

ELISA法によるザクロ濃縮果汁中のエストロゲン様物質の測定

近藤正夫・永井美佳*・花井将裕

高齢化社会を迎え、加齢、老化に伴う生理機能の低下を、食生活を通して予防しようとする健康志向が消費者に高まっており、各種の健康食品や栄養補助食品が市場を賑わせている。加齢、老化に伴う生理機能低下にはいろいろの症状があるが、女性特有の症状として、ホルモンバランスの崩れることで生じる更年期障害がよく知られている。この症状は、女性ホルモンが40代、50代の女性で急激に減少することが原因で、のぼせ、発汗といった血管運動神経障害や、頭痛、いらだちといった精神神経障害、更に骨粗鬆症といった障害を引き起こす。また、若い女性が過度のダイエットからホルモンバランスを崩し、更年期障害のような症状に悩むといった、憂慮すべき事態も生じている。

これらの症状を治療する場合には、女性ホルモンの投与などが行われる。しかし、食物を通して女性ホルモンが摂取でき、副作用がなく各種症状の予防や障害の軽減を図ることができれば一層望ましい。この観点から、ザクロ果汁の機能性が注目されている¹⁾。

ザクロ果汁の機能性に着目した製品が市場に出回り一時的にブームになったが、「それら製品にエストロゲンは含まれていなかった」と言う国民生活センターの分析結果が、平成12年4月上旬にマスコミで報道され、ブームは頓挫した。更に、国民生活センターの分析法(液体クロマトグラフィー)への疑義も発表され、混乱が生じることとなった²⁾。このような状況下で、消費者に品質の確かな製品を提供するためには、食品素材としてのザクロ果汁のエストロゲン量を把握することが、必須の要件となっている。

エストロゲン(ES)は、女性ホルモンである卵胞ホルモンのうちステロイド骨格を持つ一群のホルモンで、多くの生理機能が実証されている^{3,4)}。代表的なものとして、図1に示すように、エストロン(E1)、エストラジオール(E2)、エストリオール(E3)がある。当然のことながら臨床で扱われることが多く、また、血液中の濃度が数十pg/mlと極めて低いことから、その分析にはRIA

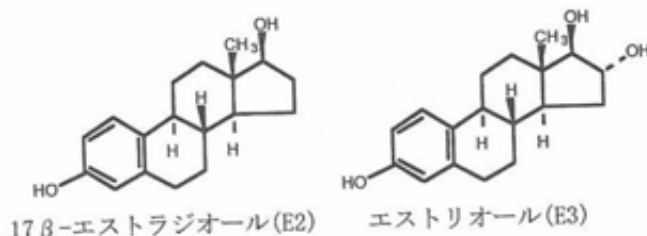
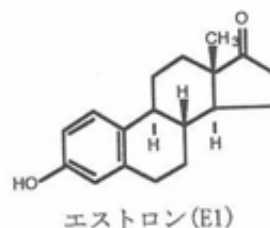


図1 エストロゲンの化学構造式

法(放射性同位元素標識免疫測定法)といった特殊な方法が用いられている。

昨今は環境ホルモンが話題となり、ホルモン様物質の分析の必要性から新たな分析法が開発されたのに伴い、エストロゲンとしての分析も各種の方法で可能となってきた。一例をあげれば、GC-MS(ガスクロマトグラフ質量分析計)やLC-MS/MS(液体クロマトグラフ二重質量分析計)がある。しかし、これら高度な機器分析には、高額の専用機器が必要であるばかりでなく、前者ではクリーンアップと誘導体化が、また後者では誘導体化は必要ないものの、やはりクリーンアップなど煩雑な前処理が必要であり、簡便に実施できない難点がある。

一方、ELISA法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: 酵素免疫測定法)は、高額の専用機器を特に必要とせず、微量の生化学物質を特異的に検出することを可能にする。そこで、ELISA法によるエストロゲンの測定法を検討し、ザクロ濃縮果汁等のエストロゲン様物質の定量を試みた。

*名城大学

実験方法

1. ELISAキット

エストロゲン測定用キットとしては、武田薬品（株）生活環境カンパニー製の、エストロン（E1）、エストラジオール（E2）、エストリオール（E3）のいずれにも応答するエストロゲンキットと、ほとんどエストラジオール（E2）のみ応答するエストラジオールキットを使用した。

