

研究用試薬エコロジーナ®

エチニルエストラジオール
(EE2) ELISA キット
(マイクロプレート)
使用説明書

前文

エチニルエストラジオール(EE2)は、経口避妊薬(ピル)として用いられるほか、骨粗しょう症、女性特有疾患等におけるさまざまなホルモン療法などに使用されており、環境水中で魚をメス化する作用を持つ内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)の原因物質として関心が高まりつつあります。^{1), 2)}

エチニルエストラジオール測定法としては GC/MS 法や LC-MS/MS 法がありますが、測定試料の誘導体化やクリーンアップなど煩雑な前処理を必要とする一方、分析に高価な機器や熟練した技術が必要となります。^{2), 3), 4)}

エチニルエストラジオールは酵素免疫測定法(ELISA 法)による測定も可能ですが、臨床用キットを転用する場合、環境試料ではマトリックスの影響を受ける可能性が指摘されています。

本品は、環境分析用として、試料中のエチニルエストラジオールを高感度かつ簡便に測定できるキットです。⁵⁾



TOKIWA CHEMICAL INDUSTRIES CO.,LTD.
常盤化学工業株式会社

キットの特長

1. モノクローナル抗体を使用しているため、製造ロット間で抗体性能にばらつきがありません。
2. 環境水中の合成女性ホルモンであるエチニルエストラジオール (EE2) を特異的に検出できます。
3. 定量範囲は $0.05\text{--}3\ \mu\text{g/L(ppb)}$ と高感度で、固相抽出によりさらに低濃度の試料も測定できます。
4. 測定値の CV (変動係数) は 10% 以下で、ばらつきが少なく、高精度です。
5. 測定試料の調製から定量まで 2.5 時間で完了します^{注)}。
6. 標準液が所定濃度に設定されており、濃縮液からの希釈操作が不要です。
7. 簡単な操作で多検体を同時に処理できるため、経済的です。

注) 試料の前処理時間は含みません。

測定原理(競合 ELISA 法)

1. 競合反応

エチニルエストラジオール (EE2) (抗原) と特異的に結合するたんぱく質 (抗体) が、マイクロプレート内面に塗布 (固相化) されています。

前処理した試料水と、EE2 に発色用酵素 (ペルオキシダーゼ) を結合させた抗原酵素複合体 (酵素標識抗原) をマイクロプレートに加え、競合反応させます。

2. 発色反応

競合反応後、洗浄により未反応物を除去し、発色基質 (過酸化水素、TMB) を加えます。抗体に結合した抗原酵素複合体の発色用酵素のはたらきで発色基質が着色します。EE2 濃度が高い試料では、抗原酵素複合体の抗体への結合量が少ないため、着色が弱くなり、吸光度が低くなります。

3. 濃度の定量

450nm での吸光度 (着色の度合い) と EE2 濃度との関係から標準曲線を作成します。これを用いて、試料中の EE2 濃度を定量します。

キット構成内容

No.	品 名	容 量	数 量	保存条件
①	抗EE2モノクローナル抗体固相化マイクロプレート	96 well	1 枚	2～8℃
②	EE2標準液 0 μ g /L (10%メタノール溶液)	1.5mL	1 本	2～8℃
	EE2標準液 0.05 μ g /L (10%メタノール溶液)			
	EE2標準液 0.15 μ g /L (10%メタノール溶液)			
	EE2標準液 0.5 μ g /L (10%メタノール溶液)			
	EE2標準液 3.0 μ g /L (10%メタノール溶液)			
③	抗原酵素複合体粉末		2 本	2～8℃
④	抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)	7mL	2 本	2～8℃
⑤	6倍濃縮洗浄液	50mL	1 本	2～8℃
⑥	発色液(褐色ビン)	15mL	1 本	2～8℃
⑦	発色停止液(黒キャップ)	15mL	1 本	2～8℃
⑧	混合用マイクロプレート	96 well	1 枚	室温
⑨	プレートシール		1 枚	
⑩	使用説明書		1 部	

