

の発情期に生産量が上昇するが（文献-17）が、やはり予想通り妊娠牛での値の方が高かった（文献-3、-14、-18、-20）。プロゲステロンについては、妊娠牛と早期去勢牛のデータしか集まらなかったが（表 4、5）、ここでも予想通り妊娠牛の値が高かった。テストステロンについては、妊娠牛、非妊娠成牛、雄成牛の濃度についての文献が集まった。予想通り雄成牛の組織濃度は高かったが、妊娠牛の値もかなり高く、一部組織（腎）では雄成牛の値を超える場合もあった。以上を総合して、インプラント剤によるステロイドホルモン濃度の増加が人体に何らかの影響を与えるかの基準を以下の値とした。エストロゲンとプロゲステロンに関しては、妊娠牛と肉用牛の組織濃度の倍率、エストラジオール17 β で 5~10 倍、エストロンについては 50~100 倍、プロゲステロンに関しては 50~100 倍、テストステロンに関しては、雄成牛と肉用牛組織濃度の倍率、20~50 倍である。

インプラント剤処置をした場合の組織ホルモン濃度が増加については、エストロゲンに関しては早期去勢牛、非妊娠幼牛、非妊娠成牛、ビー牛、雄成牛に投与した場合の文献が集まった。使用インプラント剤としては Compudose, Synovex-S, Implix BM, Torelor であった。この内 Compudose は天然ホルモンであるエストラジオールを有効成分としており、インプラント剤が体内にある間のホルモン濃度の増加は、エストラジオール17 β で 2~5 倍程度、エストロンで 2~3 倍で（文献-3、-9、-17、-18）、あまり問題となる濃度の増加はなかった。一方、Synovex-S, Implix BM, Trelo r はエストラジオール17 β とテストステロンの配合剤であるが、この場合はインプラント剤が体内にある間のホルモン濃度の増加は、エストラジオール17 β で 30~80 倍、エストロンで 2~5 倍であった（文献-1

、-14、-16）。従ってテストステロンと配合した製剤では、基準となる妊娠牛とその他の牛の組織濃度の倍率と比較して、エストロンは問題ないが、エストラジオール濃度は基準の 5~10 倍を越える場合があるのは明らかである。しかし、Vynckierら（文献-21）や Wagner ら（文献-22）によると、エストラジオール17 β の牛体での消失は極めて早く、半減期は 1 時間以内である。これはインプラント剤を体内から除去して 5 時間経てば、牛体中の残留量は初期の 5 %以下となることを意味している。事実表 7 にあるように、早期去勢牛にエストラジオールをインプラントし、一定期間体内に留置した後それを除去して12 時間後には、エストラジオール17 β 濃度は control と同程度になっている。またビー牛での試験では、24 時間後には control の組織と差が無くなっている（表 9）。従って天然ホルモンに関する限り、休業さえ守れば、暴露についての心配は無いと考えられる。

しかし、Torelor 中の有効成分である人工ホルモントレンボロンの場合は、化合物自体の残留はかなり長く（半減期約 15 時間；文献-21）、天然ホルモンの残留とは別の問題を提起している。また本化合物は組織蛋白と結合残留することでも有名である（文献-6）。人工ホルモンの残留は大きな問題であろう。

プロゲステロンはインプラント剤の投与により確かに組織濃度は上昇するが、その程度は 10 倍以下であり（表 17、18）、基準となる妊娠牛の組織濃度の高まりと比べて遙かに低い。またその体内半減期は数時間とされ、休業は極めて容易であろう。

一方テストステロンはインプラント剤の投与によりかなりの増加の傾向は認められる（表 19~21）。特に雌子牛に Implix BF（テストステロンとエストラジオール17 β

の配合剤)をインプラントした場合は、表 7 にある妊娠牛の組織濃度に匹敵する値になることが考えられる。しかしテストステロンの半減期は人で 15 分以内(文献-2)であり、おそらく牛でもあまり長くないはずであるから、この場合も休薬の指示さえ守れば、人体に影響を及ぼす濃度には成り得ないとする。

