

< ノート >

免疫測定法を利用した下水中女性ホルモンの 簡易測定に関する研究

Study of Simple Measurement of Estrogen in Sewage Using Immunoassay

竹内英樹¹, 松原極¹, 富田美穂¹,
岡安祐司², 田中宏明², 郷田泰弘³, 藤本茂³

¹ 日本ガイシ(株)・エンジニアリング事業本部 開発部 / 愛知県半田市前潟町 1
² 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 / 茨城県つくば市南原 1-6
³ 日本エンバイロケミカルズ(株)・研究開発部 / 大阪府大阪市淀川区十三本町 2-17-85

Hideki Takeuchi¹, Kiwamu Matsubara¹, Yoshiho Tomita¹,
Yuji Okayasu², Hiroaki Tanaka², Yasuhiro Goda³, Shigeru Fujimoto³
¹R&D Dept., Engineering Business Group, NGK INSULATORS, LTD.
/ 1 Maegata-cho, Handa, Aichi 475-0825, Japan
²Water Quality Team, Water Environment Research Group, Public Works Research Institute
/ 1-6 Minamihara, Tsukuba, Ibaraki 305-8516, JAPAN
³R&D Dept., Japan EnviroChemicals, LTD.
/ 17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japan

Abstract

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are normally measured by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) or liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) for the detector. These are very accurate instruments. But the procedures of pretreatment is complicated, so that it takes a lot of time and the automation is very difficult. We have examined simple pretreatment technologies for rapid and automatic measurement, and developed an auto-measurement method of estrogen in sewage using immunoassay. The target compound is 17β -estradiol that is one of estrogen. The point of the main success is by using a column to have found out the method that 17β -estradiol could be extracted simultaneously. As a result, we established the simple pretreatment process that took only 130 minutes for one measurement. And the detection sensitivity was equal to LC-MS, 1.0ng/L. Using this method, we measured 17β -estradiol in sewage. As a result, in sewage influent, the value measured by this method was almost equal to that by LC-MS. But in treatment water, the value measured by this method was 1.23-9.33 times higher than that by LC-MS. The reason is considered to be existence of the substances reacted to anti- 17β -estradiol antibody other than 17β -estradiol. Therefore, future subjects are specification of these substances, and investigating the correlation of measured value and estrogen-like activity value.

Key Words : estrogen, 17β -estradiol, sewage, auto-measurement, immunoassay

1 はじめに

国土交通省の実態調査¹⁾により下水中から様々な内分泌かく乱化学物質,及びその関連物質の存在が確認されている。この中で特に問題視されている物質は,女性ホルモン類とアルキルフェノール類である。女性ホルモン類は,その存在濃度は低いもののエストロゲン様活性²⁾は他の

化学物質に比べ3桁程度高く,また現在の下水処理法では処理されにくい物質でもある。一方アルキルフェノール類は洗剤成分であるノニルフェノールエトキシレートが生物分解されてエストロゲン様作用のあるノニルフェノールを生成することから,下水処理による影響調査が行われている。そこで我々はまず,エストロゲン様活性の点で問題となりうる代表的な女性ホルモンとして 17β -

エストロジオールをターゲットに、簡易測定技術の研究に着手した。

内分泌かく乱化学物質の測定は、GC-MS, LC-MS といった高価な測定機器と複雑な前処理操作が必要のため、前処理を含めた測定に長時間（2日間程度）が必要で、また自動化は難しいものであった。これらの課題を克服するために、免疫測定を利用した下水中女性ホルモンの簡易測定について検討を行った。免疫測定は抗体の持つ親和性と特異性から、測定の高感度化と前処理を簡易化できる可能性を有する。そこで本研究では、前処理の簡易、迅速化の検討を行った。一方免疫測定については、米国 Sapidyne 社の自動免疫測定装置を利用した。

Sapidyne 社の免疫測定装置 (KinExA™3000) は、固相として ELISA プレートでなく光透過性ビーズを利用し、フローセル内に充填したビーズ表面で免疫反応を行い、蛍光値を測定するシステムであり、非常に短時間に、高感度な自動測定が可能となる。その配管フローと動作手順を Fig.1 に示す。

