

◆ 報 文 ◆

# ELISA 法による水中の $17\beta$ エストラジオール測定の問題と改良

岡安祐司\*

## 1. はじめに

水環境に関わる外因性内分泌攪乱物質 (いわゆる環境ホルモン) 問題で最も懸念されることは、内分泌攪乱作用を示す物質の中で、特にエストロゲン様物質の存在が、下水道などの都市排水系を經由して河川に生息する野生生物に影響を与える恐れがないのかという、不安であった。これまでの調査の結果、

- ・ 内分泌攪乱作用があると疑われる物質が河川水中に広く存在すること
- ・ 一部の雄コイの血液から雌性化の目安となる物質 (ピテロゲニン) が検出されたこと、
- ・ 流入下水中の環境ホルモンは下水処理の過程で大きく低減し、さらに高度処理を行えば、多くの物質でほとんど検出されないレベルにまで低減していること、

等が解明されつつある。

本稿では、調査対象物質の中で、単位濃度当たりのエストロゲン作用が最も強いとされている人畜由来の  $17\beta$  エストラジオールの測定に当たって用いられた ELISA 法の問題と改良方法について述べることにする。

## 2. 内分泌攪乱物質として重要なエストロゲン

内分泌攪乱物質をどのように定義するかは、国際的に科学的な議論が続けられてきているところであるが、我が国では、1998年に当時の環境庁が公表した環境ホルモン戦略計画 SPEED'98<sup>1)</sup> で、「動物の生体内に取り込まれた場合に、本来、その生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与える外因性の物質」と定義されている。

SPEED'98では、内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質として、ダイオキシン類、ポリ塩化ビフェニール類 (PCB) をはじめとする 67 の化学物質が示された (後に、スチレン 2 量体・3 量

体、*n*-ブチルベンゼンについては当該リストから削除されたため、65 物質となっている)。

また、1980年代に、英国ロンドン北部のリー川で、下水処理排水口の下流に生育するローチ (コイ科) に生殖腺の雌雄同体が確認され、その後フィールド調査等から、英国ではエストロゲン様作用の内分泌攪乱が起きていると報告されている。原因物質としては、羊毛産業関連排水由来のアルキルフェノール類に加えて、人畜由来のエストロゲンである、 $17\beta$  エストラジオールやエストロンもリストされている。女性の尿中から排出される、 $17\beta$  エストラジオールを含む総エストロゲン量 (天然エストロゲン) は、通常一日当たり数  $\sim 60\mu\text{g}$  ( $\mu\text{g}=10^{-6}\text{g}$ ) 程度、妊娠中 (妊娠初期) は一日あたり  $200\sim 400\mu\text{g}$  程度排出されると言われている。さらに、1999年に日本においても薬事法により承認されたが、経口避妊薬 (ピル) は、合成エストロゲンであるエチニルエストラジオールを  $30\sim 40\mu\text{g}$  含有している。これらが、下水道により収集され、下水処理過程で一定の除去をされ、河川などに排出されている。前述の SPEED'98においても、化学物質以外にも、天然女性ホルモン、合成女性ホルモン等の関与を無視することはできなく、今後、水生生物に係る化学物質のリスク評価を実施するにあたっては、環境中の濃度測定、これらの物質の物性、生分解性、濃縮性、生態毒性についての検討が早急に必要である、と言及されているところである。

## 3. 水環境での環境ホルモン調査に役立つ ELISA 法

国土交通省では、外因性内分泌かく乱の疑いのある物質、いわゆる環境ホルモン問題が顕在化した後、水環境に係る河川や下水道の管理者としての立場から、汚染の実態を捉えるべく、平成 10 年度より全国の一級河川及び下水道における内分泌攪乱化学物質の実態調査を実施している<sup>5),11)</sup>。まず、国土交通省が実施する実態調査に先立って、

Issues and Improvement in Measurement of  $17\beta$ -estradiol in Water by the ELISA Method

