

乳中に残留するエストロゲンのELISA分析法の妥当性評価

信州大学農学部応用生命科学科 後藤 哲久

1. 目的

市販のエストロゲン測定用ELISAキットの原乳中エストロゲン分析への適用性を検討し、その妥当性を確認する。

2. 概要

乳中には母体由来のエストロゲンが微量混入残留する可能性が指摘されており、乳幼児等の内分泌系への影響を指摘する声がある。しかし、女性ホルモン作用を示す物質は、 17β -エストラジオール及びその代謝産物を含めた多様な物質が知られており、GCMS、LCMS等のクロマトグラフィーによりその全体を評価することはそれほど容易ではない。一方、1990年代の環境ホルモン問題の発生以降、河川水や下水におけるエストロゲン様作用物質の汚染が問題となり、その測定を目的とした酵素抗体法を利用したエストロゲン測定キット（以降ELISAキットと表記）が市販されている。

このELISAキットを用いる測定法の利点は、クロマトグラフィーと比較して装置等にかかるコストが低く、操作も前処理をほとんど行わずに測定可能であることから簡便であり、結果的に短時間に多点数の試料の分析を行うことが出来ることである。一方、分析の精度においてはクロマトグラフィーと比較して劣る場合が多く、また用いる抗体の特性からくる選択性や感度に難点を持つ場合がある。

今回の試験においては、市販のエストロゲン測定キットを用いて、乳中の 17β -エストラジオールを中心としたエストロゲンを評価する方法の適用の可能性を検討し、その妥当性を評価した。

3. 試験と結果の概要

分析法の特性として、適用性、実用性、信頼性の3点が挙げられ、今回はこれらの事項の妥当性を単一試験室（SLV：Single Laboratory Validation）によって確認した。

3. 1 使用するELISAキットの選択

市販されている水中のエストロゲン測定用ELISAキットは数種の物があるが、今回はそのうち 17β -エストラジオール（E2）とその代謝産物であるエストロン（E1）、エストリオール（E3）に対しての交差反応性が示されている、2種類の96穴マイクロプレートを使用するキット（常磐化学工業株式会社製Estrogen(E1/E2/E3)ELISA Kit(microplate)およびCayman Chemical Company Estradiol EIA Kit 582251)を比較検討した。その結果、Cayman社製のキットは乳中の 17β -エストラジオール測定では有効な感度が得られなかったため、以後のSLVには常磐化学製の物を用いることとした。また、ELISAキットの評価には複数の製造時期また製造からの経過日数の異なる物を使用することが望まれるが、今回は単一ロット(T2GU1)の物しか入手が出来なかったため、以後の評価においては全てこのロットの物を使用した。

3. 2 適用性 (適用範囲)

3. 2. 1 適用可能なアナライト

製造メーカーのカタログ等によると本ELISAキットに使用されている抗体は17 β -エストラジオールへの反応率を100%としたときエストロンに対しては87%の交差反応率、エストリオールに対しては55%の交差反応率を持つとされている。このことを市販の17 β -エストラジオール、エストロン、エストリオールを希釈した試料において確認したところ、E2、E1における比発色に比べると、PBに溶けたE3、原乳に溶けたE3共に、反応率がやや高い傾向にあることが認められた。

