

【調査研究】

## ELISA法を用いた水中の女性ホルモンの分析

林 隆義, 山辺真一, 吉岡敏行, 西島倫子, 今中雅章 (水質第二科)

### 要 旨

ELISA法による水中の女性ホルモンの測定方法を検討し、環境水の分析に用いた。児島湖流域の笹ヶ瀬川、倉敷川、妹尾川及び児島湖において17 $\beta$ -エストラジオールが1ng/L以上検出された。合成女性ホルモンのエチニルエストラジオールについては検出下限値(0.1ng/L)未満であった。また、県内の下水処理施設の流入水と放流水及び環境保健センターの浄化槽処理水についても測定を行った。

[キーワード: 環境ホルモン, 女性ホルモン, 17 $\beta$ -エストラジオール, エチニルエストラジオール, 経口避妊薬, ELISA]

### 1 はじめに

人畜由来の天然女性ホルモンの17 $\beta$ -エストラジオール(以下E2)や合成女性ホルモンのエチニルエストラジオール(以下EE2)は、ビスフェノールA等の内分泌攪乱作用が疑われている化学物質(いわゆる環境ホルモン)と比較すると、より低濃度でヒト乳癌細胞MCF-7を増殖させる(女性ホルモン様作用を示す)ことが知られており<sup>1)</sup>、英国においては、魚類のメス化の原因の一つとして、疑われている。

一方、平成10年度の環境庁(現環境省)の全国調査によれば、河川水中のE2はN.D.~0.041 $\mu$ g/Lの濃度で検出されており、平成11年度には、国内において低用量経口避妊薬(主成分EE2)が認可されたことから、今後、河川等においてEE2の検出頻度が増加することが懸念されている。

環境保健センター(以下当所)では、これらの女性ホルモンの測定について、GC/MS等の機器を用いた分析法を検討しているが、誘導体化やクリーンアップの煩雑さ、検出感度などの点で直ちに環境水試料の測定に用いるには解決すべき問題点が多い状況である。

これに対して、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」<sup>2)</sup>(以下暫定マニュアル)には、抗原抗体反応を用いるELISA法が示されており、最近、国内のT社が環境分析用ELISAキットの市販を始めたことから、このキットを用いて分析の基礎的な事項を検討したのち、実際の河川水等の環境水及び当所の浄化槽処理水、県内の下水処理施設の流入水と放流水について分析を実施し、若干の知見を得たので報告する。

### 2 材料と方法

基礎的検討のためのブランク試料には、精製水及び市販のミネラルウォーターを用いた。水試料の採取は、ステンレス容器を用いて、洗浄したガラスビンに入れ冷蔵保存(4 $^{\circ}$ C以下)し、速やかに測定に供した。ELISAキットとしては、T社製E2測定用とEE2測定用の2種類を使用した。

前処理は、暫定マニュアルに準じて、水試料500~1000mLをガラスろ紙(GF/C)でろ過し、SSとろ液に分けた。ろ液に1N酢酸buffer(pH5.0)を水試料1Lに対し20mL添加し、ろ紙上のSSは1N酢酸buffer(pH5.0)・メタノール(1:9)10mLで洗浄し、その洗液をろ液に合わせ抽出用試料とした。この試料を、メタノール5mL、精製水10mLでコンディショニングしたC18固相カートリッジに通水した。通水後、精製水5mL、ヘキサン5mLでカートリッジを洗浄、遠心脱水した後、酢酸エチル・メタノール(5:1)5mL又はジクロロメタン5mLでカートリッジから女性ホルモン類を溶出し、40 $^{\circ}$ Cの温浴中で窒素ガスにより溶媒を除去した。次に、ELISAキットの測定レンジ(E2キットの場合、0.05 $\mu$ g/L~1 $\mu$ g/L、EE2キットの場合、0.05 $\mu$ g/L~3 $\mu$ g/L)に入るように10%メタノール水溶液で濃縮試料を調整した後、キットの説明書に従ってELISA法を実施した。

### 3 結果及び考察

#### 1) E2キットの基礎的検討

ブランク試験として精製水と市販のミネラルウォーターを、各々500mL測定したところキットの検出限界(0.1ng/L)未満であった。E2を2ng/Lおよび0.1ng/Lの

濃度になるよう、精製水及びミネラルウォーターに添加した回収試験では、回収率は95～123%と良好であった。

また、E2との交叉反応の大きさを被検物質の添加濃度に対する、ELISA法による測定値の割合で調べたところ、E2の代謝物のエストロン（E1）やエストリオール（E3）とは、1%未満であったが、EE2とは31%の反応を認めた。