調査対象物質の選定および測定方法についての検討が行われた<sup>3)</sup>。その結果、本調査においては、これまでに平成10年度から平成11年度においては、 $17\beta$  エストラジオールを ELISA 法により測定する方法が選択された。また、同時期に環境省が実施した調査においても同様に、 $17\beta$  エストラジオールを ELISA 法により測定する方法が選択された<sup>2),4)</sup>。

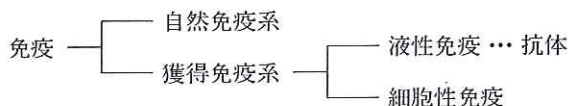
ELISA 法では、試料を前処理(ろ過、及び固相抽出<sup>注1)</sup>による濃縮・クリーンアップ)した後、市販の ELISA Kit(Assay Design 社製)で測定する方法が用いられた。この測定による検出下限限界は、 $0.0002\mu\text{g/L}$ 、定量下限限界は  $0.0006\mu\text{g/L}$  である。このように ELISA 法については、高い検出感度で、簡便に測定が可能であるという利点があることや、平成10年当時、 $17\beta$  エストラジオールの機器分析手法による測定法が確立されていなかったが、水環境における実態に関する知見を集積する緊急性を有していたことなどの理由から、各調査において採用された。従来、微量化学物質の測定を、精密機器分析に頼り、生物学的手法を積極的に採用してこなかった行政としては画期的な、新たな手法の導入であった。

#### 4. ELISA 法とは

ELISA 法とは、Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay の頭文字を取ったもので、「イライザ」または「エライザ」と呼ばれている。動物が有する免疫機能における抗原抗体反応を利用し、対象とする物質の濃度を測定する方法である。

##### ① 免疫

ヒトをはじめとする脊椎動物は、病原性の細菌やウイルスなどの生体に害を与えるもの(抗原: antigen)が体内に侵入してきた場合に、これに対抗する手段として免疫という生体防御機能をもっている。免疫は、病原菌やウイルスなどが体内に進入してくると、それを排除しようとする力をもっており、その一つが自然免疫系、もう一つが獲得免疫系である。通常、自然免疫系が機能しているが、これで防ぎきれなくなると、獲得免疫系が機能する。獲得免疫には大きく分けて液性免疫と



細胞性免疫の二つがある。例えば、細菌が侵入してきたときには、抗体がそれに対応し、この場合を液性免疫といい、一方、ウイルスが侵入してきたときには、キラー T 細胞と呼ばれる細胞が対応して処理することになっており、これを細胞性免疫という。

##### ② 抗体

液性免疫の中心的な存在である抗体は、成熟した B 細胞が抗原刺激を受けて分化した形成細胞において合成・分泌される物質で、刺激した抗原と特異的に結合するタンパク分子のことである。この抗体は別名「免疫グロブリン」(Ig) と呼ばれ、性質の違いにより、現在 5 つのクラス (G, M, A, D, E) に分けられている。例えば、細菌が体内に侵入して来た場合は、その抗原に適した抗体によって病原細菌が排除されるという一連の働きがある。

##### ③ 抗体の作製

ELISA 法の測定系を作製するに当たっては、まず、マウスなどに抗原(測定対象物質)を注射して、抗体を作製するリンパ球を取り出す。この際に、 $17\beta$  エストラジオールのような低分子の化合物は、生物が異物と認識しないため抗体を産生させる能力(抗原性)がなく(このような物質をハプテンと呼ぶ)、タンパク質などの高分子と結合した物質(コンジュゲート)を抗原として利用する。

抗原は、免疫反応を引き起こすことのできる最小の分子単位(エピトープ、抗原決定基)をいくつも含んでおり、エピトープに対応する抗体を作成するリンパ球およびそれが産出する抗体が複数種類できることとなる。そのうち一つのリンパ球



図-1 抗原と抗体の関係(イメージ)

