

ELISA 法および組換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

田代 豊 (財団法人沖縄県公衆衛生協会)

ELISA 法によるエストロゲンの測定は、比較的簡便で高価な装置を必要としない利点があるが、妨害物質の影響で機器分析値より極端に大きな値を示すことがあると報告されている。一方、遺伝子組換酵母を用いたエストロゲン活性測定法は、試料中に含まれる物質全体による活性を測定するために利用されるが、やはり妨害物質による酵母の増殖阻害などのため、試料によって測定が困難な場合がある。GPC カラムによる前処理は環境ホルモン物質機器分析への適用が提案されているが、本研究では、環境試料を GPC カラムによる HPLC で精製し、これらエストロゲンアッセイにおける妨害低減効果を調べた。

【濃縮試料の調製】河川水試料は C18 固相カートリッジで吸着後メタノールで溶出し、減圧乾固してから一定量のメタノールに再溶解した。底質試料は酢酸酸性メタノールで抽出後 C18 固相カートリッジで吸着したものをメタノールで溶出して減圧乾固し、ヘキサンと水を加えて液液抽出した後、ヘキサン層を減圧乾固してからメタノールで定容とした。

【精製法】上記濃縮試料を GPC カラム (Shodex CLNpak PAE-800) を用いた HPLC によって精製した。移動相には、メタノール+26%アンモニア水 (9:1) を用いた。

【ELISA 測定における効果】エストロン (E1), 17 β -エストラジオール (E2)、エストリオール (E3) の溶出時間に相当する各画分を減圧乾固した後、ELISA 法 (武田薬品製 17 β -エストラジオール ELISA キットおよびエストロゲン ELISA キット) で E1~3 を測定し、LC-MS/MS 分析値と比較した。未精製濃縮試料では E1~3 いずれについても ELISA 値と LC-MS/MS 値との違いが大きかったが、精製後の各画分ではその差が小さくなった。E2 測定における ELISA 値の LC-MS/MS 値に対する比は、供試した河川水・底質各 1 試料の E2 画分について 0.84 および 1.07 となり、河川水および底質試料に対して ELISA による E2 測定の精度がほぼ十分に向上した。E1、E3 測定においても改善が認められた。

【組換酵母法測定における効果】HPLC で溶出された各画分を減圧乾固した後、Sumpter らによるヒト女性ホルモン受容体レポーター遺伝子を組込んだ酵母を用いて雌性ホルモン活性を測定した。酵母の増殖阻害などにより測定が困難であった試料についても、妨害物質が分画されることにより各画分から活性が検出され定量することができた。同時に、各画分の活性を比較することにより、試料の総活性に対する各環境ホルモン物質による寄与の内訳を推定することができた。

Pretreatment Of Environmental Samples for ELISA And Recombinant Yeast Screen Using GPC Column

Yutaka Tashiro (Okinawa Prefecture Public Health Association, Japan)

Condensed river water and sediment samples were fractionated by HPLC with GPC column (CLNpak PAE-800, Shodex). The mixture of methanol and 25% ammonium solution (9:1) was used as mobile phase. Each fraction was dried under reduced pressure before analysis. The concentration of E1~3 in the fractions which correspond to the Rt of E1~3 respectively were measured with ELISA kit (17 β -estradiol ELISA Kit and Estrogen ELISA Kit by Takeda Chem., Ind. Ltd.) and with LC-MS/MS. ELISA method could give values which were much closer to those from LC-MS/MS for the fractions than for the original condensed samples. Estrogenic activity of each fraction from HPLC was assayed by recombinant yeast screen. As the compounds which interfere the assay inhibiting the growth of yeast were separated from other fractions, the estrogenic activity of each fraction from the condensed samples with even high inhibition could be measured. Also the distribution of estrogenic activity in each fraction indicated the profile of estrogens in original samples.