

## 免疫測定法を利用した下水中女性ホルモンの自動計測に関する研究

○竹内英樹<sup>1</sup>、松原極<sup>1</sup>、富田美穂<sup>1</sup>  
岡安祐司<sup>2</sup>、田中宏明<sup>2</sup>、郷田泰弘<sup>3</sup>、藤本茂<sup>3</sup>

- <sup>1</sup>. 日本ガイシ (株)  
<sup>2</sup>. (独) 土木研究所  
<sup>3</sup>. 武田薬品工業 (株)

**概要:** 内分泌かく乱化学物質の測定には、検出方法として GC-MS 法、LC-MS 法等の機器分析が一般的に用いられるが、前処理操作が大変複雑なため、前処理を含めた測定に長時間が必要で、また自動化は難しいものであった。そこで我々は、測定時間の短縮と自動計測を目指し、前処理工程の簡易・自動化の検討、更に検出方法として免疫測定法を利用した自動計測技術に関する研究を行った。測定対象は下水試料中の  $17\beta$ -エストジオールとした。その結果、1 検体当たり 130 分で測定可能な簡易プロセスを構築、自動化を行った。測定感度は  $1.0\text{ng/L}$  と機器分析同等であった。またその測定値は、LC-MS/MS に比べ流入水ではほぼ同等、二次処理水で 1.2~6.6 倍の値となった。

**キーワード:** 女性ホルモン  $17\beta$ -エストジオール 下水 自動計測 免疫測定

### 1. はじめに

国土交通省の実態調査<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>は他の化学物質に比べ 3 桁程度高く、また下水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、下水処理の影響について調査が行われている。そこで我々はまず、代表的な女性ホルモンである  $17\beta$ -エストジオールをターゲットに、自動計測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なため、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自動計測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ため、前処理部分については、簡易、迅速、自動化の検討を行った。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て検討を行った。

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

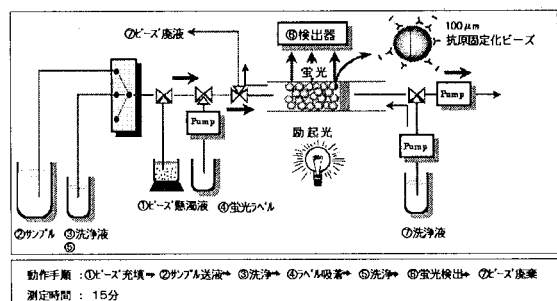


図1. KinExA™ 3000 の配管7+概略図、動作手順

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るため、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図 1 に示す。

## 2. 実験方法

下水中の  $17\beta$ -エストジオール(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」<sup>3)</sup>を参考に、自動化可能な簡易プロセスとして図 2 に示す分析フローを設計した。

下水試料	2mm 篩で夾雑物を除き使用
カラム処理	下水懸濁試料を直接カラム処理 (捕捉→脱水→抽出)
濃縮	抽出溶媒を加温、窒素パージにより濃縮
溶媒調整	濃縮試料の希釈、抗体溶液との混合、攪拌
免疫測定	抗 E2 モノクローナル抗体を利用した間接競合イムアッセイ法

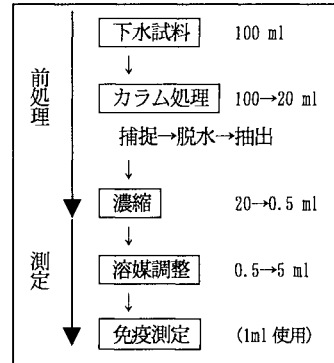


図 2. 分析フロー

この分析フローの前処理部分について、(1) カラム処理工程の簡易化の検討、(2) 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。

### (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 分と溶解性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、溶解性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。ろ紙の目詰まり試験条件として、下水流入水の SS 濃度は a) 124, b) 217ppm、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)。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 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を利用した。また簡易処理として、超音波処理なしの 10 分間浸漬処理で同等の抽出効率が得られるかどうか確認試験を行った。

### (2) 機器分析用前処理との比較

簡易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<sup>4)</sup>を図 3 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。

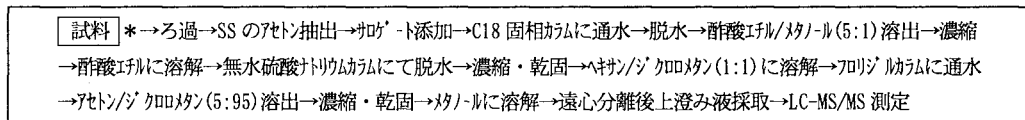


図 3. LC-MS/MS 分析フロー

\* ②濃縮回収液は精製水により 50 倍以上希釈したものを試料とした

### (3) 測定感度の確認

免疫測定には米国 Sapidne 社の KinExA™ 3000 という自動免疫測定装置を用いた<sup>5)6)</sup>。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  $100\mu\text{m}$  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。そして間接競合免疫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。

