特集1・微量汚染物質のバイオ技術による測定法

ELISA 法による環境ホルモンの分析

郷 田 泰 弘*

1. はじめに

現在、内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の測定に使用されている高分解能GC-MS¹⁾やLC-MS/MS²⁾は、精度・感度の両面で優れており信頼性の高い測定法である。しかしながら、これらの方法は高価な分析機器、熟練した技術、煩雑な濃縮・クリーンアップ操作等を必要とすることから、どこの研究室でも、誰でもが、いつでも、定量できるまでには至っていない。

一方、抗体と酵素を利用した酵素免疫法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA法)はどこの研究室でも測定可能な簡便な方法であり、極微量の環境ホルモンの測定が可能なELISAキットの開発が待たれていた。ここでは、環境ホルモン研究の進展に寄与することを目的として、当社が開発した（あるいは開発中の）環境ホルモン測定用ELISAキットを紹介する。

2. ELISAキットの概要

測定対象としては、環境ホルモンと疑われている物質の中で、比較的検出頻度が高い物質³⁾であるビスフェノールA（BPA）、アルキルフェノール類（AP）、フタル酸ジエチルヘキシル（DEHP）、フタル酸ジブチル（DBP）、クロロフェノール類（CP）を選出した。また、工業製品由来ではないが環境中でのエストロゲン活性の大部分を占める天然の女性ホルモン（17 β -エストラジオール：E2，エストロン：E1，エストリオール：E3），およびE2と同等のエストロゲン活性を有する医薬品由来のエチニルエストラジオール（EE2）も測定対象とした（表1）。

キット形態としてはマイクロプレート法とチューブ法の2種類を開発した（図-1）。前者は、吸光度読みとり時に専用のマイクロプレートリーダー（価格：100万円前後）を必要とするが、多検体同時処理が可能であり、後者は多検体処理には向かないが、通常の比色系で測定可能である。両タイプと

表1 武田薬品の環境ホルモンELISAキット

測定対象	定量範囲 ($\mu\text{g/L}$)	開発状況
工業製品由来		
ビスフェノールA (BPA)	5-500	発売中
BPA高感度タイプ	0.05-10	近日発売
アルキルフェノール (AP)	5-500	発売中
フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)	200-4000	開発中
フタル酸ジブチル (DBP)	200-4000	開発中
クロロフェノール類 (CP)	2-60	開発中
人畜由来		
17 β -エストラジオール (E2)	0.05-1	発売中
エストロン (E1)	0.05-5	発売中
エストロゲン (E1+E2+エストリオール (E3))	0.1-3	発売中
医薬品由来		
17 α -エチニルエストラジオール (EE2)	0.05-3	発売中

*武田薬品工業(株)生活環境カンパニー Yasuhiro GODA

キットの種類	特徴
マイクロプレート法	測定時間:2-3 Hr マイクロプレートリーダー必要 多検体同時処理可能
チューブ法	測定時間:2-3Hr 通常比色計で測定可能

図-1 ELISAキット形態

も性能的には同等に設定しており、サンプル数および実験室の状況に応じた選択を可能とした。

測定サンプルは基本的には簡便な前処理を必要とする。しかしながら対象物質およびサンプルマトリクスにより前処理法が異なること、また現在も前処理法の改良を進めていることからここでの詳述は割愛させていただく。なお、最新の前処理法およびELISA情報については、当社ホームページ(<http://www.takeda.co.jp/l-e/elisa/index.html>)を参照いただきたい。

3. ELISAキットの操作方法

測定原理は直接競合法（DEHPのみ間接競合法）である（図-2）。対象化合物に対する抗体をマイクロプレートまたはチューブ表面に固定化し、対象化合物と酵素標識抗原を添加する。競合反応の後、

抗体に結合した酵素標識抗原の量を、発色基質を添加することにより測定する。ここで、サンプル中の対象化合物の濃度が高いと抗体に結合する酵素標識抗原の量が減少することから、発色度が減少する。このように発色度からサンプル中の対象化合物の濃度を求めることができる。

実際の測定に必要な試薬は全てELISAキットに付属している。ただしプレートタイプを使用する場合は、周辺機器として前述のプレートリーダーおよびマルチチャンネルピペット等が、またチューブタイプを使用する場合は通常の分光光度計（1 ml容のセルが必要）およびピペットマン等が必要となる。ここではプレートタイプのELISAキットを例に使用方法を述べる（図-3）。なお、チューブタイプは、液量がすべてプレートタイプの5倍液量となる。

