

《総 説》

ホルモン測定法の進歩

宮 地 幸 隆*

要旨 ホルモンは血中に微量しか存在しないため血中濃度の測定は困難であり、ホルモン測定法の開発は内分泌学の研究そのものであった。まずホルモンの生物活性を指標とする生物学的測定法や化学的測定法が行われたが、感度が十分でなく、広範に用いられるには至らなかった。1959年 Berson と Yalow により開発されたインスリンの radioimmunoassay は感度もよく操作も比較的簡単であるため、インスリンにかぎることなく、多くの蛋白ホルモンさらには分子量の小さなペプチドホルモンやステロイドホルモンにも応用された。

Radioimmunoassay の確立によりホルモンの測定法は完成されたようにみえたが、ある疾患の病態解明やさらに微量な局所的に作用するホルモンの測定には感度のより高い assay が要求されるようになった。二つの異なった抗体を用いる immunoradiometric assay は radioimmunoassay より感度が数十倍よくなることが判明し、その特異性や操作性と相まって現在では広く用いられるようになった。

これまでは標識ホルモンとしては radioisotope が用いられたが、radioisotope の取り扱いのわずらわしさ、衛生上の問題からも nonisotopic 標識ホルモンが用いられるようになってきた。Nonisotopic 標識物としては化学発光、蛍光、酵素などが用いられ感度も radioisotope に比較してむしろ良好な nonisotopic immunoassay が確立された。

ホルモンの本来の生物活性に近いホルモンと受容体 receptor への結合を利用する radioreceptor assay は receptor の調整のむずかしさからあまり用いられていない。

例えば試験管内に辜丸組織を入れ、testosterone 産生能をみる LH (hCG) の in vitro の bioassay は簡便で、ホルモンの本来の作用である生物学的活性を標識にするよい方法である。

(核医学 31: 283-288, 1994)

はじめに

ホルモン測定はかつては内分泌学の研究そのものであり、表 1 に示すような多くの測定方法が開発された。

ホルモンの化学的測定法や生物活性を指標とする生物学的測定法は、感度が十分でなく広く用いられなかった。1959年 Berson と Yalow により

開発された radioimmunoassay (RIA) の出現によりホルモン測定は容易となり、ホルモンのみならず多くの微量物質の測定を可能とした。RIA に続き、広く用いられるようになった感度が良好な immunoradiometric assay (IRMA), radioisotope を用いない nonisotopic immunoassay も基本は RIA であり、RIA の原理をよく理解しておくことが必要である。

Immunoassay よりホルモンの本来の生物活性に近いホルモンと受容体 receptor への結合を利用する radioreceptor assay, 簡便な in vitro の bioassay 法についても、ホルモン測定法の歴史に沿って著者が行ってきたヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, hCG) を中心にして解説する。

第 33 回日本核医学会総会教育講演の内容を総説として編集委員会が投稿をお願いした。

* 東邦大学医学部第一内科

受付: 5 年 12 月 21 日

別刷請求先: 東京都大田区大森西 6-11-1 (☎143)

東邦大学医学部付属大森病院第一内科

宮 地 幸 隆

表 1 ホルモンの測定法

- | |
|-------------------------------|
| 1. 化学的測定法 |
| 2. 生物学的測定法 |
| in vivo |
| in vitro |
| 3. 免疫学的測定法 |
| radioimmunoassay |
| immunoradiometric assay |
| non-isotopic immunoassay |
| enzyme immunoassay |
| fluorescence immunoassay |
| chemiluminescence immunoassay |
| 4. 受容体を用いる測定法 |
| radioreceptor assay |

1. 生物学的測定法

hCG は分子量 39,000 で異なった α -, β -二つの subunit からなる糖蛋白である。hCG は黄体化ホルモン (luteinizing hormone: LH) と同様に睾丸から testosterone, 卵巣から女性ホルモンの分泌を刺激し排卵誘発作用をもっている。

古くから用いられた hCG の生物学的測定法はウサギに hCG を投与して排卵を調べたり (排卵誘発法), ラット卵巣のアスコルビン酸減少を測定する (卵巣アスコルビン酸減少法) in vivo の assay であり, 多量の hCG 投与を必要とした。