を取り出し、自己増殖能力を持つガン細胞と融合させ、これを大量に増殖させて、特定の種類の抗体を大量に生産することが可能である。このようにして得られた抗体をモノクローナル抗体という。

④ ELISA 法の測定原理

上記により得られた抗体を、チューブやプレート (96well 等) 上に固定化する。ELISA 法の定量法は、大きく競合法と非競合法に分類される。抗原及び酵素標識された抗原とを競合させ、結合させ、標識酵素の活性を測定することで目的物質 ( : 抗原) を定量分析する方法が競合法、抗体に抗原を反応させ、さらに反応した抗原に対して、酵素標識した抗体を反応させ、標識酵素の活性を測定することで目的物質 ( : 抗原) を定量分析する方法が非競合法である。これ以外にも数々の、複数の組み合わせによる方法が提案されている。標識に用いる酵素は安定で、反応によって発色するものが一般的に選ばれ、ホスファターゼやパーオキシターゼなどが用いられている。

⑤ ELISA 法の適用事例

細菌や目的物質等に感染・汚染された検体を選抜 (スクリーニング) する方法として、医療分野の臨床検査方法として広く用いられている。通常、分析結果の表記方法は、判定基準濃度に対し陽性 (+) または陰性 (-) として表され、定性的に示される。直近では、いわゆる狂牛病の確定検査の前段階である 1 次スクリーニング法として採用されているのがよく知られている。また農薬測定や特定の細菌などの検出を目的とした、環境測定分野へ適用の検討も行われている。

5. ELISA 法によるエストロゲン測定の課題

環境水中のエストロゲンを ELISA 法で測定することについては、測定対象物質と構造が類似している物質が共存する場合には、それらも測定してしまい、測定結果が実際の値より高くなるという交差反応<sup>注2)</sup>の可能性が懸念された。また、ELISA 法に用いられる抗体や酵素が、試料中の溶存物質によって変質する (反応の妨害<sup>注3)</sup>) 可能性があり、測定値の信頼性について課題があるとの報告もなされていた。国土交通省の調査においては、平成 10 年度、平成 11 年度については、エストロゲンの測定手法として ELISA 法のみを採用したが、このような ELISA 法の不確実性を