またステロイドホルモンの人の生産量との比較から、インプラント剤の安全性について以下のような見方も可能である。表 21、22 に人のエストロゲン、プロゲステロン、テストステロンの 1 日生産量(文献-7)を示した。エストロゲンに関しては、最もこのホルモンに感受性の高い思春期前の少年が 1 日に生産するホルモン量は 6 μg である。1 日 200 g の肉を食べたとして、インプラント剤を使用中の肉でもホルモン濃度は 30 ng/kg 以下である。この肉由来で体内に入るエストラジオール 17β 量は 6 ng で 1 日生産量の 1000 分の 1 という計算になる。プロゲステロンとテストステロンについても同様の計算をすると、プロゲステロンについては、思春期前の男子で 1 日の生産量が 150 μg で、インプラント剤使用中でも牛肉中プロゲステロン濃度は 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下で、1 日摂取量は 2 μg に満たない。テストステロンでは最も生産量の少ない思春期前女子で 1 日 3 2 μg で、インプラント剤使用中濃度を 0. 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ として 1 日摂取量は 0.1 μg 以下である。これらの値は繰り返すがインプラント剤が牛の体内に入っている(休薬していない)場合の、しかもホルモン濃度を多く見積もったの計算値である。人のホルモン生産量とのバランスを考えても、インプラント剤由来のホルモンが人体に入る量は極めて少ないであろう。

VI. まとめ

以上結論としては、現在使われているインプラント剤は、牛体組織のエストロゲン、プロゲステロン、テストステロン濃度を上昇させ有用な増体効果を示し、各ホルモン濃度は増加するが、その程度はインプラント剤が牛の体内にある場合でも、食用を認められている成牛組織の濃度を大幅に超えることはない。性成熟に達した動物では、雌のプロゲステロンと雄のテストステロンの 1 日生産量はミリグラムの単位である。エストロゲンは妊娠期のみこのオーダーに達する(文献-11)。また各ホルモンの消失半減期は短く、さらに人体で産生されるホルモン量と比べると、インプラント剤由来のホルモンが人体に入る量は極めて少ない。従って行政当局の定めた休薬期間を遵守している限りは、インプラント剤による人体の内分泌環境に対する影響は無いと考える。

この問題については、人でのこれらのステロイドホルモンの ADI (1 日摂取許容量) 値が決定されれば、より科学的な評価が可能となろう。事実、本年 2 月にローマで開かれた第 52 回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議では、アメリカ合衆国主導で食料生産動物用成長促進ホルモン剤の ADI 値の原案が出たそうである。その案によると、人のこれらホルモンに対する ADI 値は大きく、食肉由来のホルモンは多く見積もっても数 %にしかならない。そうした科学的背景からであったからであろうか、昨年 11 月に出された Federal Regulation には、FDA は肉用雌牛に使う Synovex Plus (酢酸トレンボロン 200 mg と安息香酸エストラジオール 28 mg 含有) の使用を、従来許可していなかった仕上げ期にまでの拡大を認可した記事が見られる(文献-8)。

表 1. 妊娠未經産牛組織・臓器中のエストラジオール17βとエストロン

(平均濃度と標準偏差 ; ng/kg)

(文献-14)

	筋肉	肝	腎	脂肪
妊娠120日				
エストラジオール17β	13.3±5.21	82.5±75.9	118±58.6	48.1±19.8
エストロン	156±79.3	18.2±15.1	85.3±69.4	1283±885
妊娠180日				
エストラジオール17β	27.3±14.3	380±280	230±99.9	71.5±37.2
エストロン	482±301	115±82.6	166±94	2717±1259
妊娠240日				
エストラジオール17β	32.7±16.1	1027±365	274±84.8	67.5±34.6
エストロン	523±240	145±55.4	142±41.2	2786±1497

表 2. 非妊娠未經産牛組織・臓器中のエストラジオール17βとエストロン濃度

(平均濃度と標準偏差 ; ng/kg)

(文献-19)

	筋肉	肝	腎	脂肪
エストラジオール17β	7.1±3.3	8.2±4.0	8.5±4.0	5.6±1.1
エストロン	5.9±1.6	7.5±4.8	6.4±3.0	5.3±1.1