2. 試料の前処理とELISA分析方法

目的の微量物質の分析に当たっては、試料の前処理として、分析の妨害となる共存物質を除去するクリーンアップや、目的物質の濃縮が必要である。図2は、ELISAキットを用いてエストロゲンを分析する場合の、試料の前処理法⁹⁾である。

試料 (pH5.0)

↓ 通水: 10-20ml/min

濃縮 [固相カートリッジ SPE Octadecyl (C18)]

(5mlメタノール、10ml蒸留水

にてコンデショニング済み:

↓ 流速 10-20ml/min)

洗浄 (5ml蒸留水、5ml n-ヘキサン):

↓ 流速 10-20ml/min)

溶出 (酢酸エチル:メタノール(5:1) 5ml):

↓ 流速 5-10ml/min)

脱溶媒 [窒素パージ] (40°C)

↓

溶解 (10%メタノール)

↓

ELISA測定用試料

図2 試料の前処理法

試料を前処理した後の分析は、キットマニュアルの記載⁹⁾に従い図3に示すように、標準液の調製、抗原抗体複合体溶液の調製、混合液の調製、抗原抗体反応、洗浄液の調製、未反応物の除去（洗浄）、発色試薬の調製、発色反応、比色、濃度計算の順に実施した。

3. 実験試料

測定試料として用いたザクロ濃縮果汁は、Chia Meei Foods Industries 社（台湾）製のザクロ濃縮果汁（品名：65° ザクロ濃縮果汁）で、ザクロ果汁を5倍に濃縮したものである。また、比較として試験したマカ抽出粉末は、日本粉末薬品（株）製の食品原料用抽出粉末を使用した。

【試料】

- ・ろ過及び希釈
- ・簡易固相抽出による分離と濃縮

【測定試料】

- ・エストロゲン標準液の調製
- ・抗原抗体複合体溶液の調製
- ・混合液の調製

【一次・二次抗原抗体反応】

- ・洗浄液の調製
- ・未反応物の除去
- ・発色試薬の調製

【発色反応】

【比色】

450nm

【濃度計算】

図3 ELISAキットによるエストロゲンの分析フロー

実験結果及び考察

1. ELISA法の妥当性の検討

実際の試料を分析するに先立ち、前処理法及び分析法の妥当性を確認するため、予備実験を行った。図4と図5は、17β-エストラジオールを標準物質とした場合の、エストラジオールキットとエストロゲンキットによる検量線である。横軸は17β-エストラジオール濃度を対数目盛で表し、縦軸はそれぞれの濃度における吸光度を、17β-エストラジオール無添加（濃度 0ng/ml）の吸光度（450nm）に対する相対吸光度で表している。ELISAキットの検量線は、通常の化学分析のような直線的な検量線とは異なり、図4や図5のようになるのが一般的である。したがって、定量する場合、機器分析ほどの十分な精度が得られないのは、原理の上からもやむをえないものと考えられる。

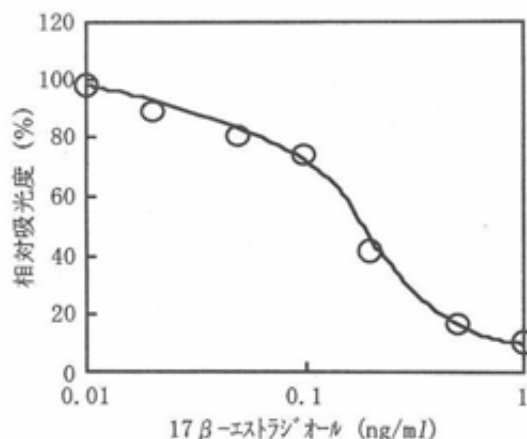


図4 エストラジオールキットによる検量線

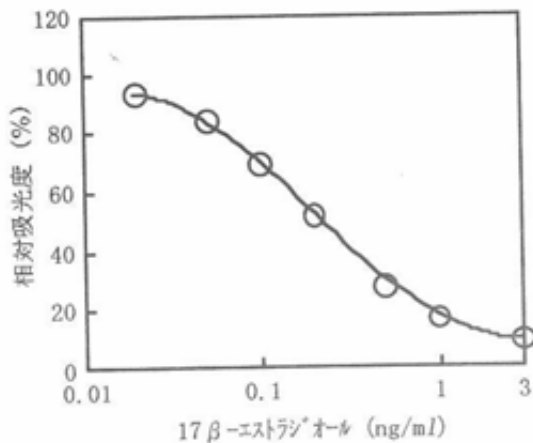


図5 エストロゲンキットによる検量線

2. 前処理法の検討

次に、前処理法の妥当性を検討した。試料のクリーンアップと濃縮は、固相カートリッジとして J.T. Baker 製の Bakerbond SPE Octadecyl (C18) ディスポーザブル抽出カラム 7020-06 を用いて行った。このカラムカートリッジは、疎水性の物質のみを吸着し、適切な溶媒により溶出が可能である。したがって、水溶性の妨害物質や擬陽性反応物質を除去して、目的の疎水性物質をクリーンアップし濃縮する目的で汎用されるカラムである。

