40(2), 422-427, 1970.
- 4) Pierce, J.G., Bahl, O.P., Cornell, J.S. and Swaminathan, N: Biologically active hormones prepared by recombination of the α chain of human chorionic gonadotropin and the hormone-specific chain of bovine thyrotropin or of bovine luteinizing hormone., J. Biol. Chem., 246(7), 2321-2324, 1971.
- 5) Steelman, S.L and Pohley, F.M.: Assay of the follicle stimulating hormone based on

- the augmentation with human chorionic gonadotropin., *Endocrinology*, 53(6), 604-616, 1953.
- 6) Wide, L., and Gemzell, C.A.: An immunological pregnancy test., *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 35, 261-267, 1960.
- 7) Miyachi, Y., Vaitukaitis, J.L., Nischlag, E., Lipsett, M.B: Enzymatic radioiodination of gonadotropins., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34(1), 23-28, 1972.
- 8) Ashitaka, Y., Nishimura, R., Endo, Y. and Tojo, S.: Subunits of human chorionic gonadotropin and their radioimmunoassays., *Endocrinol. Japon.*, 21(5), 429-435, 1974.
- 9) Lund, T. and Delves, P.J.: Immunological analyses of epitopes on hCG., *Reviews of Reproduction*, 3(1), 71-76, 1988.
- 10) Canfield, R.E., O'Connor, J.F., Birken, S., Krichevsky, A. and Wilcox, A.J.: Development of an assay for a biomarker of pregnancy and early fetal loss., *Environmental Health Perspectives*, 74(1), 57-66, 1987.
- 11) Butler, S.A., Khanlian, S.A. and Cole, L.A.: Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices., *Clin. Chem.*, 47(12), 2131-2136, 2001.
- 12) Birken, S., Maydelman, Y., Gawinowicz, M.A., Pound, A., Liu Y. and Hartree, A.S.: Isolation and characterization of human pituitary choionic gonadotropin., *Endocrinology*, 137(4), 1402-1411, 1996.
- 13) Papapetrou, P.D. and Nicopoulou, S.C.: The origin of human chorionic gonadotropin β -subunit-core fragment excreted in the urine of patients with cancer., *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 112(3), 415-422, 1986.
- 14) Cole, L.A.: Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites., *Clin. Chem.*, 43(12), 2233-2243, 1997.
- 15) International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome., *Nature*, 431(7011), 931-945, 2004.
- 16) Moore, K.L. and Persaud, T.V.N.: *The Developing Human, clinically oriented embryology*(6), 53, W.B. Saunders CO., Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney and Tokyo, 1998.
- 17) Hoshina, M., Ashitaka, Y. and Tojo, S. : Immunohistochemical interaction on antisera to HCG and its subunits with chorionic tissue of early gestation., *Acta Obstet. Gynecol. Japon.*, 30(2), 187-190, 1978.
- 18) Ashitaka, Y., Nishimura, R., Takemori, M. and Tojo, S.: Production and secretion of HCG and HCG subunits by trophoblastic tissue. In *Chorionic Gonadotropin.*, SJ Segal Ed., 147-175, Plenum Press, New York and London, 1980.
- 19) Bahl, O.P.: Human chorionic gonadotropin. II. Nature of the carbohydrate units., *J. Biol. Chem.*, 244(4) , 575-583, 1969.
- 20) Husa, R.O.: Human chorionic gonadotropin, a clinical marker., *Review of its biosynthesis, Ligand Review*, 3(Suppl.2), 6-43, 1981.
- 21) Birken, S., Fetherston, J., Canfield, R. and Boime, I.: The amino acid sequences of the prepeptides contained in the alpha and beta subunits of human choriogonadotropin., *J. Biol. Chem.*, 256(4), 1816-1823, 1981.
- 22) Laphorn, A.J., Harris, D.C., Littlejohn, A., Lustbader, J.W., Canfield, R.E., Machin, K.J., Morgan, F.J. and Isaacs, N.W.: Crystal structure of human chorionic gonadotropin., *Nature*, 369(6480), 455-461, 1994.
- 23) 菅沼信彦、古橋 円：新女性医学大系 12 生殖内分泌 排卵と月経、83-97、中山書店、東

- 京、1998.
- 24) Bernard, M.P., Lin, W., Cao, D., Myers, R.V., Xing, Y. and Moyle, W.R.: Only a portion of the small seatbelt loop in human choriogonadotropin appears capable of contracting the lutropin receptor., *J. Boil. Chem.*, 279(43), 44438-44441, 2004.