表 3. 繁殖用雄牛の組織・臓器中エストラジオール17βとエストロン濃度

(平均濃度と標準偏差 ; ng/kg)

(文献-3)

	筋肉	肝	腎	脂肪
エストラジオール17β	6.3±2.0	8.5±3.2	10.0±3.4	9.1±2.0
エストロン	7.7±3.1	6.0±1.2	8.7±3.0	15.3±8.2

表 4. 早期去勢牛と妊娠牛の組織中プロゲステロン濃度 (平均濃度と標準偏差 ; μg/kg)

	筋肉	肝	腎	脂肪
妊娠未經産牛	10.1±6.65	3.42±1.37	6.19±1.86	239±116 (文献-14)
早期去勢牛	0.27±0.33	0.26±0.07	0.17±0.14	2.48±1.61 (文献-14)
肉用雄子牛	0.90	0.75	4.07	1.60 (文献-16)

表 5. 妊娠未經産牛の組織・臓器中テストステロン濃度

(平均濃度と標準偏差 ; ng/kg)

(文献-14)

	筋肉	肝	腎	脂肪
妊娠120日	267±101	52.8±10.1	1513±331	590±17
180日	343±117	121±19.4	3505±1537	6751±17

240日	418±180	274±69.4	4014±2269	4694±231
------	---------	----------	-----------	----------

表 6. 雄成牛、未経産雌牛の組織・臓器中テストステロン濃度の比較

(平均と標準偏差 ; ng/kg)

(文献-10)

	筋肉	肝	腎	脂肪
雄成牛	535±525	749±405	2783±2192	10,950±8683
未経産雌牛	92±29	193±101	595±650	250±64

表 7. 早期去勢牛に Compudose をインプラント後の組織中エストラジオール17βと

エストロン濃度の消退

(平均と標準偏差 ; ng/kg)

(文献-9)

休薬時間	筋肉	肝	腎	脂肪
<u>エストラジオール17β</u>				
Control	5.8±3.3	4.0±1.7	6.7±3.4	6.8±4.2
0 時間	3.4±1.7	10.0±9.1	21.1±6.4	15.3±4.6
12 //	3.3±1.6	4.0±1.6	7.5±3.7	8.8±5.3
24 //	4.0±1.0	5.0±1.0	7.5±3.1	7.1±2.1
<u>エストロン</u>				
Control	4.8±2.7	6.5±3.4	7.9±3.8	10.5±6.
0 時間	10.4±6.7	8.8±6.4	19.2±6.6	34.8±11
12 //	9.5±4.3	4.1±1.7	10.3±4.9	25.3±9.
24 //	4.0±1.0	4.7±0.6	7.1±0.5	14.3±2.

表 8. 非妊娠未経産牛に Compudose をインプラント後の組織中エストラジオール17β

とエストロン濃度

(平均と標準偏差 ; ng/kg)

(文献-19)

	筋肉	肝	腎	脂肪
<u>エストラジオール17β</u>				
Control	7.1±3.3	8.2±4.0	8.5±4.0	5.6±1.1
Treated	5.8±1.1	7.3±2.5	26.3±11.9	9.3±4.7
<u>エストロン</u>				
Control	5.9±1.8	7.5±4.8	6.4±3.0	5.3±1.1
Treated	6.4±2.2	6.7±2.4	10.2±6.4	9.9±6.7

表 9. ビール牛に Compudose をインプラントし、インプラントを除去した後の

組織中ホルモン濃度の消退

(平均と標準偏差 ; ng/kg)

(文献-18)

休薬時間	筋肉	肝	腎	脂肪
<u>エストラジオール17β</u>				

Control	6.8±3.4	14.7±5.8	10.6±5.3	11.2±14.9
0 時間	18.4±5.6	32.0±11.2	57.0±18.1	38.5±10.9
24 "	6.1±1.7	16.0±8.3	10.9±4.2	7.1±2.8
<u>エストロン</u>				
Control	10.8±8.7	9.1±3.6	7.8±4.6	13.9±4.8
0 時間	11.7±5.7	22.3±8.8	34.7±9.8	24.6±12.0
24 "	8.0±4.1	9.2±4.4	9.6±3.7	10.4±4.8