2. Radioimmunoassay

図 1 に RIA の原理を示す。ホルモンの RIA を行うにあたっては標準ホルモン, ホルモンに対する特異的な抗体, 標識ホルモン, 反応後遊離標識ホルモン (F) と抗体に結合した標識ホルモン (B) の分離法, 得られたデータの処理が必要である。

hCG の標準品は妊婦尿から精製された hCG が入手可能である。しかし多くのホルモンを生物材料から抽出精製し, 純粋な標準品を得ることはしばしば困難であり, 蛋白質化学や遺伝子工学の進歩を待たなければならなかった。

hCG の特異的な抗体を作製する際, ポリクローナル抗体であれば hCG の complete Freund adjuvant, 乾燥結核菌を混ぜ, エマルジョンとしたものを家兎の背部皮内数十か所に注射すると少量の hCG で良好な抗体を得ることができる。標

- a. ホルモン + 標識ホルモン + 抗体
→ ホルモン-抗体 + 標識ホルモン-抗体 (B) +
ホルモン + 標識ホルモン (F)
- b. ホルモン + 標識抗体 → ホルモン-標識抗体 + 標識抗体

図 1 Radioimmunoassay (a) と Immunoradiometric assay (b) の原理。

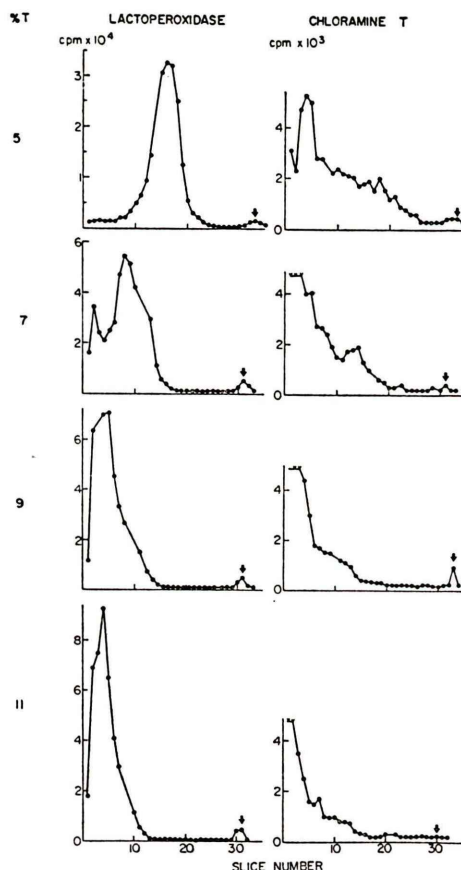


図 2 Lactoperoxidase 法により作製した ^{125}I -hCG の PAGE による分析。

識 hCG としては ^{125}I 標識が主として用いられる。hCG の ^{125}I -標識法は古くは chloramine T 法しかなかったが, 免疫活性を保つ ^{125}I -hCG の作製が時にむずかしかった。甲状腺ホルモン合成がまさにヨウ素化であることを利用して lactoperoxidase 法を開発した¹⁾。Lactoperoxidase 法により ^{125}I -

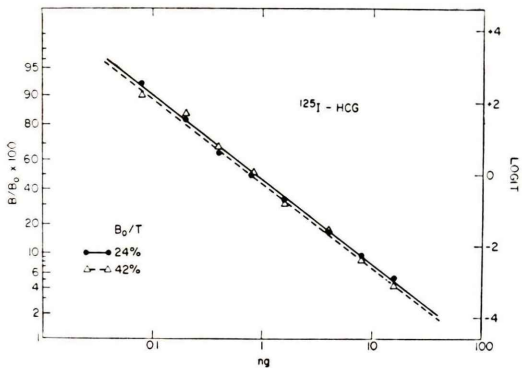


図3 Lactoperoxidase 法により作製した ^{125}I -hCG を用いる hCG の radioimmunoassay の標準曲線。

hCG を作製し, ^{125}I -hCG の生物学的活性, 放射化学的純粋性, 免疫活性を分析した. ^{125}I -hCG を polyacrylamide gel electrophoresis で泳動後, 1 mm slice 中の放射能を測定すると図2のように1つのピークがみられた. なお同時に古い chloramine T 法によりヨウ素標識した ^{125}I -hCG は gel 中に放射能が広く分布し, ^{125}I -hCG のピークがみられなかった. Lactoperoxidase 法により作製した ^{125}I -hCG の生物学的活性を卵巣アスカルビン酸減少法により調べると非標識 hCG の108%と生物活性を維持していることが明らかであった. さらに hCG RIA の標識物として用いた場合良好な標準曲線が得られ, 免疫活性も十分に維持していた(図3).

抗原-抗体反応終了後, B と F の分離には遊離標識ホルモン (F) を沈澱分離させるには dextran coated charcoal がよく用いられ, 抗体と結合して標識ホルモンの分離には第2抗体, polyethylene glycol, 硫酸などが用いられるが B/F が十分に分離できるなら, 経済性も考慮してどの方法を用いても問題ない.