- 25) Kessler, M.J., Reddy, M.S., Shah, R.H. and Bahl, O.P.: Structures of N-glycosidic carbohydrate units of human chorionic gonadotropin., *J. Boil.Chem.*, 254(16), 7901-7908, 1979.
- 26) 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(16), 7909-7914, 1979.
- 27) Cole, L.A., Birken, S. and Perini, F.: The structure of the serine-linked sugar chains on human chorionic gonadotropin., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126(1), 333-339, 1985.
- 28) Endo, Y., Ashitaka, Y., Kobata, A. and Tojo, S.: Structures of the asparagine-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin. In *Chorionic Gonadotropin.*, SJ Segal Ed., 127-146, Plenum Press, New York and London, 1980.
- 29) Cole, LA., Khanlian, S.A., Sutton, J.M., Davies, S. and Stephens, N.D.: Hyperglycosylated hCG (invasive trophoblast antigen, ITA) a key antigen for early pregnancy detection., *Clin. Biochem.*, 36(8), 647-655, 2003.
- 30) Feb.2009 (GRCh37/h19) (Genome Reference Consortium, release GRCh37, Feb. 2009)
- 31) Nylor, S.L., Chin, W.W., Goodman, H.M., Lalley, P.A., Grzeschik, K.H. and Sakaguchi, A.Y.: Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse., *Somatic Cell Genet.*, 9(6), 757-770, 1983.
- 32) Bo, M. and Biome, I.: Identification of the transcriptionally active genes of the chorionic gonadotropin β gene cluster in vivo., *J. Boil. Chem.*, 267(5), 3179-3184, 1992.
- 33) Talmadge, K, Vamvakopoulos, N.C. and Fiddes, J.C.: Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone., *Nature*, 307(5946), 37-40, 1984.
- 34) Dirnhofer, S., Hermann, M., Hittmair, A., Hoermann, R., Kapelari, K. and Berger, P: Expression of the human chorionic gonadotropin-beta gene cluster in human pituitaries and alternate use of exon1., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81(12), 4212-4217, 1996.
- 35) Taliadouros, G.S., Amr, S., Louvet, J.P., Birken, S., Canfield, R.E. and Nisula, B.C.: Biological and immunological characterization of crude commercial human choriogonadotropin., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54(5), 1002-1009, 1982.
- 36) Lund, T. and Delves, P.J.: Immunological analysis of epitopes on hCG., *Reviews of Reproduction*, 3(1), 71-76, 1998.
- 37) Heip, J., Devroey, P. and Steirteghem, A.C.: Serum human chorionic gonadotropin (hCG) levels throughout normal and abnormal pregnancy as measured with the Hybritech Tandem-R immunoradiometric assay Continuing Education Technical Brochure., 1-4, Hybritech, San Diego, CA, 1985.
- 38) Butler, S.A., Khanlian, S.A. and Cole, L.A.: Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices., *Clin. Chem.*, 47(12), 2131-2136, 2001.

- 39) Cole, L.A.: New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin., *Reproductive biology and Endocrinology*, 7, 1-37, 2009.
- 40) Elliott, M.M., Kardana, A., Lustbader, J.W. and Cole, L.A.: Carbohydrate and peptide structure of the α - and β -subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma., *Endocrine*, 7(1), 15-32, 1997.
- 41) Kovalevskaya, G., Birken, S., Kakuma, T., Ozaki, N., Sauer, M., Lindheim, S., Cohen, M., Kelly, A., Schlatterer, J. and O'Connor, J.F.: Differential expression of human chorionic gonadotropin (hCG) glycosylation isoforms in failing and continuing pregnancies: preliminary characterization of the hyperglycosylated hCG epitope., *J. Endocrinol.*, 172(3), 497-506, 2002.
- 42) Kovalevskaya, G., Birken, S., Kakuma, T. and O'Connor, J.F.: Early pregnancy human chorionic gonadotropin (hCG) isoforms measured by an immunometric assay for choriocarcinoma-like hCG., *J. Endocrinol.*, 161(1), 99-106, 1999.
- 43) Cole, L.A., Kardana, A., Park, S.Y. and Braunstein, G.D.: The deactivation of hCG by nicking and dissociation., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76(3), 704-710, 1993.
- 44) Papapetrou, P.D. and Nicopoulou, S.C.: The origin of human chorionic gonadotropin β -subunit-core fragment excreted in the urine of patients with cancer., *Acta Endocrinol (Copenh.)*, 112(3), 415-422, 1986.