表 10. 雄牛に Compudose をインプラントした時の組織・臓器中エストラジオール17β
とエストロンの濃度の消長 (平均と標準偏差: ng/kg) (文献-3)

	筋肉	肝	腎	脂肪
<u>エストラジオール17β</u>				
Control	6.3±2.0	8.5±3.2	10.0±3.4	9.1±2.0
Treated	8.5±2.7	16.6±12.4	19.9±6.2	20.2±6.2
<u>エストロン</u>				
Control	7.7±3.1	6.0±1.2	8.7±3.0	15.3±8.2
Treated	6.8±1.9	6.9±2.6	15.1±5.4	29.6±10.

表 11. 早期去勢牛に SYNOVEX-S をインプラント後の組織中ホルモン濃度
(平均と標準偏差; ng/kg) (文献-14)

	筋肉	肝	腎	脂肪
<u>エストラジオール17β*</u>				
Control	0.84±0.30	0.91±0.42	1.5 1.61	1.82±1.02
15-日	9.70±3.2	5.36±2.05	13. 3.02	41.4±8.53
30-日	8.28±5.14	6.75±4.93	9.4 5.40	28.6±21.8
61-日	7.29±2.51	4.52±5.48	6.4 1.89	38.6±11.9
<u>エストロン*</u>				
Control	1.60±0.65	0.66±0.24	1.0 0.49	8.47±5.10
15-日	2.12±0.59	2.04±0.84	4.4 1.37	20.3±9.15
30-日	1.99±0.85	1.79±0.94	2.5 1.23	14.4±7.71
61-日	2.60±1.47	2.10±3.57	2.0 0.46	26.0±12.93

(P<.001)。

表 12. 早期去勢牛に Torelor をインプラント後の組織中ホルモン濃度
(平均と標準偏差: ng/kg) (文献-1)

	筋肉	肝	腎	脂肪
エストラジオール17β遊離型				

Control	23±12	21±7	16**	14
15-日	40±31	40±25*	53±10	119±17
30-日	39±24	62±48*	53±10	122±41
60-日	37±15	25±9*	51±29	126±47
75-日	28±17	20±5*	74±43	84±60
エストラジオール17β抱合型				
Control	9**	35±9	41±4	10**
15-日	14**	296±253	99±31	14**
30-日	20**	306±191	117±36	13**
60-日	6**	295±333	111±140	24**
75-日	11**	99±137*	133±129	9**
エストロン				
Control	-	16**	-	24**
15-日	-	53±37	-	69±14
30-日	-	59±25	-	93±12
60-日	-	57±42	-	85±16
75-日	-	36±47	-	69±26

** 検出限界以下

* 有意差なし (P>0.05)

表 13. 雌雄肉牛に Implix BMをインプラントした後のエストラジオール17β濃度の変化
(平均と標準偏差 : ng/kg) (文献-16)

	筋肉	肝	腎	脂肪
雄肉牛				
Control	7±2	32±11	13±5	12±5
15 日	36±6	154±60	85±19	92±76
30 日	48±22	76±23	125±58	38±45
50 日	60±13	193±49	134±28	96±76
雌肉牛				
Control	5±1	32±9	17±3	15±3
15 日	106±22	512±263	249±115	75±63
30 日	88±6	73±20	170±63	171±24
50 日	89±28	95±106	146±104	119±35

表 14. 早期去勢牛に.Synovex-S をインプラントした後の組織中プロゲステロン濃度
(平均と標準偏差 : μg/kg) (文献-14)

	筋肉	肝	腎	脂肪
Control	0.27±0.33	0.26±0.07	0.17±0.14	2.48±1.61
15 日	0.23±0.12	0.18±0.03	0.14±0.05	3.20±1.17

30 日	0.23±0.53	0.16±0.03	0.11±0.32	3.48±1.64
61 日	0.41±0.48	0.35±0.07	0.20±0.33	3.40±1.32
90 日	0.44±0.57	0.24±0.12	0.32±0.42	3.67±2.25
120 日	0.58±0.84	0.27±0.08	0.17±0.17	2.62±1.09