＜キットの他に必要な試薬・器材＞

器材例は推奨品であり、弊社で使用可否を確認しておりますが、これらに限定するものではありません。

● 固相抽出による濃縮が必要でないとき ●

- 1 ディスポーザブル培養試験管(例: 岩城硝子社製、品番 9831-1207)
※壁面への吸着を防ぐため、試験管は必ずディスポーザブル品を使用してください。
- 2 ガラス繊維フィルター(例: アドバンテック社製、品番 36481047, GS-25 ϕ 47mm)およびろ過に必要な器具
- 3 マイクロピペット(20-200 μ L, 200-1000 μ L)(例: ギルソピペトマン P-200, P-1000)
- 4 マルチチャンネルピペット(50-300 μ L) (例: フィンピペッテジナルマルチチャンネル 8 チャンネル)
- 5 プレートリーダー(測定波長 450nm) (例: TECAN サンライズTM リモート 和光純薬工業(株)取扱い)
- 6 ストップウォッチ(時計)
- 7 ストリップイジェクター(あると便利です) (例: コーニングコスター社製、品番 2578)
- 8 メタノール(高純度品を推奨します)

● 固相抽出による濃縮が必要なとき ●

- 1-8 共通
- 9 グラファイトカーボンカラム(GL-Pak Carbograph 1000mg/12mL、ジールサイエンス社製、品番 5010-23015)
- 10 ジクロロメタン(高純度品を推奨します)
- 11 BSA(高純度品を推奨します)
- 12 ポリペプトン(例: 和光純薬工業、培養基材、品番 394-00115、500g)
- 13 固相抽出用器具一式(VAC ELUTE、真空ポンプ、ガラス遠沈管、濃縮装置など)

測定時の一般的注意

- 本キットは、使用前に 30 分程度放置し、室温に戻してからご使用ください。
- 異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないでください。
- 試薬は凍結を避けて 2～8℃で冷蔵保存し、使用期限の過ぎたものは使用しないでください。
- 試薬調製時・測定操作時は、試薬が直接皮膚や目に触れないよう、眼鏡や手術用ゴム手袋などの適切な保護具を使用してください。
- 精度管理のため、繰り返し測定 ($n \geq 2$) を推奨します。

測定法

1. ろ過

試料水をガラス繊維フィルターでろ過します。次に SS(浮遊物質)からエチニルエストラジオールを抽出するために、メタノールでフィルターを洗浄し、ろ液と合わせます。このとき、添加メタノール量がろ液の1%を超えないようにしてください。また、ろ液が pH5-8 の範囲にあることを確認し、もしこの範囲外であれば、酸もしくはアルカリで pH を調整してください。

2. 固相抽出による濃縮

- 1) 清澄な試料1L に対しては1%ポリペプトン水溶液を 10mL 添加してください。(清澄な水試料におけるグラファイトカーボンカラムの回収率を改善します。)
- 2) ジクロロメタン 10mL、メタノール 10mL および蒸留水 20mL で予めコンディショニングしたグラファイトカーボンカラムに、1) で調製した試料を通水します。
- 3) メタノール 10mL を通液し、洗浄します。
- 4) (メタノール:ジクロロメタン=7:3) 10mL により溶出します。(溶出液は予めキーパー(1%BSA)を 10 μ L 入れたガラス遠沈管に受けます。)
- 5) 窒素パージ(窒素ガス吹き付け)により溶媒を除去します(50℃)。
- 6) 10%(v/v)メタノールに再溶解します。

※ジクロロメタンは、ヒトに対する発ガン性が指摘されています(NTP:GROUP b、IARC:GROUP 2B)。
「ジクロロメタンによる健康障害を防止するための指針」(厚生労働省 平成14年1月21日公示)に従い適切な措置を講じた上でご使用ください。