## 2) EE2キットの基礎的検討

E2と同様に精製水とミネラルウォーター各々500mL測定したところキットの検出限界(0.1ng/L)未満であった。

EE2を0.1ng/Lの濃度になるよう、精製水及びミネラルウォーターに添加した回収試験では、回収率はそれぞれ138%、116%であった。

E1、E2及びE3との交叉反応の割合は1%未満であったが、合成女性ホルモンであるメストラノールと70%反応した。

1)の結果と合わせて考えると、E2測定用のキットでは、試料中のEE2との交叉反応により、実際のE2より高値を示すおそれがあるが、EE2測定用のキットでは、E2との交叉は、殆どみられないので、両キットを同時に使用することで、E2とEE2を区別できると思われた。

## 3) ろ液とSS中のE2濃度

児島湖流域の河川水（1地点）について、ろ液とSS成分それぞれについて測定したところ、全体のE2は1.8ng/L、ろ液は1.7ng/L、SSの抽出液は0.1ng/Lであり、ろ液に9割以上のE2が含まれることが判った。

## 4) ELISAキットによる比較

T社以外のA社及びB社のE2測定用ELISAキットについて同一の環境水試料を測定したところ、測定値にキットによる差が認められ、T社キットが最も低値を示した。

(図1)

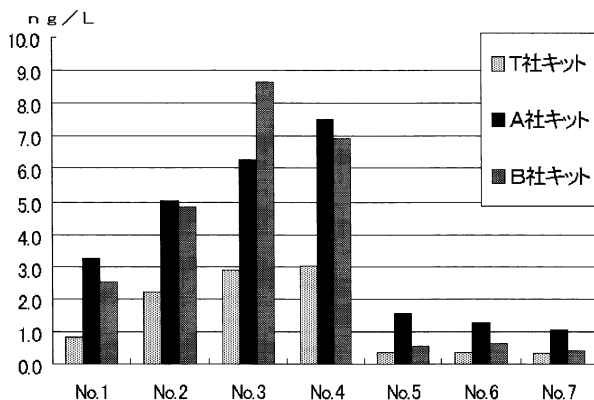


図1 ELISAキットによるE2測定値の比較

A社キットとLC/MS/MSによる測定値を比較して、ELISA法が高値を示す原因が、E1との交叉反応によるものではないかとの報告があるが<sup>3)</sup>、T社キットを比較に用いた場合には、異なる結果になっていたかもしれない。

## 5) 河川水中におけるE2濃度の保存の影響

検体の前処理までの適切な時間を知るため、河川水を採取してから、前処理までの時間、保存温度、アスコルビン酸（以下ViCと略）の添加の（添加濃度1g/L）有無によるE2の濃度変化を調べた。

採取後直ちに前処理したものを100%とすると、4 24時間保存では変化がなく96時間（4日）で4%の減少であった。また、ViC添加の場合も全く同一の変化であった。一方、20℃で保存したものでは、ViC無添加の場合96時間で16%減少したがViC添加の場合は、逆に8%増加した（増加の原因は検討中であるが、抱合体の加水分解または、E1からE2への代謝によるものなどが考えられる）。（図2）

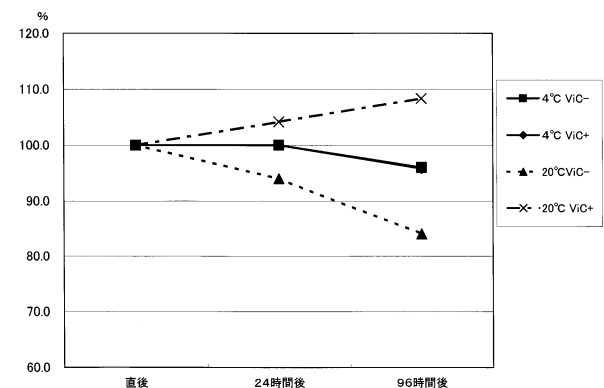


図2 河川水の保存によるE2濃度変化

4 保存の場合、vicの添加の有無による差は認められなかった。

この結果から、河川水の保存と前処理までの時間は、試料採取後4 保存で24時間以内に実施することが適当であり、保存のためのViCの添加は不要と判断した。

## 6) 環境水中の女性ホルモンの測定

平成12年度岡山県環境ホルモン実態調査のE2測定に本法を用いたところ、20地点中児島湖流域の笹ヶ瀬橋、倉敷川橋、児島湖湖心の3地点において検出限界値とした1ng/L (0.001 μg/L) 以上のE2が検出された。（表1）

このことから、児島湖流域の河川についてさらに、平成13年8月～9月、笹ヶ瀬川と倉敷川の下流域、妹尾川の3地点（上流から大水門、国道30号線下、倉敷川合流前）、

及び児島湖で測定したところ、全ての地点でE2が1ng/L以上検出された。(図3及び表2)

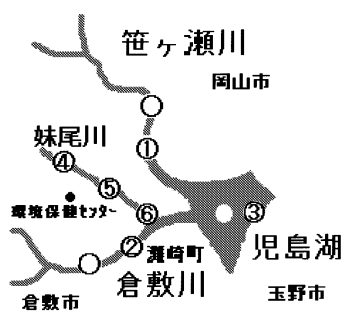
妹尾川は、上流付近が住宅地で、下流に行くにつれて農業地域となっているが、生活排水の影響が最も大きいと思われる大水門から流下するに従って、わずかに濃度の低下が認められた。これは、E2の河川水中の分解によるものかもしれない。