前処理した測定試料（100 μ L）と酵素標識抗原（100 μ L）とを混合用プレートに添加し、混合液100 μ L/wellを抗体固相化マイクロプレートへ添加する。60分間室温で競合反応させた後、300 μ L/wellの洗浄液で3回洗浄する。発色基質液を100 μ L/wellで添加し、30分間室温で発色反応させる。発色停止液を100 μ L/wellで添加し、マイクロプレートリーダー（測定波長450nm）で吸光度を測定する。市販ソフトを使用して標準曲線を4-parameterでフィッティングし、未知濃度試料の濃度計算を行う。専用ソフトがない場合は、標準曲線を両対数グラフにプロットし、未知濃度試料の吸光度から

図-2 直接競合ELISA法の測定原理
(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

図－3 ELISAキット使用方法

濃度を求めることもできる。全行程が約2～3時間で終了し、しかも高価な機器が不要であるため、どこの研究室でも測定可能な、簡便かつ高感度な環境ホルモン定量法である。

4. ELISAキットの性能

現在発売中および開発中のキットの定量範囲（表1）、交差反応性等、性能の概略を以下に示す。

(1) BPA ELISA（発売中）

現在発売中のBPA ELISA（BPA-1, 抗体：BPA2-177）の定量範囲は5～500 μg/Lである。また、近日発売予定の高感度タイプELISA（BPA-2, 抗体：BBA-2187, 神戸大・大川研究室取得）の定量範囲は0.05～10 μg/Lと、BPA-1の100倍高感度となっている。両ELISAともBPAに対して特異性が非常に高くBPAのみを特異的に定量できる

表2 交差反応性－BPA関連化合物－

交差反応性(%)	
名称	R1	R2	R3	R4	R5	BPA-2	BPA-1
Bisphenol A (BPA)	OH	C	OH	CH3	CH3	100.0	100.0
Bisphenol B (BPB)	OH	C	OH	CH3	C2H5	15.6	10.6
Bisphenol E (BPE)	OH	C	OH	H	CH3	6.0	15.2
Bisphenol S (BPS)	OH	SO2	OH	-	-	0.2	1.5
BPA Dimethacrylate		C		CH3	CH3	0.7	9.5
BPA Diglycidyl Ether		C		CH3	CH3	<0.1	<0.1
BPA Diacetate	OOCCH3	C	OOCCH3	CH3	CH3	0.2	7.6
Bis(p-hydroxyphenyl)methane	OH	C	OH	H	H	1.8	5.4
1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-propanol	OH	CH2C	OH	OH	CH3	0.4	0.2
2,2'-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-propanol	OH	C	OH	CH3	CH2OH	1.7	<0.1
Bis[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]sulfone	O(CH2)2OH	SO2	O(CH2)2OH	-	-	<0.1	<0.1
BPX-33		C		CH3	CH3	<0.1	1.8
4,4'-Bis(p-hydroxyphenyl) pentanoic acid	OH	C	OH	CH3	C2H4COOH	<0.1	<0.1
p, p'-dihydroxybenzophenone	OH	C	OH	-	O	<0.1	<0.1
4,4'-dihydroxydiphenyl ether	OH	O	OH	-	-	0.2	3.4

表3 交差反応性－AP 関連化合物－

化合物	交差反応性 (%)
ノニルフェノール (NP)	100
オクチルフェノール (OP)	187
ノニルフェノールエトキシレート (NPnEO)	
NPnEO (n = 1)	127
NPnEO (n = 2)	175
NPnEO (n ≐ 5)	140
NPnEO (n ≐ 7.5)	112
NPnEO (n ≐ 10)	100
オクチルフェノールエトキシレート (OPnEO)	
OPnEO (n ≐ 10)	156
ノニルフェノキシ酢酸 (NPnEC)	
NPnEC (n = 2)	423
NPnEC (n = 3)	423

