

下水試料中の女性ホルモン測定法の課題 - LC/MS/MS と ELISA の比較から -

建設省土木研究所：○高橋明宏、小森行也、矢古宇靖子、岡安祐司、
斉藤正義、東谷忠、田中宏明

Determination of Female Hormone in Sewage Samples by LC/MS/MS and ELISA, Akihiro TAKAHASHI, Kouya KOMORI, Yasuko YAKOU, Yuuji OKAYASU, Masayosi SAITO, Tadashi HIGASHITANI and Hiroaki TANAKA (Public Works Research Institute, Ministry of Construction)

1. はじめに

近年、生物の内分泌作用を攪乱し、悪影響を及ぼす外因性の内分泌攪乱物質 (EDs) への関心が高まっており、その環境汚染が懸念されている。これに対し、関係省庁や研究機関が様々な調査を行い成果を挙げつつある。建設省においても地方公共団体と共同で下水試料に適した EDs の分析方法の検討及び下水処理場における EDs の実態調査を実施している。対象物質は環境庁が「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」の中で提示している 67 の化学物質から下水道に含まれる可能性がある 11 の化学物質とその関連物質のノルフェノールエチルシレート及びヒト女性ホルモンの 17β -イストラジオールである。これらの物質の内分泌攪乱作用については、 17β -イストラジオールの内分泌攪乱作用が、他の化学物質に比べて非常に高いことが報告^{3) 4)}されており、下水試料の内分泌攪乱作用に占める 17β -イストラジオールの割合が非常に大きいとの指摘³⁾もある。しかし、上記の実態調査において、 17β -イストラジオールの測定に使用している ELISA 法は GC/MS 等の機器分析に較べて試料の前処理が簡易という利点があるものの、抗原抗体反応を利用しているため、類似物質による正の測定誤差や妨害物質による負の測定誤差が検出機構上避けられず、測定値の正確さを確認する必要があると考えられた。

そこで今回、実際の下水試料を対象として、ELISA 法及び LC/MS/MS 法により 17β -イストラジオールの測定・比較を行ったので結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 下水試料

主に生活系の排水を処理する A～E の 5 ヶ所の下水処理場の流入下水と二次処理水を対象とした。試料の採取は平成 11 年 7 月、8 月、9 月の 3 回、いずれも晴天時にスポット採水で行った。処理場の概要を表 - 1 に示す。

2.2 試料の前処理

- ・ ELISA 用試料

下水道の測定マニュアル案⁶⁾に従い、下水

試料 1000mL を C18 固相カラムを用いた固相抽出法 (MeOH 溶出) により処理し、10000 倍の測定試料 (ジメチルスルホキシド溶液) を得た。

- ・ LC/MS/MS 用試料

検討の結果⁵⁾、C18 固相カラムを用いた固相抽出法 (MeOH 溶出) の抽出物を、n-Hx/水による抽出、シリカカラムによるクレンジアップ、TLC (シリカゲル) による精製を順次行い測定試料を得た。

2.3 ELISA 法の測定

ELISA 法は Assay Designs, Inc. 製の Correlate-EIA 17β -Estradiol Enzyme Immunoassay Kit を使用し、下水処理場における EDs の実態調査で用いた方法⁶⁾に従い測定した。

2.4 LC/MS/MS の測定

測定条件を以下に示す。

- ・ 装置：TSQ7000、HP1100
- ・ カラム：HP Zorbax Eclops XDB-C18、 2.1×150 mm
- ・ 移動相：アセトリル/水 (60:40) 0.2mL/min
- ・ 注入量：10 μ L
- ・ イオン化：AP-ESI Negative、Collision Energy 40eV、Argon 2.2-2.3 mTorr
- ・ 測定質量数：271 (Parent)、145 (Daughter)

3. 結果

3.1 ELISA 法

測定結果を表 - 2 に示す。 17β -イストラジオールの範囲と中央値は、流入水で 0.022 ~ 0.075 μ g/L、0.047 μ g/L、放流水で 0.004 ~ 0.036 μ g/L、0.017 μ g/L であり、放流水の濃度は流入水の 1.5 ~ 11 倍 (平均 3.6 倍) であった。

表 - 1 調査した下水処理場の概要

下水処理方式	処理水量 (m ³ /日)
A 標準活性汚泥法	172,210
B 標準活性汚泥法	152,060
C 標準活性汚泥法 + 砂ろ過 + 礫間接触酸化	49,008
D 循環式硝化脱窒法	92,474
E 凝集剤添加循環変法 + 砂ろ過	117,615

3.2 LC/MS/MS 法

測定結果を表 - 3 に示す。17βイストラジオールの範囲と中央値は流入水で 0.007~0.015 μg/L、0.011 μg/L、放流水では2つの試料が 0.001 μg/L であった他はすべて 0.001 μg/L 未満であった。