表 15. 雄子牛に Implix BM をインプラントした後のプロゲステロン濃度
(平均と標準偏差：μg/kg) (文献-16)

-16)	筋肉	肝	腎	脂肪
Control	0.901	0.749	4.066	1.598
15 日	0.606	0.599	0.994	5.407
30 日	0.597	0.924	2.798	6.520
50 日	0.772	0.771	1.408	8.664

表 16. 未経産牛に SYNOVEX-H をインプラントした後のテストステロン濃度
(平均と標準偏差：ng/kg) (文献-14)

	筋肉	肝	腎	脂肪
Control	19.6±7.09	12.9±1.96	189±91.6	25.5±6.94
30 日	102*±48.1	34.1*±9.98	451*±201	339*±228
61 日	46.7*±22.3	15.7±3.35	228±143	142*±104
90 日	56.7*±34.2	22.6*±7.89	371*±267	115*±69.8
120 日	31.3*±12.4	16.1±5.26	307*±89.3	32.1*±12.1

* control 群より有意に高い。

表 17. 妊娠未経産牛にSYNOVEX-H をインプラントした後のテストステロン濃度
(平均と標準偏差：ng/kg) (文献-14)

	筋肉	肝	腎	脂肪
<u>妊娠120-日</u>				
Control	267±101	52.8±10.1	1513±331	590±176
61-日	357±130	37.6±6.9	1856±426	751±198
<u>妊娠180-日</u>				
Control	343±117	121±19.4	3505±1537	751±174
61-日	356±81.4	60.6±8.0	1974±510*	1047±274
<u>妊娠240-日</u>				
Control	418±180	274±69.4	4014±2269	694±231
61-日	370±89	90.2±8.8	2914±1057	119±155

表 18. 雌子牛に Implix BFをインプラントした後のテストステロン濃度
(平均と標準偏差: ng/kg) (文献-16)

	筋肉	肝	腎	脂肪
Control	6±.3	108±18	96±53	22±1
15 日	360±58	196±104	588±153	1027±620
30 日	245±28	66±7	564±125	1258±600
50 日	225±87	71±22	515±117	750±157

表 19. インプラント処置の有無と各種牛体の組織中のテストステロン、プロゲステロン
エストロゲンの平均濃度 (pg/g) (文献-11)

測定物質	動物	被検組織			
		筋	肝	腎	脂肪
テストステロン	雄牛	535	749	2783	10950
	未経産牛	92	193	595	250
	食肉用子牛	16	39	256	685
	// (処置) a	70	47	685	340
	去勢牛	101			
	// (処置) c				
プロゲステロン	妊娠牛				3602
	未経産牛				1670
	食肉用子牛				580
	// (処置) b				1250
	去勢牛	124			
// (処置) c					
エストラジオール-17β	妊娠牛	370-860			
	去勢牛	14400	12000	12600	
	未経産牛	12000	38300	39800	
エストロン	妊娠牛	120-2090			
総エストロゲン	食肉用子牛	2	600	270	
	“ (処置) d	7	840	320	
	去勢牛	12500	27600	26000	
	“ (処置) c	21800			
	未経産牛	13000	71000	70800	

- a) エストラジオール-17β 20mg とテストステロン 200mg (Heifer-oid) をインプラント後、77日目に屠殺。
- b) エストラジオール-17β 20mg とプロゲステロン 200mg (Implix BM) をインプラント後、70日目に屠殺。
- c) エストラジオール-17β 20mg とプロピオン酸テストステロン 200mg (Synovex H) ま

たは、エストラジオール-17 β 20mg とプロゲステロン 200mg (Steer-oid) をインプラント後、66日目に屠殺。

- d) エストラジオール-17 β 20mg とプロピオン酸テストステロン 200mg (Synovex H) をインプラント後、60日目に屠殺。

表 20. 人のエストラジオール、プロゲステロン生産速度 (文献-7)

	エストラジオール	プロゲステロン
女性	$\mu\text{g}/\text{日}$	$\mu\text{g}/\text{日}$
卵胞期	445	418
黄体期	270	19,580
妊娠終期	37,800	94,000
閉経後	8	326
思春期前女子	31	253
男性		
成人	48	416
思春期前男子	6	150