RIA の標準曲線は抗体と結合した標識ホルモン (B) を縦軸に, 標準ホルモン量を横軸にとると双曲線となり, 標準ホルモン量を対数で表すと S 字状曲線となり, B を logit 変換すると直線に変換できる. データ処理を手計算する時には logit-log 変換をして直線化し, computer が利用できる時

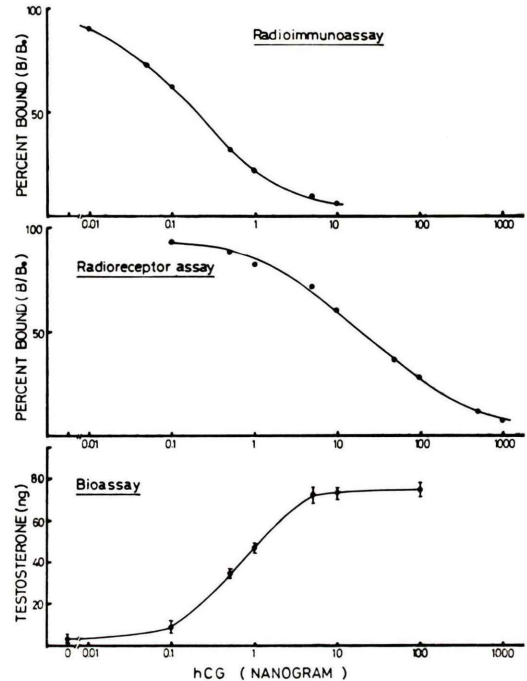


図4 hCG の radioimmunoassay, radioreceptor assay および in vitro の bioassay の標準曲線。

には S 字状曲線を用いる four parameter logistic curve fitting 法が推められる。

3. Radioreceptor assay

^{125}I -hCG が生物的活性を保持していたのでラット睪丸切片を用いる hCG の receptor assay を確立した. 標準曲線の1例を示す(図4).

4. In vitro の bioassay

hCG の in vitro の bioassay では睪丸切片をチューブに入れ, hCG を添加して incubation 後上清中に放出された testosterone を測定する. 添加した hCG の量に応じて睪丸からの testosterone 産生が増加し, 良好な標準曲線が得られる(図4). hCG の代わりに未知の試料を加え, 産生される testosterone 量から試料中の hCG を推定できる. この hCG の in vitro の bioassay はきわめて高感度で精度も高い. 確立した hCG の3つの測定法 RIA, radioreceptor assay および in vitro の bioas-

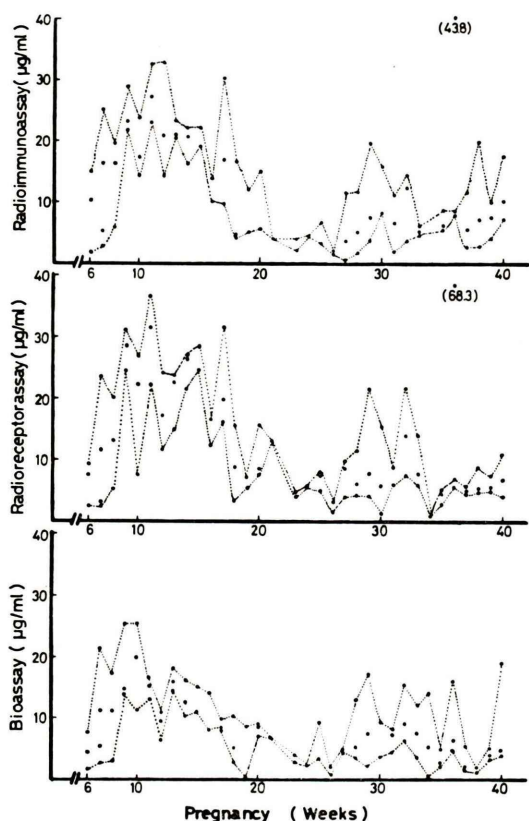


図 5 Radioimmunoassay, radioreceptor assay および in vitro の bioassay で測定した妊婦血清の hCG 値。

say により妊婦の血清 hCG を測定した (図 5)。3 つの方法により測定した値はおおのよく相関していたが、一部の試料では測定値に解離がみられた。

5. Immunoradiometric assay

Miles と Hales は RIA が確立されて数年後 1968 年には IRMA の方が RIA より理論的に感度が優れることを報告した²⁾。1971 年には Addison と Hales により二つの抗体を用いる two site IRMA が報告され³⁾、1975 年の Milstein と Köhler のモノクローナル抗体作製法の開発により大量の抗体供給が可能となり、IRMA が急速に広まっていった。IRMA は標識した抗体を多量に用い