3. 「抗原酵素複合体溶液」の調製

「③抗原酵素複合体粉末」(1本)に、「④抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)」(1本)を全量(7mL)加えて溶解し、抗原酵素複合体溶液を調製します。

※抗原酵素複合体溶液は冷蔵保存し、溶解後2週間以内に使用してください。
※マイクロピペットを利用し、液中で吸入・排出を2～3回繰り返して混合してください。
※抗原酵素複合体溶液を2本同時に使用する時は、予め混合してから使用してください。1本(7mL)で約50well分の測定ができます。

4. 「混合液」の調製

「⑧混合用マイクロプレート」を用いて、抗原酵素複合体溶液 100 μ L/well に測定試料または各濃度の「② EE2 標準液(いずれも 10%メタノール溶液)」100 μ L/well を添加して、混合液を調製します。

※抗原酵素複合体溶液を先に分注し、測定試料またはEE2 標準液を後から添加してください。添加順序を逆にすると、標準曲線を正確に作成できない場合があります。

※マイクロピペットあるいはマルチチャンネルピペットを利用し、液中で吸入・排出を2～3回繰り返して混合してください。また、泡立ちやすいので、分注の際は気泡が入らないようゆっくりと操作してください。

※EE2 標準液中のメタノールが揮散しますので、分取後お速やかにフタを固く閉め、冷蔵保存してください。

※使用しなかったEE2 標準液は回収し、水系に直接廃棄しないでください(例：布や紙で吸い取り、焼却処理)。

5. 抗原抗体反応(競合反応)

室温に戻した「①抗 EE2 モノクローナル抗体固相化プレート」に4. で調製した混合液を 100 μ L/well ずつ分注し、液面が水平になるように端を軽くたたきます。

「⑨プレートシール」を表面に貼り、室温(18～25℃)で 60 分間反応させます。

※マイクロプレートは、必要なwell 数だけ使用することができるよう、8well ずつのスプリットタイプになっています。未使用部分は乾か緊閉とともにチャック付ラミネート袋に戻し、密封後、冷蔵保存しておけば次回も使用することができます。

※測定誤差の原因になりますので、分注する際は泡が入らないように注意してください。

※異物混入および蒸発防止のため、反応中はプレートシールでマイクロプレート上面を覆ってください。

※反応中はマイクロプレートを静置してください。

※23℃の恒温槽が可能な恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。

※特に検本数が多い場合は、各検本の抗原抗体反応時間が一定になるように注意してください。

6. 「洗浄液」の調製

抗原抗体反応時間中に、「⑤ 6倍濃縮洗浄液」と蒸留水を 1:5 の割合で混合し、洗浄液を調製します(例：20mL の「⑤ 6倍濃縮洗浄液」に 100mL の「蒸留水」を添加)。

※分割使用の場合は、1 回の測定に必要な量だけ分取して使用してください。1well あたり約 1.2mL (1 プレートあたり約 120mL) を調製の目安としてください。

※一旦希釈した洗浄液は冷蔵保存し、希釈後1ヶ月以内に使用してください。

7. 未反応物の除去

プレートシールを取り、反応液を捨て、洗浄液 300 μ L/well を用いて well 内を 3 回洗浄します。3 回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレートをペーパータオル等の上で軽くたたいて(タッピング)、洗浄液を完全に除去します。

※測定誤差の原因になりますので、3回目の洗浄後はwell の底に洗浄液が残っていないことを確認してください。

※プレート裏面の汚れは吸光度の測定誤差の原因になりますので、触れないように注意してください。

※反応液は回収し、EE2 を水系に直接廃棄しないでください(例：布や紙で吸い取り、焼却処理)。

8. 発色反応

「⑥発色液(褐色ビン)」を 100 μ L/well 加え、プレートシールを再び表面に貼って、室温(18～25℃)で 30 分間反応させた後、「⑦発色停止液(黒キャップ)」を 100 μ L/well 添加します。