図6は固相カートリッジに標準物質である17β-エストラジオールを0.4ng/ml相当量負荷し、その後酢酸エチル：メチルアルコール（5：1）で溶出するなどの前処理を行った後、エストロゲンキットで測定した場合、及び固相カートリッジを使用しないで測定した場合とを比較した結果である。両者の相対吸光度が、いずれも検量線上のほぼ同じ位置にあることから、前処理を行ってもほとんど17β-エストラジオールの損失は起こらないことが確認できた。

次に固相カートリッジへの試料負荷量の影響を調べた。

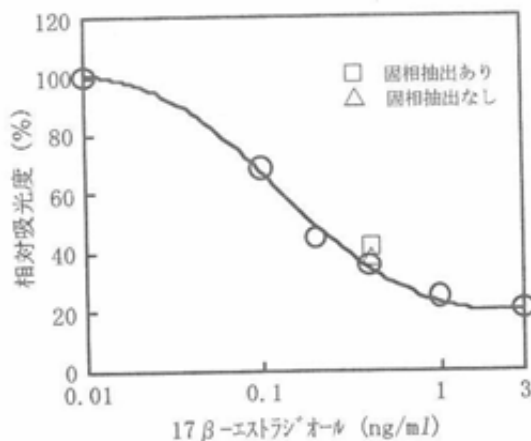


図6 17β-エストラジオールの回収に及ぼす固相カートリッジの影響

負荷量がカートリッジの容量を超えれば、当然固相カートリッジの吸着効率は低下する。表1は、ザクロ濃縮果汁をpH5.0に調整した後、それぞれ10mg及び150mg負荷した場合の分析値を比較した結果である。負荷量が150mgと多い場合、10mg負荷した場合に比べ若干値が下回ったことから、容量的に余裕のある10mg負荷の方が適していると考えられるので、以下の実験では、固相カートリッジへの負荷量を可能な限り少なくするため、試料を希釈してから固相カートリッジ処理することとした。

表1 固相カートリッジへの試料負荷量の影響

ザクロ濃縮果汁負荷量	エストロゲンキット (ng/g)	エストラジオールキット (ng/g)
10mg	10.1	3.4
150mg	9.0	3.3

値は、17β-エストラジオールとして示した。

3. 食品素材中のエストロゲン含量

ザクロ濃縮果汁について、ELISAキットによりエストロゲンを測定した。分析精度を上げるため、前処理も含めて2回以上行いその平均を求めた。表2に示すように、エストロゲンキットで9.1ng/g (17β-エストラジオール換算) のエストロゲンが、そしてエストラジオールキットで3.3ng/g (17β-エストラジオール換算) のエストロゲンが検出された。また、固相抽出をしないでキットで測定した場合は、固相抽出した場合より、やや高い値が得られた。このことから、わずかではあるが水溶性のエストロゲン同族体や、抗原抗体反応で擬陽性を示す物質の存在が示唆された。

表2 ザクロ濃縮果汁のエストロゲン含量

試料の前処理	エストロゲンキット (ng/g)	エストラジオールキット (ng/g)
固相抽出あり	9.1	3.3
固相抽出なし	9.5	5.7

値は、17β-エストラジオールとして示した。

今回使用した両キットの交差反応性は表3となっている。エストラジオールキットは、エストラジオールを100とした場合、同族体の16-ケト-17β-エストラジオールや17β-エストラジオール-3-グルクロニドで16%であることを除けば、エストラジオールのみ反応する。これに対し、エストロゲンキットは、人体に存在する形態と考えられているエストロン (E1)、エストラジオール (E2)、エストリオール (E3) の主要エストロゲンのうち、