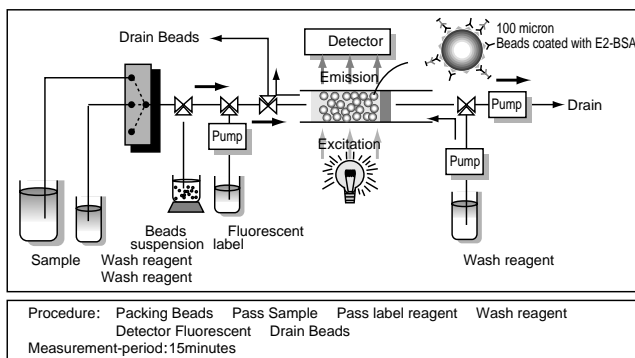


Fig.1 KinExA™3000 Simplified Flow Diagram

2 実験方法

下水中の 17β -エストロジオール (E2) を測定するための前処理方法としては、「下水道における内分泌かく乱化学物質水質調査マニュアル」³⁾を参考に、自動化可能な簡易プロセスとして Fig.2 に示す分析フローを設計した。

Sample; 下水試料中の夾雑物を 2mm ふりいで除き使用

Column - treatment; 下水懸濁試料を直接カラム処理 (捕捉 → 脱水 → 抽出)

Concentration; 抽出溶媒を加温、窒素パーズにより濃縮

Solvent - adjust; 濃縮試料の希釈, 抗体溶液との混合, かくはん

Immunoassay; 抗 E2 モノクローナル抗体を利用した間接競合イムノアッセイ法

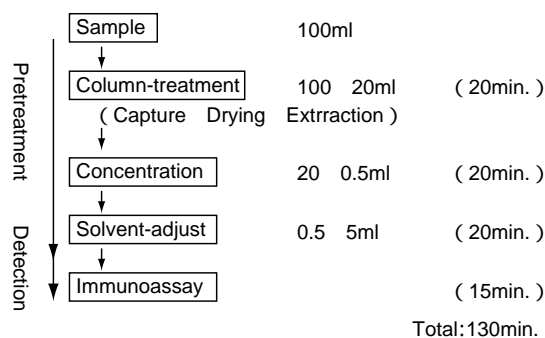


Fig.2 Analytical process

この分析フローの前処理部分について、まずカラム処理工程の簡易化の検討を行い、続いて機器分析用前処理との比較を以下の方法により実施した。

2.1 カラム処理工程の簡易化の検討

下水流入水中には高濃度の浮遊物質 (SS) が含まれており、その SS に多くの化学物質が吸着する。そこでろ紙により SS を分離して、SS 成分と溶解成分を別々に抽出処理するのが一般的である。しかし自動化するには別々の処理は面倒であるため、固相抽出カラムによる同時処理の検討を行った。

1) 捕捉条件の検討

固相抽出カラム内には、ろ紙と固相充填剤が入っており、SS 分をろ紙に、溶解成分を充填剤に捕捉させる。そこでろ紙の種類と面積、充填剤の量について検討を行った。ろ紙の通水試験条件として、下水流入水の SS 濃度は a) 124mg/L, b) 217mg/L, ろ紙の種類は a) ガラス繊維ろ紙 $1\mu\text{m}$ (ワットマン GF/B), b) ガラス繊維ろ紙 $10+1\mu\text{m}$ の 2 層タイプ (ワットマン GMF150), ポンプとしては、チューピングポンプを一定回転数にて使用した。また充填剤は C18 逆相充填剤 $40\mu\text{m}$ (ボンデシル C18) 1g に対して下水負荷量を 20, 60, 100ml と変えて破過試験を行った。

2) 抽出条件の検討

SS 成分の抽出処理条件としてはアセトンに浸漬した状態で超音波処理するのが一般的であるが、アセトンは免疫反応を阻害するため代替溶媒としてメタノールの検

討を行った。また簡易処理として、超音波処理なしの10分間浸漬処理で抽出効率が変化するかどうか確認試験を行った。

2.2 機器分析用前処理との比較

Fig.2 に示す前処理プロセスによる E2 回収性能を調査するため、下水流入水を用いて LC-MS/MS 用前処理との比較を行った。LC-MS/MS 分析フロー⁴⁾を以下に示す。① 下水試料、② 簡易前処理を行った濃縮回収液*を試料として LC-MS/MS 分析を行い、その測定値を比較した。