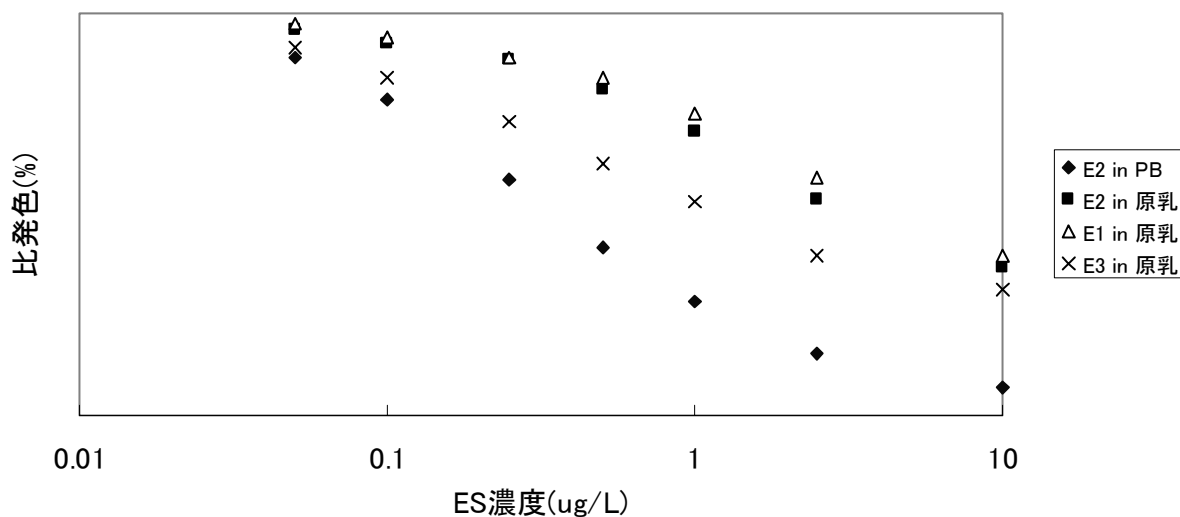


図1. 各エストロゲンにおける比発色の比較(両対数グラフ)

3. 2. 2. マトリックス及び濃度範囲

原乳中の17 β -エストラジオール濃度で0.05-10 $\mu\text{g/L}$ の範囲の定量が可能であることを示す。

10%メタノール水溶液に溶解されたE2の各濃度 (0.05 $\mu\text{g/L}$ -10 $\mu\text{g/L}$) における分析結果と、原乳中に添加したE2各濃度 (0.05 $\mu\text{g/L}$ -10 $\mu\text{g/L}$) の分析結果を比較することで、マトリックスの効果がないことを確認する。ただし、妥当性確認に用いる原乳サンプル中で、若干のバックグラウンド汚染が確認されるため、原乳の検量線は10%メタノールの検量線に比べて、発色が弱い(比発色が低い)。そのため、原乳における検量線では、原乳を50%含んだサンプルをブランク(E2不添加)とし、その比発色を計算して定量可能なことを確認した。

10%メタノールを含むリン酸緩衝液(以下、PBと表記する)と原乳:PB:メタノール=5:4:1, v/v/v(以下原乳と表記する)中にE2標品を混合(最終濃度が0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、10 $\mu\text{g/L}$ となるように調製)し、検量線の形状を比較した。

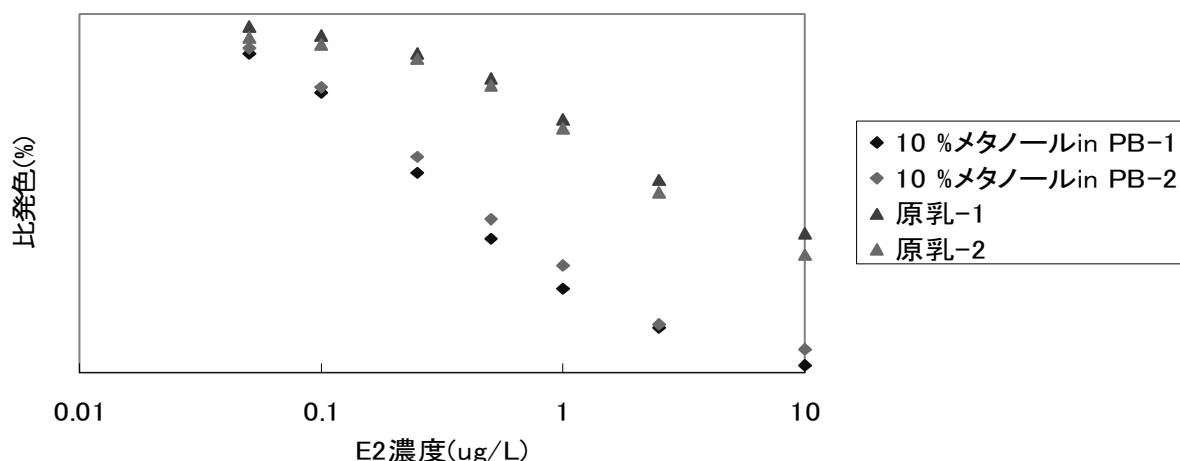


図2. ELISA法のE2への適用性試験Day-1(両対数グラフ)