表4 交差反応性－フタル酸エステル類－

抗DEHP抗体:DH-150 抗DBP抗体:DF-34			交差反応性(%)	
	R1	R2	DH-150	DF-34
フタル酸ジエチル(DEF)	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	<1	26
フタル酸ジプロピル(DPrP)	(CH ₂) ₂ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	<1	60
フタル酸ジブチル(DBP)	(CH ₂) ₃ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	2	100
フタル酸ブチルベンジル(BBP)	(CH ₂) ₂	(CH ₂) ₃ CH ₃	3	155
フタル酸ジペンチル(DPnP)	(CH ₂) ₄ CH ₃	(CH ₂) ₄ CH ₃	3	51
フタル酸ジシクロヘキシル(DCHP)			3	23
フタル酸ジヘキシル(DHP)	(CH ₂) ₅ CH ₃	(CH ₂) ₅ CH ₃	3	<1
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP)			100	<1
アジピン酸ジエチルヘキシル (DEHA)			3	<1

(表2)．なお、10 %前後の交差反応性を示すBPBおよびBPEは、生産量がBPAの1/1000以下であることから、通常のサンプルでは定量値には影響しないと思われる。

(2) AP ELISA (発売中)

AP ELISA (抗体：AP-14) の定量範囲は5 ～ 500 μg/Lである．本ELISAはノニルフェノール、オクチルフェノール等のAP以外に、その前駆物質であるノニルフェノールエトキシレート、オクチル

フェノールエトキシレート、ノニルフェノキシ酢酸等とも反応し、これらの物質を総量で定量するキットである (表3)．APに関しては上記前駆物質にも弱いながらエストロゲン活性が確認されており、これらの化合物をトータルで測定することもAP関連物質由来のエストロゲン活性を把握する上で重要と思われる．なお、APのみを特異的に認識する抗体も取得中である．

(3) DEHP, DBP ELISA (開発中)

表5 交差反応性—クロロフェノール類—

化合物	交差反応性 (%)
2-クロロフェノール	30
3-クロロフェノール	22
4-クロロフェノール	100
2,3-ジクロロフェノール	19
2,4-ジクロロフェノール	100
2,5-ジクロロフェノール	7
2,6-ジクロロフェノール	1
3,4-ジクロロフェノール	28
3,5-ジクロロフェノール	0.3
2,3,6-トリクロロフェノール	3
2,4,6-トリクロロフェノール	13
2,3,4,6-テトラクロロフェノール	9
ペンタクロロフェノール	0.3
フェノール	24

表6 交差反応性—エストロゲン類—

Compounds	E2	ES	EE2	E1
Estrone (E1)	1.3	87.0	<0.2	100
2-methoxy E1	<0.4	<0.03	<0.2	0.4
E1-3-sulfate	1.0	<0.03	<0.2	<0.1
17beta-Estradiol (E2)	100	100	<0.2	0.7
16-keto E2	16.0	118.0	<0.2	0.2
2-methoxy E2	2.0	0.2	<0.2	—
E2-17-glucuronide	<0.4	5.0	<0.2	<0.1
E2-3-glucuronide	16.0	<0.03	<0.2	0.3
E2-3-sulfate-17-glucuronide	<0.4	0.5	<0.2	—
Estriol (E3)	0.6	55.0	<0.2	<0.1
16-epi-E3	0.5	129.0	<0.2	<0.1
E3-16-glucuronide	<0.4	48.0	<0.2	<0.1
17alfa-Ethynylestradiol (EE2)	50.0	1.0	100	<0.1

DEHP ELISA (抗体: DH-150) の定量範囲は 150 ~ 2500 μ g/L, DBP ELISA (抗体: DF-34) の定量範囲は 200 ~ 4000 μ g/L である。DEHP ELISA は DEHP のみと特異的に反応し, 他のフタル酸エステル類とは反応しない (表 4)。また, DBP ELISA は炭素数の短いフタル酸エステル類と幅広く反応する (表 4)。なお, フタル酸エステル類に関する抗体は感度的に不十分であることから, 更に感度の良い抗体を取得中である。

(4) CP ELISA (開発中)

CP ELISA (抗体: CP-8) の定量範囲は 2 ~ 60 μ g/L であり, 塩素の位置や数により異なる交差反応性を示す (表 5)。

(5) E2 ELISA (発売中)

E2 ELISA の定量範囲は 0.05 ~ 1 μ g/L である。本 ELISA は E2 と特異的に反応するが, EE2 とも 50 % 程度反応する (表 6)。

(6) E1 ELISA (発売中)