※23℃の恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。

※特に検本数が多い場合は、各検本の発色反応時間が一定になるように注意してください。

※発色試薬を加えると青色に、発色停止液を加えると黄色に呈色します。

9. 比色および濃度計算

プレートリーダーを用い、波長 450nm で吸光度(OD)を測定します。

方眼紙もしくはパソコンを利用し、検液中の EE2 濃度を算出します。

検液中の EE2 濃度より、次式を用いて試料中の EE2 濃度を算出します。

$$\text{試料中の EE2 濃度 } (\mu\text{g/L}) = \text{検液中の EE2 濃度 } (\mu\text{g/L}) / 0.9 / \text{濃縮倍率}$$

(係数 0.9 は、添加した 10%(V/V)メタノール由来の補正係数)

※発色反応停止後 15 分以内に測定してください。

※標準曲線は測定ごとに作成してください。

※マイクロプレートの裏面には触れないよう注意してください。

■EE2 濃度算出方法■

方眼紙利用:

EE2 0 $\mu\text{g/L}$ の時の OD を 100%として、各濃度での阻害率(B/B0%)を次式により算出します。

$$\text{阻害率 (B/B0\%)} = (\text{サンプルまたは標準液のOD}) / (\text{EE2 0 } \mu\text{g/Lの時のOD})$$

標準液の EE2 濃度 ($\mu\text{g/L}$) と OD または B/B0%を両対数方眼紙(または片対数方眼紙)にプロットして検量線を作成し、得られた検量線より検液中の EE2 濃度を算出します。

(測定例)

Standard OD or B/B0%

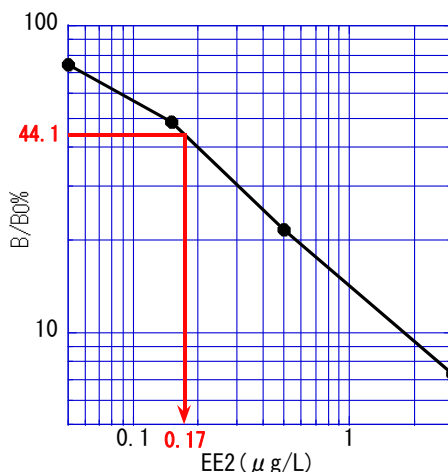
EE2($\mu\text{g/L}$)	OD	B/B0%
0	1.397	100
0.05	1.046	74.9
0.15	0.680	48.7
0.50	0.300	21.6
3.00	0.101	7.3

方眼紙からの読み取り例

EE2($\mu\text{g/L}$)	OD	B/B0%
0.17	(0.616)	44.1

Log-Log Graph Paper Calculation

EE2=0.17($\mu\text{g/L}$) from B/B0%=44.1%



パソコン利用:

データ処理ソフトウェアを用いて 4-parameter logistic fitting 後、回帰式より検液中の EE2 濃度を算出します。

データ処理ソフトウェアの例

“デルタソフト” : BioMetallics, Inc., Princeton, NJ (<http://www.microplate.com>)

測定サンプル数（例）

添付の「①抗EE2モノクローナル抗体固相化プレート」には96のwellがあります。

例1)一括測定：EE2標準液として5系列(0, 0.05, 0.15, 0.5, 3.0 $\mu\text{g/L}$)を使用

EE2標準液として5系列をn=2で使用すると、残りのwell数は86となりますので、43サンプルを一度に測定することができます(【レイアウト例 1】参照)。

【レイアウト例 1】

検液は分割しやすいように縦方向に分注してください(A1～E2は標準液に使用)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S04	S04	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
B	0.05	0.05	S05	S05	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
C	0.15	0.15	S06	S06	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
D	0.5	0.5	S07	S07	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
E	3.0	3.0	S08	S08	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
F	S01	S01	S09	S09	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
G	S02	S02	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
H	S03	S03	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43

例2)二分割測定：E2標準液として5系列を使用(n=2)