<LC-MS/MS 分析フロー >

試料* → ろ過 → SS のアセトン抽出 → サロゲート添加 → C18 固相カラムに通水 → 脱水 → 酢酸エチル/メタノール (5:1) 溶出 → 濃縮 → 酢酸エチルに溶解 → 無水硫酸ナトリウムカラムにて脱水 → 濃縮・乾固 → ヘキサン/ジクロロメタン (1:1) に溶解 → フロリジルカラムに通水 → アセトン/ジクロロメタン (5:95) 溶出 → 濃縮・乾固 → メタノールに溶解 → 遠心分離後上澄み液採取 → LC-MS/MS 測定

*② は簡易前処理の濃縮回収液を精製水により 50 倍希釈したものを試料とした

2.3 測定感度の確認

免疫測定には米国 Sapidyne 社の KinExATM3000 という自動免疫測定装置を用いた^{5),6)}。この装置により僅か 15 分で測定が可能となる。抗体は市販の抗 E2 モノクローナル抗体と Cy5 蛍光標識抗体の 2 種類を用いた。固相は約 100 μ m の PMMA (ポリメチルメタクリレート) 製光透過性ビーズに E2-BSA を固定化して用いた。また妨害物質対策として反応溶液中の牛血清アルブミン (BSA) 濃度を通常の 10 倍である 1%とした。そして間接競合イムノアッセイ法により測定を行い、検量線を作成した。測定感度については、前処理による濃縮率と検量線の定量下限値より計算した。

2.4 下水試料の測定

試料は 9 箇所の下水処理場より採水した初沈流入水と二次処理水を用いた。下水処理方式はいずれも標準活性汚泥法である。測定方法としては Fig.2 の免疫測定法と LC-MS/MS 法の 2 種類により行った。

3 結果と考察

3.1 ろ紙の目詰まり試験結果

ろ紙 2 種類について流入下水を通水したところ、1 層タイプの GF/B に比べて 2 層タイプの GMF150 は 3 倍程度多くの下水試料を目詰まりなく流すことができた (Tab.1)。

そこで GMF150 を選定し、内径 26.5mm (有効面積 5.5cm²) プラスチックカラム (Fig.3) の入口に配置して流入下水 2 種類の目詰まり試験を行った。その結果、一定流速にて流入下水を 100ml 以上通水できることを確認した (Fig.4)。

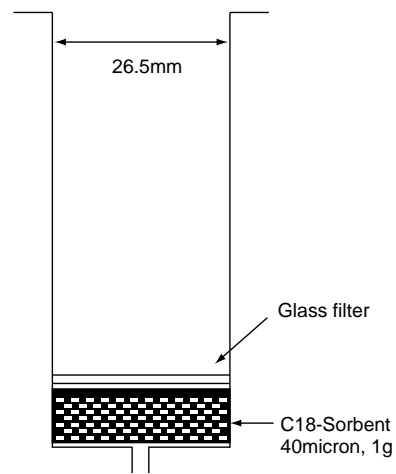


Fig.3 Column of SPE (Solid Phase Extraction)

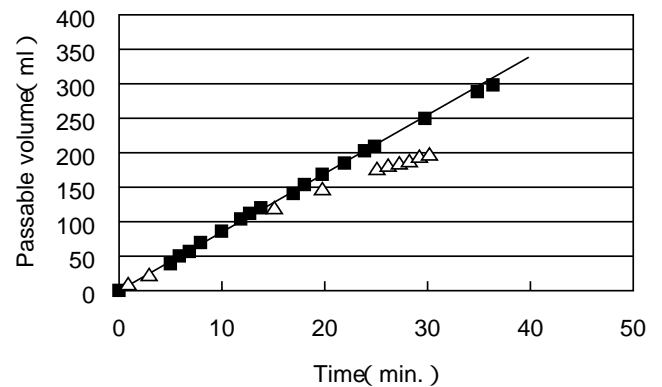


Fig.4 Filtration test 2

□ : sample a) △ : sample b) — : water

Tab.1 Filtration test 1

Grass Filter	Pore size	Area	SS conc. of sewage	Passable volume
GF/B	1.0 μ m	9.6cm ²	a) 217mg/L	72ml, 76ml (av. 74ml)
GMF150	1.0 μ m	9.6cm ²	a) 217mg/L	209ml, 250ml (av. 230ml)