E1 ELISA (抗体: E1-159) の定量範囲は 0.05 ~ 5 μ g/L であり, E1 のみと特異的に反応する (表 6)。

(7) ES ELISA (発売中)

ES ELISA の定量範囲は 0.1 ~ 3 μ g/L (標準物質: E2) である。本 ELISA は E1, E2, E3 と反応し, エストロゲン類をトータルで測定するものである (表 6)。また, 他の研究機関において, 組み替え酵母を用いたエストロゲン活性測定値と本 ELISA 定量値との間に良好な相関関係が確認されており, ES ELISA がエストロゲン活性測定法の代替法として使用できる可能性も示唆されている。

(8) EE2 ELISA (発売中)

EE2 ELISA (抗体: EE2-227) の定量範囲は 0.05 ~ 3 μ g/L であり, EE2 以外の女性ホルモンとは反応しない (表 6)。

5. 機器分析との比較

ELISA と機器分析との比較の一例として, 独立行政法人・土木研究所と共同で実施中の下水サンプル中のエストロゲン類測定における ELISA と LC-MS/MS の比較データを以下に紹介する。

サンプル前処理法の概要を図-4 に示す。LC-MS/MS の前処理法が 3 種類の固相抽出からなるのに対し, ELISA の前処理法はワンステップの固相抽出と簡便となっている。また, ELISA 前処理時の溶出溶媒としてジクロロメタン (DCM) とメタ

図-4 女性ホルモン用前処理法の比較

図－5 C18固相からの溶出液の影響

ノール (MeOH) を比較したところ、DCM 溶出時の方が LC-MS/MS との乖離が減少する傾向が見られた (図－5) ことから、C18 固相からの ELISA 用の溶出液としては DCM を採用した。

図－4 のスキームに従い、同じサンプリングポイント (初沈越流水、エアレーションタンク、2 次処理水) において、繰り返し抽出・測定を行った時の平均値を表 7 に示した。なお、ELISA 測定には当社開発キット (E2-T, EE2-T) とともに、比較用として国内で入手可能な市販 ELISA キット (E2-AD, E2-CC, E2-NG, E2-RB, EE2-RB) についても同時に使用した。その結果、E2 に関しては当社 ELISA (E2-T) が LC-MS/MS 定量値の約 1.1 ～ 2.2 倍程度の数値となったのに対し、他社品は過剰定量が大きい傾向にあり、他社品の中で最も過剰定

量が少ない E2-AD でも約 2.5 ～ 4.5 倍程度の数値であった。このように、E2 ELISA に関しては、当社 ELISA が LC-MS/MS 定量値に最も近似する結果となった。

また、EE2 に関しては、何れのサンプルにおいても LC-MS/MS および当社 ELISA (EE2-T) では定量下限値未満であった。このことから、当社 ELISA に関しては EE2 を含むサンプルを用いて更に比較データを蓄積する必要があると考えている。一方、市販品の ELISA では 1 ppt 前後検出され、過剰定量する傾向がみられた。

6. お わ り に

ELISA キットの今後の課題として、(1) バリデーションデータの充実、(2) ELISA 過剰定量回避 (3) 高感度化の 3 点が挙げられる。

(1) バリデーションデータの充実

一部の ELISA キットについては比較的十分なデータを取得しているが、キット自体の基礎データ (日内、日差、室間変動、種々のサンプルにおける回収率等) や機器分析値との比較データが十分でない ELISA キットもある。これら ELISA のバリデーションデータを充実させることにより、公定法への収載を働きかけ (E2 ELISA に関しては下水方法 (追補暫定版)⁴⁾ に収載)、ELISA の認知度を上げていくことが重要であると考えている。

(2) ELISA 過剰定量回避

HPLC による分画など機器分析と同程度の前処理を行えば、過剰定量を回避できることは分かっている⁵⁾ものの、前処理を簡便にして、かつ、過剰定量を回避するために、抗体の改良および前処理法の開

表 7 機器分析値との比較

E2 (ng/L)							
サンプル	N ^{a)}	LC-MS/MS	E2-T ^{b)}	E2-AD ^{c)}	E2-CC ^{c)}	E2-NG ^{c)}	E2-RB ^{c)}
初沈越流水	10	8.4	12.5	21.1	81.4	97.6	202.2
エアレーションタンク	13	1.9	2.1	4.4	9.4	7.8	31.6
終沈越流水	5	1.2	2.6	5.3	15.1	18.8	75.9