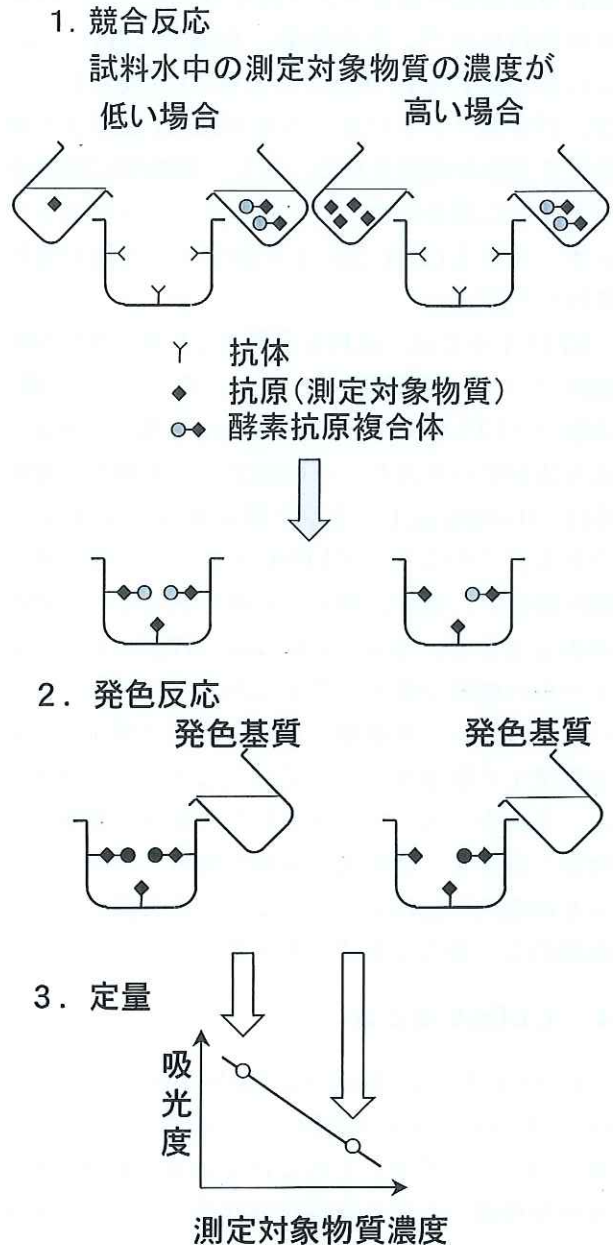


図-2 ELISA 法の原理 (競合法)

鑑み、並行して、機器分析による測定手法の検討が行われた<sup>6),9)</sup>。その結果、平成 12 年度調査からは、機器分析の手法である LC/MS/MS 法による分析が行われ、ELISA 法による測定結果と、機器分析 (LC/MS/MS 法) による測定結果を対比し、測定方法による相違について検討がなされた。なお、参考までに、環境省も国土交通省と同様な水環境の調査を実施しているが<sup>2),4),7),16)</sup>、 $17\beta$  エストラジオールの測定に関しては、平成 11 年度から、早々に ELISA 法を用いなくなっている。図-3、図-4 は  $17\beta$  エストラジオールの、両者の測定方法の測定結果を比較した結果である。流入下水に関しては、両者の間には、一定の相関は見ら

れているものの、ELISA 法では LC/MS/MS 法に比較して、4~5 倍程度の高い値になることが判明した。さらに、特に下水処理水や環境水の結果を見る限りでは、両者にはほとんど相関が見られなかった。機器分析手法 (LC/MS/MS 法) による測定手法は、これまでの長年の実績を考慮すると、測定対象とする物質の同定や定量性については優れ、測定結果は真値に限りなく近いと考えられる。そのため、ELISA 法による測定結果と、機器分析手法による測定結果の間の乖離は、ELISA 法に起因する、定量性に関する問題点・課題であると考えられている。結局のところ、環境水中のエストロゲン測定に関しては、定量性を求めるのであれば、ELISA 法を用いることは無理で、機器分析に頼る必要があるという認識が持たれている。

以上の国土交通省の調査によって得られた知見は、環境水中のエストロゲンの ELISA 法による測定を検討するに当たって大変貴重なものとなった。

## 6. ELISA 法の改良

環境水中のエストロゲンの機器分析による測定方法は、定量性の面で優れる等の長所を有する反面、試料の前処理操作が煩雑で、かつ高度な分析技術を必要とすること、また、分析費用が高価であり、自ずと測定できる検体数が限定されてしまうこと等の短所を有している。仮に、これらの物質に関して排水基準が設定され、下水処理場等が、放流水質の日常的な管理等を行う必要性が生じることを想定した場合、機器分析による測定手法を用いた水質管理は、費用等の面で現実的ではないと考えられる。

一方、ELISA 法は、機器分析に比較して定量性の面では機器分析に比較して太刀打ちできる状況にはないことが判明してきているが、感度が良く、操作が簡便であり、固相抽出装置やマイクロプレートリーダーといった程度の装置で測定が可能であるという長所を有しているため、今後、機器分析に対しての長所を保ちつつ、短所を克服することが可能であれば、(具体的には、交差反応、妨害の要因を取り除くことが可能になれば) 有効な水質測定手法となり得ると判断される。