PB中にE2を溶かした検量線と、原乳中にE2を溶かした検量線を比較すると、PBに溶かした検量線に比べ、原乳に溶かしこんだ検量線が右にシフトしているような結果が得られた。これは、原乳中の何らかの物質が、ELISAの抗原抗体反応に反応しているためであると考えられる。しかしながら、検量線の形状としては、添加したE2濃度に依存して、比発色が指数的に減少しているため、本ELISA法が、原乳中のE2分析に適用可能であることを示していた。

3.3 実用性

迅速性、経費効率の面では、複数の検体を一度に分析（ELISA法の長所）できるため、時間的な手間、経費の面でも利点となる。今回の方法は、有機溶媒の使用も少なく、実験廃液も非常に少量であり、環境への負荷や、実験者への危険性も軽減されている。

3.4 精度

分析法の精度を、併行精度（repeatability, 日内精度、日間精度）、中間精度（intermediate precision, 作業員間精度）によって評価した。評価は、E2を原乳に混合し、各濃度に調製したサンプルを1日2反復、5日間行い、その標準偏差を算出し、一元配置分散分析でデータを解析することで評価した。

本試験法はELISA法であるため、検量線の傾き、切片、形状、50% inhibitionなどの全体像から見た評価と、各濃度におけるばらつきの部分的な評価の2通りを行った。

中間精度は、試験者を変え、併行精度評価試験と同様の試験を行い、同様に評価する。

精度確認方法

日内変動：1日2試行

日間変動：5日間

評価方法

結果はすべて、それぞれのBLANK試料との比発色（B/B0, %）によって表し、実験結果を両対数グラフにプロットし、直線化し、検量線式を算出した後、各濃度における結果をまとめて、濃度別におけるばらつきを評価する。

その結果は以下の図3～5に示したとおり、日間によって、若干のバラつきがある場合があるものの、一定の再現性は得られた

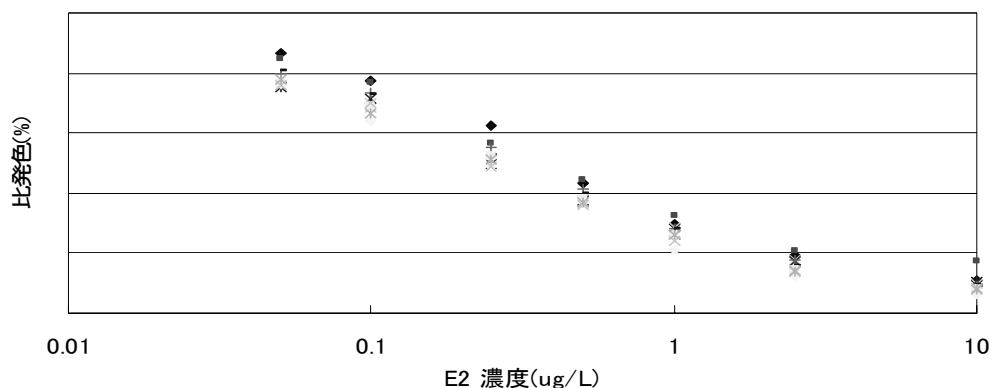


図3. 再現性試験Person-1片対数(5日間×2試行=10)

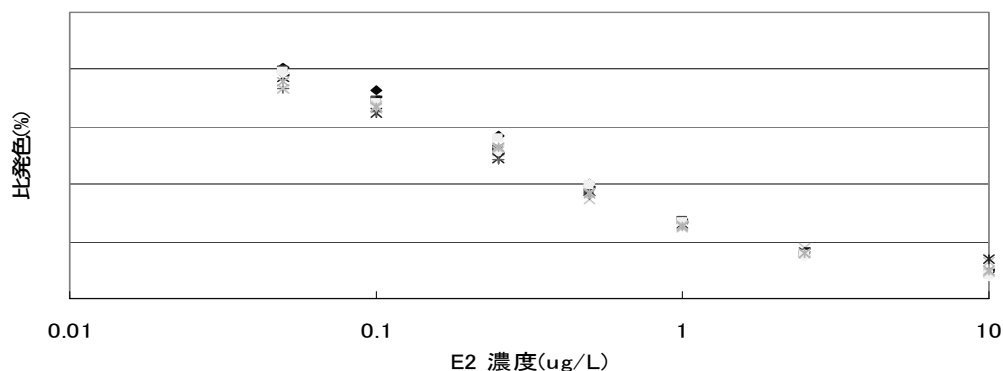


図4. 再現性試験Person-2片対数(5日間×2試行=10)