一回あたりの検体数が19個(n=2)までなら、二分割の測定が可能です(【レイアウト例 2】参照)。

【レイアウト例 2】

検液は分割しやすいように縦方向に分注してください(A1～E2、A7～E8は標準液に使用)。

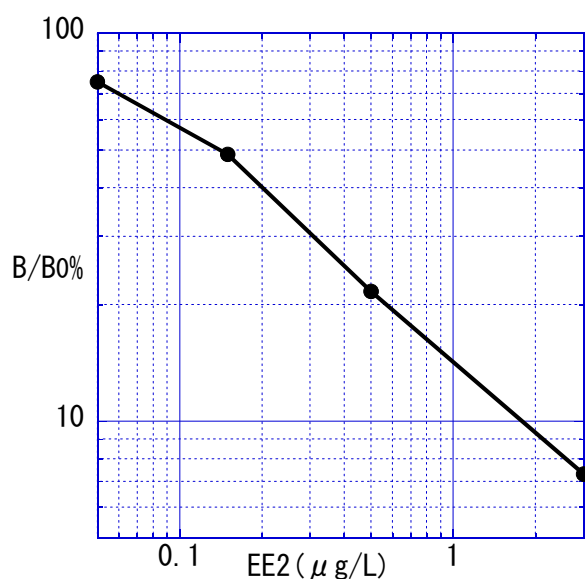
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S04	S04	S12	S12	0	0	S04	S04	S12	S12
B	0.05	0.05	S05	S05	S13	S13	0.05	0.05	S05	S05	S13	S13
C	0.15	0.15	S06	S06	S14	S14	0.15	0.15	S06	S06	S14	S14
D	0.5	0.5	S07	S07	S15	S15	0.5	0.5	S07	S07	S15	S15
E	3.0	3.0	S08	S08	S16	S16	3.0	3.0	S08	S08	S16	S16
F	S01	S01	S09	S09	S17	S17	S01	S01	S09	S09	S17	S17
G	S02	S02	S10	S10	S18	S18	S02	S02	S10	S10	S18	S18
H	S03	S03	S11	S11	S19	S19	S03	S03	S11	S11	S19	S19

抗 EE2 抗体の交差反応性

女性ホルモン類縁体に対する交差反応性

化合物	交差反応性(%)
Ethinylestradiol(EE2)	100.0
Estrone(E1)	<0.2
2-methoxy E1	<0.2
17 β -Estradiol(E2)	<0.2
16-keto-E2	<0.2
E2-17-glucuronide	<0.2
E2-3-glucuronide	<0.2
E2-3-sulfate-17-glucuronide	<0.2
Estriol(E3)	<0.2
16-epi-E3	<0.2
E3-16-glucuronide	<0.2

標準曲線(例)



定量範囲は 0.05~3 $\mu\text{g/L}$ で、濃縮(固相抽出)によりさらに低濃度の試料も測定できます。
測定値の CV(変動係数)は 10%以下で、測定のばらつきが少なく、高精度です。

参考文献

- 1) H.R. Andersen et al.;「Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone-Disrupting Chemicals」, Environmental Health Perspectives, 107(supplement 1), 89-108 (1999)
- 2) C. Desbrow et al.; 「Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent」, Environ. Sci.Technol, 32(11) 1549-1565 (1998)
- 3) J.K. Fawell et al.; 「OESTROGENS AND OESTROGENIC ACTIVITY IN RAW AND TREATED WATER IN SEVERN TRENT WATER」, Wat.Res., 35(5)1240-1244(2001)
- 4) 白石ら;「環境中エストロゲン関連物質の LC/MS/MS 分析における HPLC 条件の最適化」,第 10 回環境化学討論会講演要旨集 pp. 320-321(2001)
- 5) 郷田ら;「女性ホルモン定量要 ELISA の開発」,第 10 回日本環境化学討論会講演要旨集 pp.130-131(2001)

Memo

- ・本キットは研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助として使用することはできません。
- ・使用説明書は予告なく変更する場合があります。