独立行政法人土木研究所水質チームでは、上

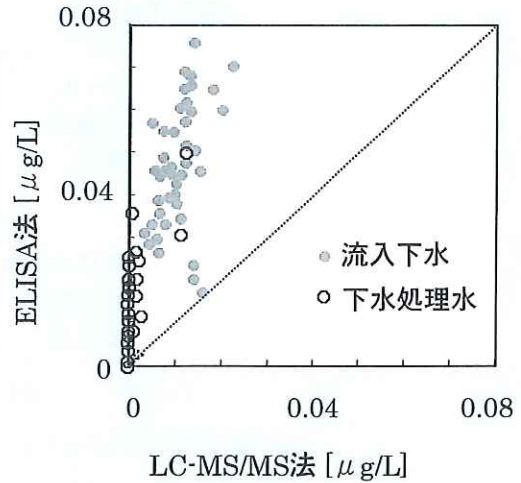


図-3 下水中の 17β エストラジオール濃度測定のための LC-MS/MS 法と ELISA 法の比較

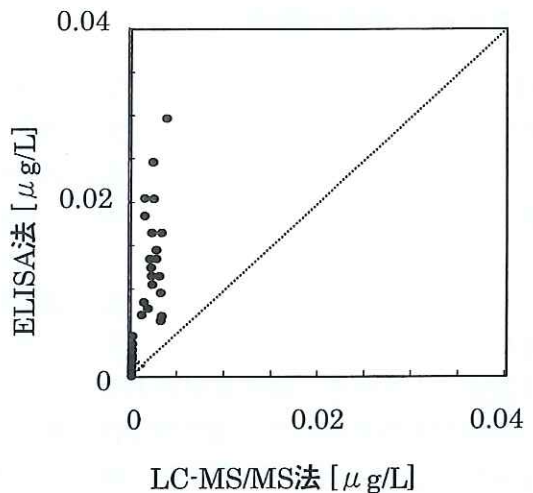


図-4 環境中の 17β エストラジオール濃度測定のための LC-MS/MS 法と ELISA 法の比較

述のような ELISA 法のポテンシャルに注目し、ELISA 法を用いた、環境水、下水中の 17β エストラジオールの検出および定量測定を目標として、平成 11 年度~13 年度に、「水中の内分泌かく乱化学物質の新しい検出技術の開発」(その 2)として、武田薬品工業株式会社、日本ガイシ株式会社と共同研究を実施した。

その結果、図-5 に示すように、固相抽出手法において、固相より抽出する際に使用する溶媒を極性の小さい溶媒に変更することで、17β エストラジオールの溶出を行いつつ、交差反応および妨害の要因となる物質の溶出を抑えることにより、溶出液を用いた後段の ELISA kit による測定において、一定の定量性の改善が図られることがわかった<sup>13),14),17)</sup>。また、同時に前処理の一連の操作を自動的に行う装置の開発が行われた<sup>15)</sup>。