- 45) Sturgeon, C.M., Berger P., Bidart, J.M., Birken S., Burns, C., Norman, R.J. and Stenman, U.H.: Differences in recognition of the 1st WHO international reference reagents for hCG-related isoforms by diagnostic immunoassays for human chorionic gonadotropin., *Clin. Chem.*, 55(8), 1484-1491, 2009.
- 46) Muller, C.Y. and Cole, L.A.: The quagmire of hCG and hCG testing in gynecologic oncology., *Gynecologic Oncology*, 112(3), 663-672, 2009.
- 47) Matsuura, S., Shimizu, T., Oh, S., Ohashi, M. and Ashitaka, Y.: Effective extraction and radioimmunoassay of chorionic gonadotropin in human urine., *Asia-Oceania J Obstet Gynaecol.* 10(1), 15-24, 1984.
- 48) 佐藤芳昭、須藤祐悦、広橋 武、竹内正七：抗CTP抗体を利用したhCGの超微量酵素免疫測定法とその臨床応用、*日産婦誌*、38(7)、1079-1086、1986.
- 49) 産婦人科診療ガイドライン—産科編2008：日本産科婦人科学会・日本産婦人科医会共同編集、47-48、2008.
- 50) Cowan, B.D.: Ectopic pregnancy., *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 5(3), 328-332, 1993.
- 51) Sasaki, Y., Ladner, D.G. and Cole, L.A.: Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin and the source of pregnancy failures., *Fertil. Steril.* 89(6), 1781-1786, 2008.
- 52) Chard, T., Lowings, C., and Kitau, M.J.: Alphafetoprotein and chorionic gonadotropin levels in relation to Down's syndrome., *Lancet*, 324 (8405), 750, 1984.
- 53) 絨毛性疾患取扱い規約：日本産科婦人科学会・日本病理学会編、8-12、金原出版、東京、1995.
- 54) Nishimura, R., Kitajima, T., Hasegawa, K., Takeuchi, K. and Mochizuki, M.: Molecular forms of human chorionic gonadotropin in choriocarcinon serum and urine., *Jpn. J. Cancer Res.*, 80 (10), 968-974, 1989.
- 55) 西村隆一郎：8. 絨毛性疾患の基礎知識、*日産婦誌*、56(9)、660-665、2004.

- 56) Li, D., Wen, X., Ghali, L., Al-Shalabi, F.M., Docherty, S.M., Purkis, P. and Iles, R.K.: hCG β expression by cervical squamous carcinoma-in vivo histological association with tumor invasion and apoptosis., *Histopathology*, 53(2), 147-155, 2008.
- 57) Marcillac I., Troalen, F., Bidart, J.M., Ghilani, P., Ribrag, V., Escudier, B., Malassagne, B., Droz, J.P., lhomme, C. and Rougier, P.: Free human chorionic gonadotropin beta subunit in gonadal and nongonadal neoplasms., *Cancer Res.*, 52(14), 3901-3907, 1992.
- 58) Hoermann, R., Grebes, A.L., Spoetl, G., Jungst, D. and Mann, K.: Immunoreactive human chorionic gonadotropin and its free beta subunit in serum and ascites of patients with malignant tumors., *Cancer Res.*, 52(6), 1520-1524, 1992.
- 59) 山中 望、川端 岳、森末浩一、羽間 稔、西村隆一郎：膀胱腫瘍における尿中 β core fragmentの腫瘍マーカーとしての意義、日泌尿会誌、84(4)、700-706、1993.
- 60) 丸尾 猛、北島隆史、大谷徹郎、望月真人、西村隆一郎、長谷川和男、武内久仁夫、佐藤力、田中俊誠、藤本征一郎、他25名：婦人科悪性腫瘍患者における尿中 hCG β core fragment 測定の臨床的意義、産と婦、17(7)、1197-1208、1991.
- 61) Rotmensch, S. and Cole, L.A.: False diagnosis and needless therapy of presumed malignant diseases in women with false-positive human chorionic gonadotropin concentrations., *Lancet*, 355(9205), 712-715, 2000.
- 62) Gronowski, A.M., Cervinski, M., Stenman, U.H., Woodworth, A., Ashby, L. and Scott, M.G.: False-negative results in point-of-care qualitative human chorionic gonadotropin (hCG) devices due to excess hCG β core fragment., *Clin. Chem.*, 55(7), 1389-1394, 2009.