表 21. 人のテストステロン生産速度 (文献-7)

	$\mu\text{g}/\text{日}$
女性	
非妊娠時	240
妊娠後期	320
妊娠後	140
思春期前女子	32
男性	
成人	6,480
思春期前男子	65

「牛肉中のホルモンの分析法開発」

研究協力者 東京都立衛生研究所 橋本 常生

研究要旨

牛生体に存在するホルモン(エストラジオール、テストステロン、プロゲステロン)が牛の雌雄、性周期、品種等の違いによる濃度を調査するため、牛肉を対象とした分析法を検討した。

通常、牛組織中では ppt から ppb レベルの低濃度でホルモンが存在するため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)やガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)の分析では検出が困難であり、高感度なラジオイムノアッセイ(RIA)による分析が必要である。そのため本研究では牛肉を対象とした RIA 測定のための分析法を開発した。試料調製では固相抽出カートリッジ等を用い操作の簡便化や迅速化を図った。牛肉にホルモンを添加し本分析法での回収も良好であった。牛肉からの検出限界はエストラジオール-17 β で1ppt、テストステロンで10ppt、プロゲステロンで0.04ppbであった。

A. 研究目的

牛肉に存在するホルモンのエストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロンをラジオイムノアッセイ (RIA) で測定するための簡便で迅速な分析法(試料調製法)を開発する。

B. 研究方法

1. 試料

分析法の検討には輸入牛肉を用いた、特に HPLC での添加回収実験では各ホルモンがピークとして認められない試料を使用した。

2. 試薬類

標準品：エストラジオール(estradiol-17 β 、以下 EST と略す)、テストステロン(testosterone、以下 TES)、プロゲステロン(progesterone、以下 PRO)は和光純薬(生化学用)を使用した。

ゼロ濃度標準血清(EST用、TES用、PRO用、Diagnostic Products Corporation 社製)

牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液；

RIA 用牛血清アルブミン(和光純薬)が0.5%となるよう0.1mol リン酸緩衝液(pH7.0)で溶解した。

アセトニトリル、メタノール、n-ヘキサン、イソプロパノール、シクロヘキサン等の有機溶媒は HPLC 用を用いた。

Sep-Pak[®] Vac C18(1g/6cc)、Sep-Pak[®] Vac tC18(1g/6cc)、Oasis[™]HLB(200mg/6cc)(以下 C18、tC18、Oasis と略す)(Waters 社製)、Extrelut[®]-3(以下 Extrelut と略す、メルク社製)、Bond Elut[®] DEA(500mg/3cc、以下 DEA と略す、Varian 社製)

3. 装置

ホモジナイザー：Ultra-Tarrax T25(Janke kunkel Ika[®]-Labortechnik)

高速液体クロマトグラフ：ポンプ880-PU 型、オートサンプラー-851-AS 型、検出器フォトダイオードアレイ MD-910及び紫外部870-UV(いずれも日本分光社製)

固相抽出マニホールド(ジーエルサイエンス社製)

4. RIA 測定：S R L 社測定依頼

(株)エスアールエル

本社：東京都立川市曙町2-41-19

(042)526-7270 〒190-8567

RIA 使用キット：DPC エストラジオールキット、プロゲステロンキット及びトータルテストステロンキット（輸入元：ニッポン・ディーピーシー・コーポレーション、製造元：Diagnostic Products Corporation）

5. 試料調製法

5-1. 抽出

試料(ミンチした牛肉)5.0g を遠心管にとりアセトニトリル/メタノール(4:1)60ml を加えてホモジナイズした後、約3000rpm で10分間遠心分離した。上層の抽出液を n-ヘキサンを用いて洗浄後、下層を分取しイソプロパノールを20ml 以上加え、35° 以下で減圧濃縮した。残留物にアセトニトリル/水(2:8)5ml を加え十分に溶解させた。