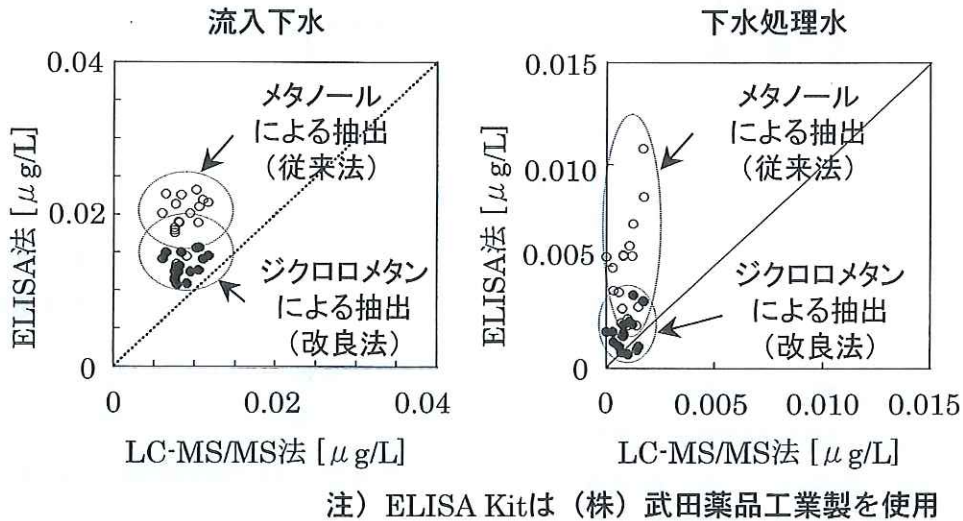


図-5 ELISA 法における前処理手法の改良検討

### 7. まとめと今後の展望

ELISA 法による、環境水や下水などの水中に含まれる 17β エストラジオールの測定に関する課題について整理した。現状では、交差反応や反応を妨害する物質の共存に起因すると考えられる問題により、定量性について課題を有している。これらの物質を効率よく排除する、簡易で効率的な前処理手法の開発が求められるところである。

今後も、引き続き、環境水中の 17β エストラジオールを対象物質として、前処理手法の検討による定量性の改良を行い ELISA 法の確立を目指すとともに、他の天然エストロゲンであるエストロン等、経口避妊薬 (ピル) の主成分である合成エストロゲンのエチニルエストラジオール等に関しても同様に、ELISA 法の確立を検討したいと考えており、平成 14~16 年度に、「都市排水におけるエストロゲンおよびその関連物質の新しい検出技術の開発」と題して、武田薬品工業株式会社と共同研究を実施しているところである。

#### 注 1：固相抽出

固相抽出法とは、化学結合型シリカゲル・ポラスポリマー・アルミナ・活性炭等の固定相 (固相) を用いながら、複雑な組成を示す試料中から特定の目的成分のみを選択的に抽出し、分離・精製を行っていく方法のことである。充填型固相カートリッジとして、あるいはディスク型固相として市販されている。具体的には、目的成分を試料液中から固相に吸着させ、固相に吸着された目的物質を溶媒で溶出させる方法である。

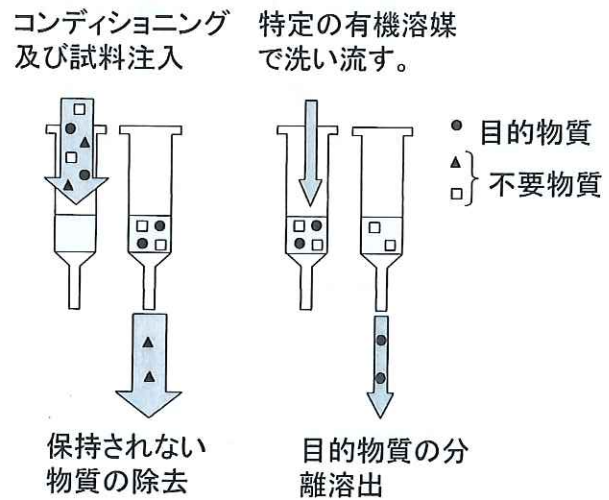


図-6 固相抽出の概念図  
(例：水試料への適用・逆相系の場合)

物質は、それぞれ極性を有しており、極性の小さい物質は極性の小さい方の物質に溶けやすく、極性の大きいものは極性の大きい方の物質に溶けやすいという性質を持っているので、異なる極性の溶媒がある場合、溶質は溶けやすい溶媒へ移動する。この原理を利用して、試料液中の目的物質を抽出するものである。なお、極性の大きい液体の代表は「水」である。そのため、極性の小さい物質は一般に「親油性、疎水性」とよばれ、極性の大きい物質は「親水性」とも呼ばれている。

#### 注 2：交差反応

抗体は特異的に抗原が有する抗原決定基と結合する。これが原則であるが、よく似た抗原決定基にも結合してしまう性質がある。これを交差反応と呼ぶ。さらに、全く異なる物質 (例えば物質 A と物質 B) であっても、全く同じ抗原決定基が偶