EE2 (ng/L)				
サンプル	N ^{a)}	LC-MS/MS	EE2-T ^{b)}	EE2-RB ^{c)}
初沈越流水	18	<0.5	<0.2	3.1
エアレーションタンク	19	<0.5	<0.1	1.0
終沈越流水	11	<0.5	<0.1	0.8

a) N = サンプル数, b) 当社開発 ELISA, c) 市販品 ELISA

発に取り組んでいる。前者に関しては過剰定量原因物質をHPLCで分画し、抗体スクリーニングの際に本物質と反応しない抗体を選出することにより、過剰定量の少ないELISAを開発している。また、後者に関しては定量用の抗体とは異なる抗体を用いたアフィニティーカラムによる前処理法を開発中である⁶⁾。

(3) 高感度化

BPA ELISAでは神戸大・大川研究室で取得された抗体を用いることにより100倍の高感度化(定量下限値:0.05 μ g/L)に成功した。これにより、環境サンプルの直接測定が可能となった。

ELISAにおける最大のメリットは簡便さにあり、前処理なしで、そのまま測定することが理想的な使用方法である。このことから、他のELISAに関しても抗体や検出系の改良等により高感度化検討を行い、前処理なしでもそのまま測定できるELISAの

開発を目指している。

参考文献

- 1) 環境庁水質保全局水質管理課：「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」(平成10年10月)(<http://w-chemdb.nies.go.jp/kis-plus/分析リスト.htm>)
- 2) 石井ら：「LC-MS/MS法による河川水中のエストロジェンの分析」, 第34回日本水環境学会年会講演集, p82 (2000)
- 3) 環境省環境管理局水環境部水環境管理課：「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」, 平成13年度第2回内分泌攪乱化学物質問題検討会(2001.10.3)(<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1302/mat02.pdf>)
- 4) 下水試験方法(追補暫定版)ー内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスボルジウム編ー, p275 (2002)
- 5) 田代：「ELISA法および組換え酵母法によるエストロゲン測定におけるGPCを用いた妨害物質除去法」, 環境ホルモン学会第4回研究発表会要旨集, p144 (2001)
- 6) 郷田ら：「女性ホルモン定量用ELISAの前処理法検討」, 第11回環境化学討論会講演要旨集, p92 (2002)

行事案内

食品産業環境保全技術研究組合研究成果公開発表会のお知らせ

主 催：食品産業環境保全技術研究組合
エコシステム事業部会

日 時：平成14年11月15日(金) 9:30~16:40

会 場：発明会館ホール(東京都港区虎ノ門2-9-14
Tel: 03-3502-5499)

参加費：12,000円(成果論文集を含む。)

申込期限：平成14年10月21日(月), 130名先着順

申込先：

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町17-17
峰澤ビル4階 食品産業環境保全技術研究組合
TEL 03-3663-7770

プログラム

(成果発表)：

油脂のメタン化技術の開発(アタカ工業(株))/油脂含有食品加工排水のメタン発酵促進技術の開発(株)荏原製作所/嫌気性発酵を用いた生ごみ、焼酎廃液、汚泥混合廃棄物処理技術の開発(株)日本製鋼所/余剰汚泥の排出を抑制した有機性廃棄物処理技術の開発(キューピー(株))/鯖節製造廃

液の有効利用・処理技術の開発(日本たばこ産業(株)・協同組合沼津水産開発センター)/水産加工排水汚泥等の減量化及び発酵熱の有効利用技術の開発(株)オーケーバイオ研究所/でんぷん工場等の高濃度排水の物理化学的固液分離技術の開発(株)前川製作所/オゾンを用いた食品工場の高効率余剰汚泥減容技術の開発(三菱電機(株))/小規模食品工場排水の低コスト汚泥減量化技術の開発(ナガノエヌ・イー(株))/嫌気・好気発酵処理への植物抽出液の添加による汚泥低減化技術の開発(田代興業(株))/物理粉碎と化学処理を利用した余剰汚泥減容化排水処理技術の開発(アクアス(株))/食肉加工場のトータルサイト解析に基づく廃水・汚泥削減技術の開発(プリマハム(株)・栗田工業(株))

(特別講演)

「食品・醸造系排水や廃棄物のメタン発酵による処理及びサーマルリサイクル」について

熊本大学工学部物質生命化学科教授 木田健次