5-2. 精製

5-2-1. Sep Pak® Vac C18 による精製

あらかじめアセトニトリル10ml 及びアセトニトリル/水(2:8)10ml でコンディショニングした C18カートリッジに上記の抽出残留物を負荷し、アセトニトリル/水(2:8) (3ml 及び2ml)でカートリッジに移した。次に同混液10ml で洗浄し、減圧吸引(約5分間)によりカートリッジを乾燥後、アセトニトリル10ml で溶出した。この溶出液を約40° で窒素気流下、濃縮乾固した。

5-2-2. Bond Elut® DEA による分画

DEA カートリッジはあらかじめイソプロパノール/シクロヘキサン(5:95)10ml 及びシクロヘキサン10ml でコンディショニングし、上記の濃縮残留物をシクロヘキサ約2ml で負荷した。カートリッジをシクロヘキサン10ml で洗浄後、イソプロパノール/シクロヘキサン(1:99)10ml で PRO 及び TES を溶出し、続いてイソプロパノール/シクロヘキサン(5:95)11ml で EST を溶出

した。各分画液は約40°、窒素気流下で濃縮乾固した。EST 分画は EST 用ゼロ濃度血清0.5ml で、PRO、TES 分画は PRO または TES 用ゼロ濃度血清1.0ml で十分に溶解した (HPLC での分析では各分画の濃縮残留物を移動相に適宜溶解して検討した。) (スキーム 1)。

C. 研究結果及び考察

1. 試料調製法

試料調製法については、著者らが主に HPLC での分析法を開発してきた^{1,2)}。そのため本研究では、その手法を基礎として操作法の簡易化をはかり、ベンゼン及びジクロロメタンなど問題となる溶媒を使わない方法を検討した。

1-1. 抽出方法

試料組織のタンパク変性をさせ、ホルモンを抽出させる目的でアセトニトリル/メタノール(3:1)を抽出溶媒に用いた。今回、実際の試料では筋肉質の部分を試料としたが、脂肪含量は数パーセン以上あり、n-ヘキサンによる脱脂を行った。また本操作ではジクロロメタンによる再抽出を行わず、アセトニトリル/メタノール抽出液を減圧濃縮することとした。そのため突沸が起こりやすくなったが、抽出液にイソプロパノールを加え35° 以下で濃縮を行うことにより突沸を防ぎ操作性が向上した。

1-2. 精製法

従来、ケトステロイド(PRO、TES 等)類とエストロゲン(EST 等)類を DEA カラムで分画後 Sephadex LH20で精製していたが、操作が煩雑で時間がかかり、ベンゼンを使用するなど多少問題があった。そこで本研究では簡便に操作ができる固相抽出カートリッジ等で精製後、DEA で分画する操作法を検討した。

1-2-1. 固相抽出による精製

精製操作で汎用される逆相系固相抽出カ

ートリッジ(C18^{3,4)}、tC18⁶⁾、Oasis⁶⁾)及び多孔質ケイソウ土が充填された Extrelut カラムでの精製を検討した。逆相系のカートリッジカラムはアセトニトリル/水(2:8)でホルモンを負荷し、洗浄後アセトニトリルで溶出したところ、いずれも良好な回収が得られた。しかし実際の試料を負荷したところ特に Oasis で、また tC18でも多少、試料が固相で目詰まりを起こし、負荷や洗浄に時間を要し操作性に問題があった。C18では負荷または洗浄時に多少減圧吸引が必要な場合があるが短時間で処理でき操作性は良好であった。また C18の標準品での回収率は EST で95.4%、TES で99.1%、PRO で99.1%であった。一方 Extrelut では、脂溶性成分の除去を目的にシクロヘキサンでカラムに負荷し溶媒を除去後、アセトニトリルでの溶出を試みたが EST で約60%と回収率が悪かった。そのため、水系試料から脂溶性化合物を抽出する手法、すなわちアセトニトリル/水(2:8)でホルモンを Extrelut に負荷し酢酸エチルで溶出した。このときの EST は89.7%、TES は91.3%、PRO は94.6%と回収はほぼ良好であったが、C18等と比べ脂溶性の残渣量が多く、C18等がより精製効果があると認められた。以上の結果から固相抽出カートリッジでの精製には C18を用いることとした。