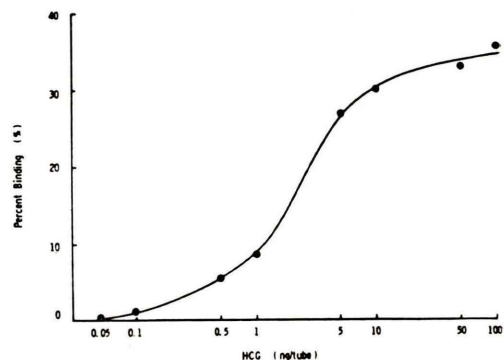


図 6 hCG の immunoradiometric assay の標準曲線。

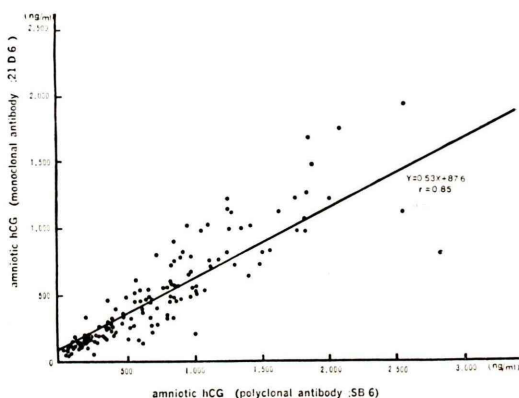


図 7 Radioimmunoassay と immunoradiometric assay により測定した羊水中の hCG 値。

るため反応は早く終了し (図 1)、特異性は高く、感度は RIA の 100 倍近く理論的によくなる。測定範囲は RIA の 2~3 桁に比し、3~4 桁と広くなり、ピペッティングによる誤差は標準品、または試料を加える 1 回のみなので操作性もよくなる⁴⁾。

hCG の 6 種類のモノクローナル抗体を作製し hCG β サブユニットを認識する抗体 (3D1) と natural な hCG のみを認識する抗体 (21D6) の二種類を用いる two site IRMA を開発した⁵⁾。固相化した 3D1 に標準 hCG または試料を加え incubation 後洗浄し、¹²⁵I 標識した 21D6 を加え、さらに incubation 後 hCG と結合した ¹²⁵I-21D6 の放射能を測定した。hCG IRMA の標準曲線は感度も良好であった (図 6)。羊水中の hCG を RIA

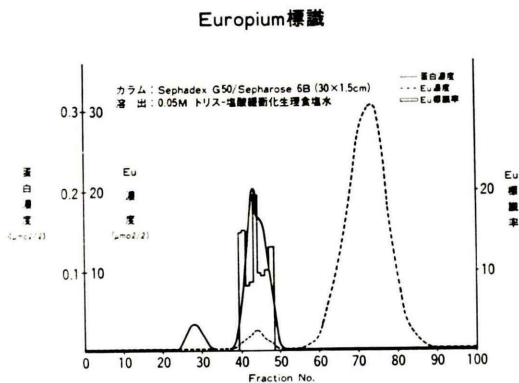


図 8 hCG の Europium 標識.

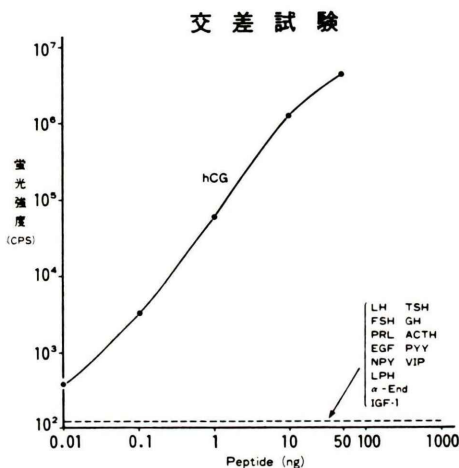


図 9 hCG の immunofluorometric assay の標準曲線と交差反応.

