

ホルモンの検出や測定の手法は臨床においても研究においても利用されている。現在使われているような手法が確立される前は、ホルモンは間接的にしか検出できなかった。たとえば、昔の妊娠検査法である“ラビットテスト”の場合であれば、被験者の尿を雌ウサギに投与して行われていた。検査後24時間以内に動物の卵巣内の黄体の構造を観察することで、被験者の妊娠を判断していた(排卵後、黄体は卵胞より形成される)。現在、このような構造変化をもたらすホルモンはヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)であることが知られている[HCGの生物学的活性は黄体ホルモン(LH)のものと類似している。これは胎盤によって妊娠中にのみ合成される]。バイオアッセイは手間と時間を要するだけでなく、感度が低く、しかも不正確である。たとえば、ラビットテストは妊娠後数週間が経過しなければ利用できないうえに、ポジティブかネガティブ、つまりある物質の存在の有無しか判断できない。この手法は、物質の濃度の確認には利用できないのである。やがて、ラジオイムノアッセイ(RIA)といわれる手法が開発された。この方法では、ごく微量の抗原(それに結合する抗体が存在すれば、どのような物質でもよい)を検出し、正確に測定することができる。ラジオイムノアッセイにおいては、未標識の抗原と放射線標識を施した同種の抗原(既知濃度)を用意し、抗体と結合する際の拮抗の程度を測定することで、特定の抗原の濃度を決定することができる(この際、抗体の量を抗原に比べてずっと少なくしなければならない)。RIAはホルモン関連だけでなく、生化学の他の分野の研究においても長年にわたって用いられてきた。現在では、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)といわれる、さらに安価で安全な手法が使われることが多くなった。

ELISA

酵素結合免疫吸着検定法は、抗体を利用するRIA法に類似しており、感度もほぼ同じである。たとえば、現在ではELISAを応用した妊娠検査が安価で利用できるようになっている。この方法では、妊娠後2日目には尿中のHCGを測定することができる。

通常、ELISA(図16C)は以下の操作によって行われる。

1. 抗原特異的な抗体が活性をもたない物質の表面(たとえばポリスチレン製シャーレの底面)に結合

図 16C 酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)

タンパク質性ホルモンのような特定の生理活性分子の同定や濃度測定は、ELISAを利用すれば容易に行える。この方法においては、生理活性分子(抗原といわれる)に特異的な抗体を固相(ポリスチレン製シャーレなど)に結合させる。検体をシャーレに加えた後、穏やかに洗浄し、非結合物質を取り除く。続いて、酵素と共有結合させた第二抗原結合抗体を加える。酵素によって変色した基質の量を測定することによって、目的の生理活性分子の有無や濃度が決定できる。

する。

2. 生物の検体(血液や尿など)の試料をシャーレに少量滴下する。試料が特定の抗原をもっている場合は、抗原-抗体反応が起こる。
3. 二次抗体を加える。二次抗体とは、抗原と特異的に結合する抗体であり、固定化された抗体とは別の部位に結合する。この抗体は活性測定可能な酵素と共有結合させてある。
4. シャーレを洗浄し、抗原と結合していない抗体や酵素結合型抗体分子を取り除く。
5. シャーレに存在する抗原の量を決定するために、酵素活性の測定を行う。その酵素は試薬の色を変化させる。変色の程度は試料中の抗原の濃度に比例する。

この方法のほかに、特定の抗原をシャーレに結合させる方法もある。その方法では、検体に存在する抗体のうち抗原と結合できるものはすべて、固定化された抗原に結合する。結合していない一次抗体を洗い流した後、一次抗体と特異的に結合しうる別の抗体(測定可能な酵素と結合させたもの)を加える。