4. 考察

4.1 下水試料

今回の測定結果を下水処理場における EDs の実態調査¹⁾と比較すると流入水および処理水の範囲と中央値は概ね同様であり、今回調査対象とした処理場は 17βイストラジオールの濃度に関しては平均的な処理場と考えられた。

4.2 ELISA 法と LC/MS/MS 法の比較

2つの測定方法により流入水の 17βイストラジオールの濃度を測定した結果を図 - 1 に比較して示す。図から分かるように、すべての流入水試料において、ELISA 法の測定結果が高く、その比率 (ELISA 法 / LC/MS/MS 法) は 2.0~8.3 倍 (平均 4.7 倍) であった。このことから流入下水において、ELISA 法の測定結果は測定対象物質である 17βイストラジオール以外の物質の影響により LC/MS/MS 法の結果よりも高くなることが推察された。また、ELISA 法と LC/MS/MS 法の測定結果の相関係数は $R^2 = 0.0996$ と低く、さらに ELISA 法と LC/MS/MS 法の比率と調査対象処理場及び試料採取時期の間にも明確な傾向が認められなかった。

放流水中の 17βイストラジオールについては ELISA 法の結果に比べ LC/MS/MS 法の測定結果はほとんどが 0.001 μg/L 未満と非常に低く、流入水と同様、ELISA 法の測定結果は測定対象物質である 17βイストラジオール以外の物質の影響を受け高くなることが推察された。

5. 結論

今回の検討の結果、ELISA 法を用いて下水試料中の 17βイストラジオールを測定する場合、実際に含まれている濃度よりも高い測定結果が得られることが確認されたが、両者の測定結果には明確な相関が確認できなかった。このことから下水試料の測定に ELISA 法を適用するためには、試料の前処理において何らかのクリーンアップ操作を行い、測定に影響する夾雑物質を除去することが望ましいと考えられた。

また、ELISA 法はその測定機構上 17βイストラジオールと構造が似ている物質を合わせて測定している可能性もあり、それらの物質が内分泌攪乱作用を

表 - 2 ELISA法の測定結果

処理場	流入水 (μg/L)			放流水 (μg/L)		
	7月	8月	9月	7月	8月	9月
A	0.058	0.036	0.062	0.020	0.019	0.025
B	0.057	0.046	0.058	0.036	0.017	0.019
C	0.075	0.047	0.022	0.015	0.010	0.008
D	0.057	0.030	0.028	0.024	0.022	0.013
E	0.031	0.036	0.041	0.006	0.006	0.004

表 - 3 LC/MS/MSの測定結果

処理場	流入水 (μg/L)			放流水 (μg/L)		
	7月	8月	9月	7月	8月	9月
A	0.011	0.01	0.009	<0.001	<0.001	<0.001
B	0.011	0.012	0.007	<0.001	<0.001	<0.001
C	0.014	0.008	0.011	<0.001	0.001	<0.001
D	0.015	0.007	0.013	<0.001	<0.001	<0.001
E	0.007	0.007	0.011	<0.001	<0.001	0.001

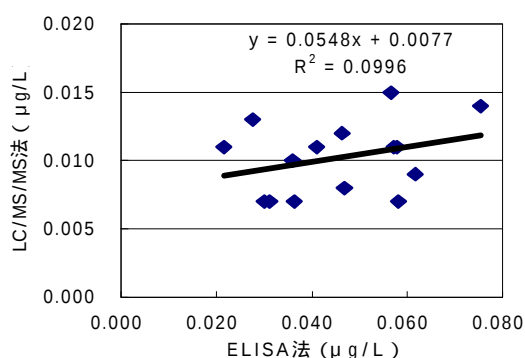


図 - 1 ELISA法とLC/MS/MSの比較(流入水)

持つことも考えられるため、測定に影響している物質の検索も今後行う必要があると考えられた。

<参考文献>

- 1)建設省都市局下水道部，平成 11 年度 下水道における内分泌攪乱化学物質に関する調査報告書 建設省都市局下水道部，平成 12 年 4 月
- 2)環境庁，外因性内分泌攪乱化学物質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，環境庁，平成 10 年 5 月
- 3)矢古宇靖子，高橋明宏，東谷忠，田中宏明，組み換え酵母を用いた下水中のエストロゲン活性の測定，環境工学研究論文集，Vol.36，1999
- 4)Nisikawa, J. et al., Toxicology and applied pharmacology, Vol.154, 76-83, 1999
- 5)小森行也，高橋明宏，田中宏明，LC/MS による下水試料中の 17βイストラジオールの分析，第 9 回環境科学討論会講演集，346-347，2000
- 6)建設省都市局下水道部，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，(社)日本下水道協会，1999