と IRMA を用いて測定すると両者はよく相関するが、IRMA を用いて測定した値が RIA の約 2/3 の値を示し、RIA では natural な hCG 以外のもも測定している可能性が考えられた (図 7)。

6. Non-isotopic immunoassay

次に radioisotope の代わりに Eu^{III} 蛍光および acridinium ester による化学発光を用いる immunofluorometric assay (IFMA) および immunochemiluminometric assay (ICMA) を検討した。上述の hCG モノクローナル抗体 21D6 を isothiocyanabenzyl 試薬と反応後 Sephadex を用いて溶出

すると Eu^{III} 蛍光は二つのピークを示す (図 8)。2 番目のピークは未反応の Eu^{III} であり、第 1 番目のピークが 21D6 と結合した Eu^{III} であり、Eu^{III} の標識率は 15~20% になる。Eu^{III} 標識 21D6 を用いて hCG IFMA を行った時の交差反応と標準曲線を示す (図 9)。LH, FSH, TSH などの糖蛋白とも交差せず、特異性が高く感度もきわめて良好であった。

Acridinium ester 標識 21D6 を用いる hCG の ICMA も感度がよく、特異性も高かった。

Radioisotope の代わりに Eu^{III} 蛍光や acridinium ester 化学発光を用いる IFMA や ICMA は radioisotope を用いないため操作が楽であり、また一度標識を行うと半永久的に用いることができる。感度、特異性も優れているので enzyme immunoassay を含めて今後の一層の発展が期待できる。

おわりに

以上ホルモンの測定法について生物学的測定法、RIA, RRA, in vitro の生物学的測定法、non-isotopic immunoassay (IFMA, ICMA) を、それらの方法の発展に従って述べてきた。ホルモンの immunoassay は測定の感度が 1 桁よくなることにより、そのたびに臨床内分泌学が新しく展開されてきた。感度がさらによくなることにより、活性のあるより微量な遊離ホルモンや paracrine, autocrine に働くホルモンの測定できるようになることが期待される。

ホルモンの immunoassay が目覚ましく発展した今日、immunoassay の有用性とその限界を認識するとともに、ホルモンはあくまでも生物学的活性が基本であることを忘れてはならない。

文 献

- 1) Miyachi Y, Vaitukaitis JL, Nieschlag E, Lipsett MB: Enzymatic radioiodination of gonadotropins. J Clin Endocrinol Metab 34: 23-28, 1972
- 2) Miles LEM, Hales CN: Labelled antibodies and immunological assay systems. Nature 219: 186-189, 1968

- 3) Addison GM, Miles LEM: The immunoradiometric assay procedures: new developments in Radioimmunoassay Methods. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1971, pp. 481-490
- 4) 宮地 幸隆: Immunoradiometric assay ——最近の進歩と問題点——. 臨床放射線 36: 1095-1100, 1991
- 5) Mizuchi A, Kitagawa N, Miyachi Y, Iio M: Monoclonal antibodies to human chorionic gonadotropin and their application to two-site sandwich immunoassay. J Immunol Method 74: 369, 1984

Summary

Development of Hormone Assay Methods

Yukitaka MIYACHI

First Department of Internal Medicine, Toho University School of Medicine

Before the introduction of radioimmunoassay, most hormones were measured by bioassay and/or chemical methods. The sensitivity of these methods was low, so large amounts of samples were needed to perform hormone determinations.

In 1959, Berson and Yalow, first applied radioimmunoassay to the measurement of insulin, after which many protein hormones were determined by this method. Subsequently, radioimmunoassays were developed for small peptide molecules as well as for non-peptide hormones such as thyroid hormones and steroid hormones.

Two site immunoradiometric assay in which one antibody was immobilized and another labeled with ^{125}I becomes popular, due to its high sensitivity and the development of monoclonal antibody production by the hybridoma technique.

Although radioimmunoassays immunoradiometric assays are sensitive and robust techniques, there has been a growing interest for non-istotopic alternatives since early 1980s.

Recently, non-isotopic immunoassay methods utilizing chemiluminescence, fluorescence and enzymes as labels are widely used.

Chemiluminescence immunoassays, fluorescence immunoassays and enzymic immunoassays with fluorometric detection have resulted in sensitivities adequate to replace radioimmunoassays.

Since hormone immunoassays are all dependent upon immunologic properties of hormones, the simultaneous measurement of hormones by a biologic method sometimes shows discrepancies in the hormone concentrations.

Hormone assay methods employing biologically specific receptors was introduced, but used not so widely due to the unstability of hormone receptors.

In vitro bioassay, is easy to perform and has high sensitivity and applicable for definite hormones.

Isotopic and non-isotopic immunoassays are simple and quite useful, but other methods such as radioreceptor assay and bioassay-especially in vitro bioassay are also recommendable to run with radioimmunoassays.

Key words: Radioimmunoassay, Immunoradiometric assay, Non-isotopic immunoassay, Bioassay, Radioreceptor assay.