Tab.2 Comparative study of pretreatment conditions

Pretreatment	Sample Volume	C18-sorbent weight	Extraction solvent	Ultrasonic wave	Value (ng-E2/L)
method 1	20ml	1g	Methanol	×	12.1
	60ml				11.0
	100ml				11.1
method 2	100ml	1g	Methanol	○	11.5
method 3	100ml	1g	Aceton	×	12.0
LC-MS/MS method	100ml	0.5g×2	Aceton	○	11.8

3.2 前処理条件の比較試験結果

捕捉条件，抽出条件を変えて機器分析用前処理と比較した結果を Tab.2 に示す．

これより充填剤量は 1g，抽出溶媒はメタノール，超音波処理なしの簡易前処理条件で流入下水 100ml を機器分析用前処理と同等の回収率にて処理できることを確認した．同等の回収率が得られた理由としては，抽出物質の水溶性と関連があると思われる．17 β -エストラジオールは他の内分泌攪乱化学物質よりも水溶性が高く，そのため機器分析用の前処理条件（アセトン，超音波処理あり）に比べてマイルドな条件で回収できたと考えている．

3.3 測定感度の確認試験結果

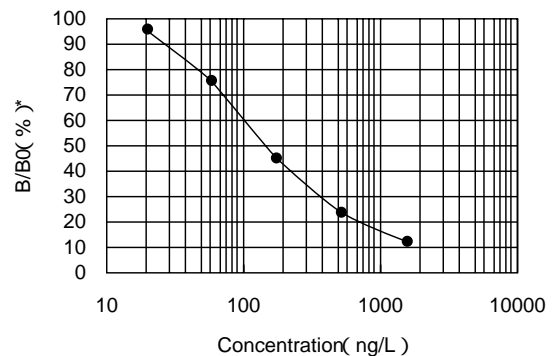
E2 検量線を Fig.5 に示す．

検量線の定量範囲は 20~1,620ng/L となる．前処理により下水試料 100ml を 5ml まで 20 倍濃縮するため，全体の測定感度は 1.0ng/L と機器分析同等の測定が可能となる．

3.4 下水試料の測定結果

簡易前処理の自動装置化と自動免疫測定装置により 1 検体当たり 130 分で測定が可能となった．自動化した前処理装置の配管フローを Fig.6 に示す．

この測定方法と LC-MS/MS 法の 2 種類により下水試料中の E2 の測定を行った．

Fig.5 17 β -estradiol calibration curve

*Binding ratio of primary antibody to E2-BSA coated to PMMA-beads
(at E2=0ng/L \rightarrow B/B0=100%)

その結果，流入水ではほぼ同等の結果が得られた (Tab.3)．

一方処理水では，LC-MS/MS 値に比べ免疫測定値は 1.23~9.33 倍と流入水に比べ大きな乖離が見られ，また処理場ごとのバラツキも大きかった (Tab.4)．

理由としては，① 抗体と反応する E2 以外の物質，つまり交差反応物質が存在し，その物質が下水処理されにくい，② 交差反応物質としては E2 以外の女性ホルモンと女性ホルモン抱合体の影響，が考えられる．そこで，今回使用した抗 E2 抗体の交差反応性データを Tab.5 に示す．

これより下水処理水中の存在が報告⁴⁾されているエストロン (E1) や，抱合体の影響が少なからずあるものと

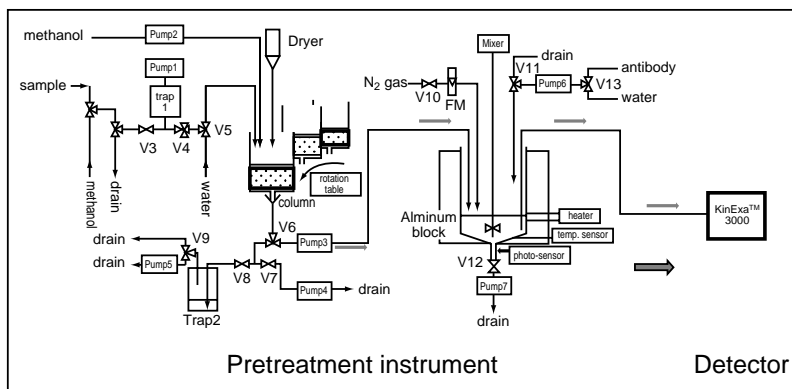


Fig.6 Flow diagram of pretreatment instrument

Tab.3 Measurement result of sewage influent (unit: ng-E2/L)