然含まれていれば、抗原抗体反応上、この異なる物質を区別できない場合がある。これも広義の交差反応とされている。

**注 3：反応の妨害**

酵素や抗体はタンパク質であるため、熱、酸などにより変成することはもちろんであるが、特定の物質がある濃度以上あると活性の阻害を受ける。環境試料中には、数限りない物質が含まれているため、その中に酵素や抗体の活性を阻害する物質が存在する可能性があり、かつ、濃縮にとともに、阻害を及ぼす濃度以上になる可能性が十分想定される。そのため、妨害物質を排除すること(クリーンアップ)が重要である。

**参考文献**

- 1) 環境庁：内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について-環境ホルモン戦略計画 SPEED'98-, 1998.5
- 2) 環境庁水質保全局水質管理課：水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)の実態概況調査(夏季)結果(速報), 1998.12
- 3) 建設省都市局下水道部監修、社団法人日本下水道協会編：下水道における内分泌攪乱化学物質水質調査マニュアル, 1999.8
- 4) 環境庁水質保全局水質管理課：平成 10 年度水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)実態調査結果, 1999.10
- 5) 国土交通省都市・地域整備局下水道部：平成 11 年度下水道における内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)に関する調査報告, 2000.5
- 6) 小森行也、高橋明宏、田中宏明：LC/MS による下水試料中の 17β-エストラジオールの分析 第 9 回環境化学討論会 日本環境化学会, pp.346-347, 2000.6
- 7) 環境庁水質保全局水質管理課：平成 11 年度水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)実態調査結果, 2000.10
- 8) 環境庁：内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について-環境ホルモン戦略計画 SPEED'98-, 2000.11
- 9) 小森行也、高橋明宏、田中宏明：下水試料中のエストロゲンの分析, 第 3 回研究発表会要旨集, 環境ホルモン学会, pp.125, 2000.12
- 10) 国土交通省都市・地域整備局下水道部監修：下水道における内分泌攪乱化学物質対策調査マニュアル(案) 社団法人日本下水道協会編, 2001.3
- 11) 国土交通省都市・地域整備局下水道部：平成 12 年度下水道における内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)に関する調査報告, 2001.5
- 12) 岡安祐司、田中宏明：環境ホルモン測定への ELISA 法の適用-河川・下水道でのエストロゲンの測定, 免疫化学測定法研究会第 6 回(2001 年)学術集会講演要旨集, 免疫測定法研究会編, pp.12-13, 2001.6
- 13) 郷田泰弘、廣部将人、小林綾子、藤本茂、池道彦、藤田正憲、岡安祐司、田中宏明：女性ホルモン用 ELISA 試料の前処理法の検討, 第 38 回下水道研究発表会講演集, (社)日本下水道協会, pp.903-905, 2001.7
- 14) Yasuhiro Goda, Masato Hirobe, Ayako Kobayashi, Shigeru Fujimoto, Michihiko Ike, Masanori Fujita, Yuji Okayasu, Koya Komori, Hiroaki Tanaka: Development of the ELISA for Detection of Estrogenic Hormones in Environment IWA 2nd World Water Congress, Berlin, Germany IWA CD-ROM, pp.269, 2001.10
- 15) H.Takechi, M. Kawase, Y. Tomita, H. Tanaka, Y. Okayasu, S. Fujimoto, Y. Goda: High Sensitive: Detection of Endocrine Disrupting Chemicals in Sewage Using Immunoassay, Proceedings of WEFTEC 2001 (CDROM) Water Environment Federation, 2001.10
- 16) 環境省環境管理局水環境部水環境課：平成 12 年度水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)実態調査結果, 2001.10
- 17) 廣部将人、郷田泰弘、小林綾子、藤本茂、池道彦、藤田正憲、岡安祐司、小森行也、田中宏明：ELISA 測定用試料の前処理法検討(第 2 報), 水処理生物学会第 38 回大会要旨集, 日本水処理生物学会, pp.11, 2001.11

岡安祐司\*



独立行政法人土木研究所水循環研究グループ水質チーム 研究員  
Yuji OKAYASU