また、これら児島湖流域の地点について同時にEE2を測定したが、いずれも検出限界(0.1ng/L)未満であった。

表1 平成12年度岡山県環境ホルモン実態調査結果

測定地点	河川等	採取年月日	市町名	E2( $\mu\text{g/L}$ )
一中橋	高梁川上流	H12.10.4	新見市	不検出
高梁大橋歩道橋	高梁川中流	H12.10.4	高梁市	不検出
神崎橋	成羽川	H12.10.4	高梁市	不検出
下倉橋	高梁川下流	H12.10.5	総社市	不検出
福松橋	小田川	H12.10.5	真備町	不検出
落合橋	旭川上流	H12.10.6	落合町	不検出
大曾根堰	旭川中流	H12.10.6	御津町	不検出
乙井手堰	旭川下流	H12.10.6	岡山市	不検出
新橋	砂川	H12.10.6	岡山市	不検出
嵯峨堰	吉井川上流	H12.10.12	津山市	不検出
周匝大橋	吉井川中流	H12.10.12	吉井町	不検出
熊山橋	吉井川下流	H12.10.11	熊山町	不検出
鷺湯橋	吉野川	H12.10.12	美作町	不検出
宮橋	金剛川	H12.10.11	和気町	不検出
笹ヶ瀬橋	笹ヶ瀬川	H12.10.13	岡山市	0.002
倉敷川橋	倉敷川	H12.10.13	岡山市	0.003
児島湖湖心	児島湖	H12.10.10	-	0.002
玉島港沖合	水島地先海域	H12.10.16	-	不検出
波張崎南	児島湾	H12.10.12	-	不検出
大多府島南東沖	播磨灘北西部	H12.10.3	-	不検出

(備考)「不検出」とは、検出限界値未満のこと  
単位 0.001 $\mu\text{g/L}$  = 1ng/L



○ 平成12年度環境ホルモン実態調査地点  
①～⑥ 平成13年度調査地点

図3 児島湖流域の調査地点

#### 7) 浄化槽処理水及び下水処理施設の測定

当所の浄化槽処理水及び県下の下水処理施設(1箇所)の流入水と放流水についてE2及びEE2の測定を実施した。

表2 平成13年度E2, EE2の調査結果

測定地点	河川等	採取年月日	E2濃度ng/L	EE2濃度ng/L
①笹ヶ瀬新橋	笹ヶ瀬川	H13.8.27	1.3	<0.1
②新倉敷川橋	倉敷川	H13.8.27	1.2	<0.1
③湖岸	児島湖	H13.8.27	1.0	<0.1
④大水門	妹尾川	H13.9.19	2.2	<0.1
⑤国道30号線下	妹尾川	H13.9.19	1.9	<0.1
⑥倉敷川合流前	妹尾川	H13.9.19	1.8	<0.1

当所の浄化槽処理水(単独処理槽の出口)のE2は16ng/Lであった。この濃度は、ヒト乳ガン細胞MCF-7を増殖させる濃度10ng/L以上であるが、この浄化槽処理水は当所の污水处理施設において、高度処理を行ったのち放流されており、実際の放流水中のE2は0.2ng/L以下であった。一方、下水処理施設の流入水のE2は25ng/Lであるが、放流水は2.4ng/Lと約1割までに減少していた。また、EE2は当所の浄化槽処理水及び下水処理施設の流入水、放流水いずれも0.1ng/L未満であった。下水処理施設はE2を含む水を公共用水域に放流しているが、今回調査した下水処理施設では、むしろ、E2の環境負荷の軽減に役立っているのではないと思われるなど、実態の複雑さがうかがえた。

#### 4 まとめ

- 1) ELISA法により、浄化槽等からの排水による影響が大きいと思われる児島湖流域の河川水等から、1ng/L以上のE2が検出された。
- 2) 今回調査した下水処理施設は、流入水中のE2の9割を除去していると推測された。
- 3) 経口避妊薬の主成分であるEE2は、E2が検出された河川水や下水処理施設の流入水からも検出できなかったが、今後も経口避妊薬の流通量に注視するとともに、河川水等への排出状況を調査する必要がある。

#### 文 献

- 1) 鷹野洋, 小倉肇: 女性ホルモン様化学物質(環境ホルモン)のバイオアッセイとGC/MS分析, 岡山県環境保健センター年報, 24, 19-20, 1999
- 2) 「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル」, 環境庁(1999)
- 3) 田嶋晴彦他: 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による河川水及び下水放流水中の17 $\beta$ -エストラジオール分析法開発, BUNSEKIKAGAKU, 49, 843-848, 2000