表3 エストロゲンに対する交差反応性

化合物	交差反応性 (%)	
	エストロゲンキット	エストラジオールキット
エストロン(E1)	87.0	1.3
2-メトキシ-E1	<0.03	<0.4
E1-3-硫酸	<0.03	1.0
17 β -エストラジオール(E2)	100.0	100.0
16-ケト-E2	118.0	16.0
2-メトキシ-E2	0.2	2.0
E2-17-グルクロニド	5.0	<0.4
E2-3-グルクロニド	<0.03	16.0
E2-3-硫酸-17-グルクロニド	0.5	<0.4
エストリオール(E3)	55.0	0.6
16-エピ-E3	129.0	0.5
E3-16-グルクロニド	48.0	<0.4

標準のエストラジオールを100%として、エストロンに87%、エストリオールに55%の交差反応性を示す。以上のことを考慮すると、ザクロ濃縮果汁中には、エストラジオールが約3.3ng/g存在し、エストラジオール以外のエストロン+エストリオールが約5.8ng/g存在すると推測される。なお、他の分析例から推測すると、これらの大半はエストロンであると考えられる。

同様に、ペルー原産で男性用の強精作用と豊富な栄養源として知られているマカ抽出粉末についての測定結果が表4である。試料が粉末のため、あらかじめ、メタノール:1M酢酸緩衝液(pH5.0)=9:1(V/V)の溶液でエストロゲンを抽出し、メタノールを留去した後、固相カートリッジ処理にかけ、その後はザクロ濃縮果汁と同様に処理し、分析を行った。その結果、マカ抽出物には、エストロゲンキットで2.4ng/gのエストロゲンが、そしてエストラジオールキットで0.9ng/gのエストロゲンが検出された。液状であるにもかかわらず、ザクロ濃縮果汁の方が、マカ抽出粉末より多くのエストロゲンを含むことが明らかとなった。

表4 マカ抽出粉末のエストロゲン含量

試料の前処理	エストロゲンキット	エストラジオールキット
	(ng/g)	(ng/g)
固相抽出あり	2.4	0.9
固相抽出なし	4.7	2.1

値は、17 β -エストラジオールとして示した。

ELISA法では、エストロゲン化合物をエストロンであるのか、エストラジオールであるのかといったよう

な特定はできない。また、エストロゲン以外の物質が陽性を示す可能性も否定できない。したがって、エストロゲン様物質として扱うのが妥当であり、ザクロ濃縮果汁には数ng/gレベルのエストロゲン様物質が含まれていることが判明した。エストロゲンと断定するためには、より精度の高いLC-MS/MSなどの方法で、化合物ごとに区別して測定することが必要とされる。

ザクロ果汁の安全性に関しては、通常臨床で服用されるエストロゲンが数ミリグラムであること、また古来より飲用され、現在でもイランで常飲されていることを考慮すれば、問題はないと考えられる。ザクロ果汁にはエストロゲン以外にも、抗ガン作用や抗酸化作用を持つエラグ酸のような有用な生理活性物質や、各種のポリフェノール化合物が含まれている。こうしたザクロ果汁の効能が理解され、一時の流行としてではなく、品質の優れたザクロ果汁や加工食品が消費者に受け入れられることを期待したい。

要 約

主にエストラジオールと反応するエストラジオールキットと、エストロンやエストリオールと反応するエストロゲンキットを用い、ザクロ濃縮果汁等をBakerbond SP E Octadecylディスプレイブル抽出カラムで前処理した試料についてエストロゲンを測定した。その結果、ザクロ濃縮果汁には、エストロゲンキットで9.1ng/gの、そしてエストラジオールキットで3.3ng/gのエストロゲン様物質が検出された。同様に男性用強精作用を示すと言われているマカ抽出粉末では、エストロゲンキットで2.4ng/gの、そしてエストラジオールキットで0.9ng/gのエストロゲン様物質が検出された。

文 献

- 1) 師岡孝次: ザクロで打ち勝つ更年期・生活習慣病, (ハート出版, 東京), p. 47 (1999).
- 2) 鶴田真季子: 週刊朝日増刊号「健康食2000」, (朝日新聞社, 東京), p. 60 (2000).
- 3) 岡本順子, 岡本浩一: ベルシヤザクロの神秘の力, (ごま書房, 東京), p. 238 (1998).
- 4) 岡本順子, 岡本浩一: ザクロの凄い効きめ, 主婦と生活社, 東京), p. 213 (1997).
- 5) 武田薬品(株)生活薬響カンパニー: エストロゲンキット, エストラジオールキットマニュアル, (2000).