(4) 下水試料の測定

試料は5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。測定方法としては図2の免疫測定法と図3のLC-MS/MS法の2種類により行った。

3. 結果と考察

(1) ろ紙の目詰まり試験

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倍量程度目詰まりなく流すことができた。そこでGMF150を選定。内径26.5mm(有効面積5.5cm<sup>2</sup>)プラスチックカラムの入口に配置して流入下水2種類の目詰まり試験の結果、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。

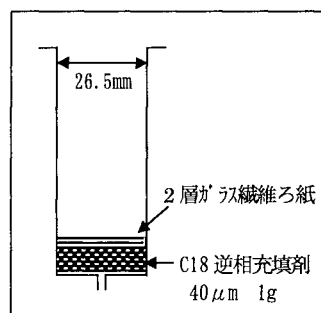


図4. 固相抽出カラム

(2) 前処理条件の比較試験

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について表1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に処理できる可能性を確認した。

表1. 前処理条件の比較試験

前処理	流入下水量	充填剤量	抽出溶媒	超音波処理	E2 測定値 (ng/L)
簡易処理	20ml	1g	メタノール	なし	12.1
	60ml				11.0
	100ml				11.1
機器分析用処理	100ml	0.5g×2本	アセトン	あり	11.8

(3) 測定感度の確認試験

E2 検量線を図5に示す。検量線の定量範囲は20~1,620 ng/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。

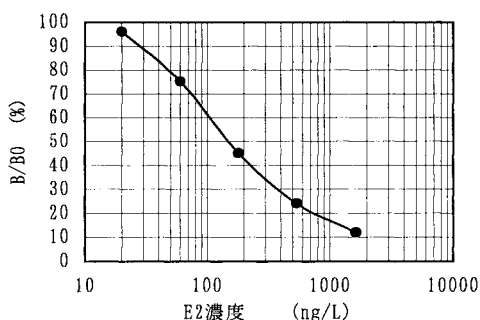


図5. E2 検量線

(4) 下水試料の測定結果

簡易前処理の自動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。この測定法とLC-MS/MS法により下水試料中のE2の測定を行った。

表2. 流入水のE2測定結果 (測定値単位:ng/L)

処理場	SS濃度 (ppm)	免疫測定値(a)	LC-MS/MS値(b)	a/b
1	115	12.7	13.0	1.0
2	—	20.7	17.0	1.2
3	268	17.7	18.4	1.0
4	85	28.6	25.9	1.1
5	239	15.7	20.2	0.8
6	66	19.0	15.7	1.2

表3. 処理水のE2測定結果 (測定値単位:ng/L)

処理場	SS濃度 (ppm)	免疫測定値(a)	LC-MS/MS値(b)	a/b
1	1.0	10.3	3.1	3.3
2	—	8.0	0.9	9.3
3	1.0	7.4	3.2	2.3
4	<1.0	5.9	2.0	3.0
5	3.0	5.7	4.7	1.2
6	1.0	9.2	1.4	6.6

この結果、流入水ではほぼ同等の結果が得られた。理由としては、①反応溶液中の BSA 濃度を高くしたこと、②ELISA プレートでなくビーズ充填層を利用した反応系の違いにより妨害物質の影響を抑制できたものと考えられる。一方処理水では、LC-MS/MS 値に比べ免疫測定値は 1.2~9.3 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。理由としては、乖離原因物質が下水処理されにくい、もしくは下水処理により生成されるものであること、そのため E2 濃度に対する乖離原因物質の割合が流入水に比べ処理水で高くなっているものと考えられる。また下水中の存在が報告<sup>4)</sup>されているエストロン(E1)について抗 E2モノクローナル抗体の交差反応性を調べたが、反応性は低く、乖離に対する E1 の寄与率は小さいものと予想される。

#### 4. まとめ

下水試料中の 17 $\beta$ -エストジオール(E2)の自動計測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+1 $\mu$ m、充填剤/C18 逆相充填剤、40 $\mu$ m, 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 20~1,620 ng/L、前処理による濃縮倍率 20 倍より、E2 測定感度は 1.0 ng/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。反応溶液と反応系により妨害物質の影響を抑制できたものと考えられる。一方処理水で 1.2~6.6 倍と高値かつバラツキを確認。理由としては、乖離原因物質が下水処理されにくい、もしくは下水処理により生成されるものであること、そのため E2 濃度に対する乖離原因物質の割合が流入水に比べ処理水で高くなっているものと考えている。

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作用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 17 $\beta$ -エスト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、本計測技術は、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、無人監視用途へ適用できる技術と考えている。

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 (2002 年 7 月，印刷中)