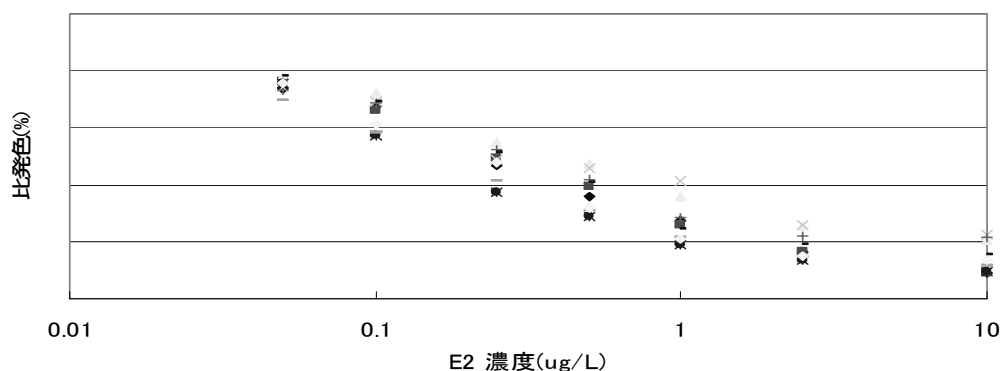


図5. 再現性試験Person-3片対数(5日間×2試行=10)

各濃度におけるばらつきの評価を、食品中に残留する農薬などに関する試験法の妥当性評価ガイドラインに沿って行って見たところ

1. person-3における結果が、person-1、person-2に比べてバラつきが大きい結果が得られた。これは、試験を行う期間が、person-3では、他の二人に比べて長かったことが影響していると考えられた。

2. 一般的な傾向としては、E2添加が高濃度域での比発色のバラつきが大きく、低濃度の添加では、ばらつきが少ないという結果が得られた。

ガイドラインにおける精度の目標値は、 $0.001 < \sim \leq 0.01$ ppmにおいて繰り返し精度RSDが25%、日間精度RSDが30%、 $0.01 < \sim \leq 0.1$ ppmにおいて繰り返し精度RSDが15%、日間精度RSDが20%であること、今回用いた分析法が一般に再現性にばらつきが大きいとされるELISA法であることを考えると、今回の試験で有られた、繰り返し精度、日間精度共におおむね満足できる結果であると言える。

3. 5 LC-MSによる定量結果との比較

再現性を確認した方法を用いて、LCMSによって、E2量が定量された原乳試料を分析し、その相関を検討した。

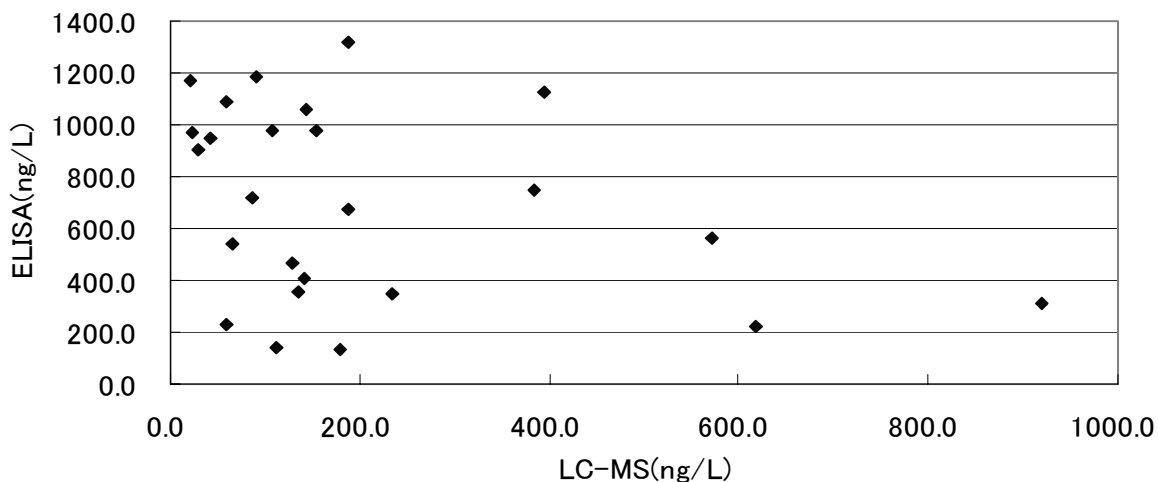


図6. ELISA法によるE2定量結果と、LC-MSによる定量結果の相関(石川県)