Sewage plant No.	SS conc. (mg/L)	Immunoassay (a)	LC-MS/MS (b)	a/b
A	—	6.49	4.51	1.44
B	241	14.4	11.8	1.22
C	578	30.5	29.3	1.04
D	115	12.7	13.0	0.98
E	25.5	20.7	17.0	1.22
F	268	17.7	18.4	0.96
G	85.4	28.6	25.9	1.10
H	239	15.7	20.2	0.78
I	66.2	19.0	15.7	1.21

Tab.4 Measurement result of sewage treatment water (unit: ng-E2/L)

Sewage plant No.	SS conc. (mg/L)	Immunoassay (a)	LC-MS/MS (b)	a/b
A	—	4.70	tr	—
B	4.0	2.77	tr	—
C	5.0	3.14	1.50	2.09
D	1.0	10.3	3.10	3.32
E	4.5	8.04	0.86	9.34
F	1.0	7.37	3.16	2.33
G	<1.0	5.89	2.03	2.90
H	3.0	5.74	4.67	1.23
I	1.0	9.19	1.43	6.43

Tab.5 Cross reactivity of anti-E2 monoclonal antibody

Compounds	Cross Reactivity (%)
Estrone (E1)	1.3
2-methoxy E1	<0.4
E1-3-sulfate	1.0
17beta-Estradiol (E2)	100.0
16-keto E2	16.0
2-methoxy E2	2.0
E2-17-glucuronide	<0.4
E2-3-glucuronide	16.0
E2-3-sulfate-17-glucuronide	<0.4
Estriol (E3)	0.6
16-epi-E3	0.5
E3-16-glucuronide	<0.4
17alpha-Ethynylestradiol (EE2)	50.0

予想される。

4 まとめ

下水試料中の 17β-エストラジオール (E2) の簡易測定について検討を行った結果、

- (1) 免疫測定用簡易前処理プロセスの検討を行い、機器分析用前処理と同等の回収性能を確認。
 - ・カラム：内径/26.5mm，ろ紙/2層ガラス繊維ろ紙，10+1μm，充填剤/C18 逆相充填剤，40μm，1g
 - ・抽出条件：メタノール 20ml，超音波処理なし，浸漬 10 分間
- (2) 免疫測定における E2 定量範囲は 20～ 1,620ng/L，前処理による濃縮倍率 20 倍より，E2 測定感度は 1.0ng/L と機器分析同等を確認。試料量を 100ml 以上とすることにより更なる高感度化も可能。
- (3) 簡易前処理の自動化と自動免疫測定装置により 1 検体あたり 130 分で測定可能。
- (4) 本測定法と LC-MS/MS 法の測定値を比較した結果，流入下水ではほぼ同等を確認。一方処理水で 1.23～9.33 倍と高値かつ大きなバラツキを確認。理由としては，① 交差反応性物質の存在，② E2 以外の女性ホルモンと抱合体の影響，が考えられる。

今後は，乖離原因物質の解明と除去方法の検討，およびその物質のエストロゲン様活性の調査を行いたいと考えている。また，他の下水処理場試料や河川，湖沼等の

環境水の測定，更には 17β-エストラジオール以外の物質の測定についても検討していきたいと考えている。

また，本測定方法は，現状下水流入水や処理水の迅速・簡易測定に利用できるが，将来的には自動モニタリング，無人監視へも適用できると考えている。

本研究は土木研究所，武田薬品工業との 3 社共同研究にて実施しました。

[参考文献]

- 1) 国土交通省下水道部；下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査報告，水道公論，37, 6, pp.46-53 (2001)
- 2) 矢古宇靖子ら；第 36 回環境工学研究論文集，pp.199-208 (1999)
- 3) (社) 日本下水道協会；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)
- 4) 小森行也ら；第 38 回下水道研究発表会講演集，pp.897-899 (2001)
- 5) 大村直也ら；第 35 回日本水環境学会年会講演集，p.164 (2001)
- 6) 竹内英樹ら；第 39 回下水道研究発表会講演集，pp.83-85 (2002)