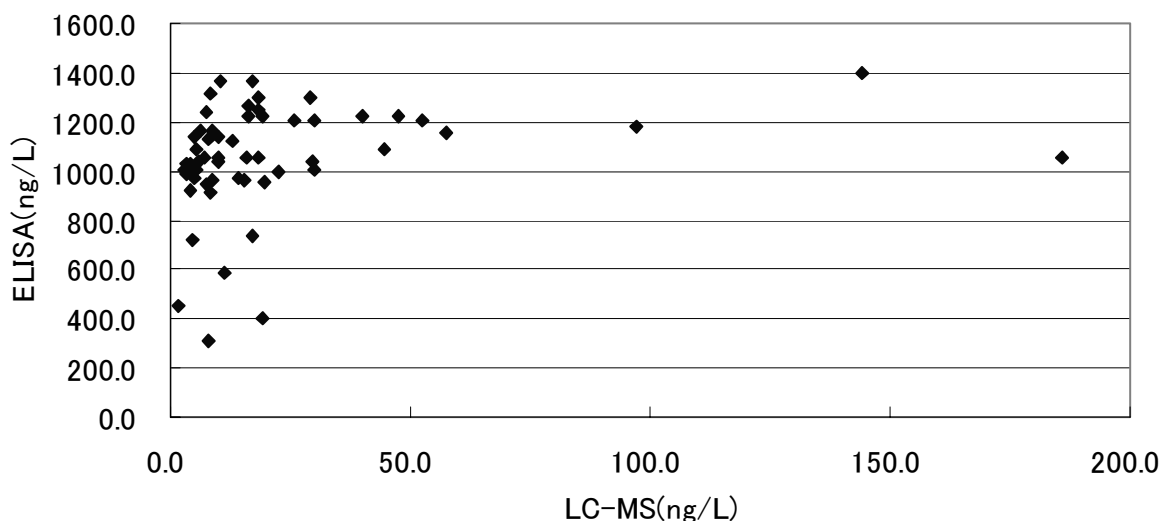


図7. ELISA法によるE2定量結果と、LC-MSによる定量結果の相関(千葉県、愛知県)

全体を通して、ELISA法と、LC-MSによる定量法に相関は見られないように思える。また、全体的な傾向としては、ELISAによる定量結果のほうがLC-MSによる定量結果に比べ、非常に大きい。

E2以外のものと交差反応していることが考えられる。または、LC-MS分析における前処理の過程で、大部分のE2が、除かれている可能性もある。

4. 結果のまとめ

原乳中の17 β -エストラジオールを市販ELISAキットを用いて測定する方法の妥当性が0.05-10 $\mu\text{g/L}$ の範囲でSLVにより確認された。測定の不確かさ (U) は低濃度域で10%、高濃度域では20~30 %であった。

LCMS法により測定された試料における測定値との相関は低く、この原因としてはいくつかの可能性が考えられるが今回の試験の範囲では不明である。この件に関しては、今後、以下の様な方向からのさらなる検討が必要と考えられる。

ELISA側からの検討

1. 抗体の特異性の異なる抗体による検討

- A. 抗体を乳中の測定に合わせた物に変更する
- B. 乳中あるいは試料中に含まれる物質との抗体の交差反応性を再確認する。

2. マイクロタイタープレート作成法の改変

現在の測定キットが河川水等を対象として最適化されているので、コーティング等を含めて乳での測定に最適化する。

化学（クロマト）分析側からの検討

- 1. 前処理を含めた分析法の妥当性の確認
- 2. 方法間比較

試料の検討

- 1. 試料の採集から分析に至るまでの各段階の、測定結果への影響の検証

5. 謝辞

本研究は社団法人日本酪農乳業協会の平成21年度牛乳・乳製品の機能性実証調査事業の一部として行われた。