1-2-2. Bond Elut DEA による分画

シクロヘキサン及びシクロヘキサン/イソプロパノールを用いステロイドの溶出を検討した。ホルモンをシクロヘキサンで負荷し、15ml 以上溶出したがいずれのホルモンも溶出しなかった。次にシクロヘキサン/イソプロパノール(99:1)で溶出したところ約2ml で PRO が、3~8ml で TES が溶出し、EST は20ml 以上でも溶出されなかった。そのためシクロヘキサン/イソプロパノール(95:5)を流したところ約10ml で EST の溶出が完了した。以上の結果か

ら、シクロヘキサン約2ml でカラムに負荷し、シクロヘキサン10ml で洗浄後シクロヘキサン/イソプロパノール(99:1)10ml で PRO と TES を溶出させ、シクロヘキサン/イソプロパノール(95:5)11ml で EST を溶出させた。このときの回収率(標準品、HPLC)は EST が94.9%、TES が93.6%、PRO が97.1%と良好な結果が得られた。

1-3. RIA 測定用溶解液

本研究で用いた RIA キットは主に臨床試料(血液等)を対象に開発されたものであり、血清または血漿から直接測定される。牛肉から抽出精製後の残留物のマトリックスは血清や血漿のそれと大きく異なり、測定系、特に抗原抗体反応への影響が考えられ RIA 測定値に差がでる可能性が考えられる。そのため試料調製後の溶解溶液の選択を検討した。牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液^{7,8)}及びゼロ濃度標準血清にホルモン標準品を添加(EST:20~3600pg/ml、TES:200~16000pg/ml、PRO:0.1~40ng/ml)して RIA 測定値と比較した。EST では牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液に溶解した EST20pg/ml 及び50pg/ml 溶液の測定値がいずれも10pg/ml(検出限界)以下となり、低濃度での EST の検出が不可能であった。一方、ゼロ濃度標準血清に溶解した場合はそれぞれ15.9±2.8pg/ml 及び39.5±6.1pg/ml と添加濃度より多少低く測定される傾向がみられたが、牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液に比べ添加濃度との差が少ない結果が得られた。また PRO、TES についてもゼロ濃度標準血清に溶解した場合の方がより添加濃度に一致した。以上の結果から試料調製後の溶解溶液には各ホルモンのゼロ濃度標準血清を用いる方がより誤差の少ない測定結果が得られると考えられた。また TES 及び PRO のゼロ濃度標準血清は TES、PRO のいずれの測定にも用いることができるため試料調製での TES・

PRO 分画は同一の標準血清で溶解後 TES 及び PRO の測定が可能であった。

2. 検出限界

RIA 測定キットの検量線濃度範囲は EST で20~3600pg/ml、TES で200~16000pg/ml、PRO で0.1~40ng/ml であり、実際の依頼検査の検出限界は EST は10pg/ml、TES は50pg/ml である。PRO は試料の影響がありため0.2ng/ml を検出限界としている。

試料調製では EST で10倍、PRO 及び TES で5倍濃縮されるので、牛肉中の検出限界は1ppt(EST)、10ppt(TES)、0.04ppb (PRO)である。

3. 添加回収実験

3-1. HPLC による添加回収

通常 HPLC では天然に存在する ppt レベルの微量のホルモンを検出することは不可能であるため、高濃度のホルモンを添加して回収実験を行った。添加回収に使用する牛肉試料はあらかじめ HPLC でホルモンと同じ保持時間にピークのないことを確認した。その試料に各ホルモンを0.2ppm 相当添加し試料調製後、HPLC で回収率を求めたところ、EST で 90.8±2.5%、TES で95.0±2.8%、PRO で92.7±5.0%(表1) とバラツキも少なく良好な結果が得られた。

3-2. RIA による添加回収

牛肉試料に一定量のホルモンを添加し、本法により試料調製後、RIA での測定値を表2に示した。また無添加(ブランク)試料の測定値を各添加試料の測定値より差し引いて回収率を求めたところ EST5ppt 添加で90%、50ppt 添加で64.8%であった。50ppt の添加では回収率がいくぶん低いですが、これは、「1-3. RIA 測定用溶解液」の項で EST 標準品を RIA で測定したとき、その測定値が多少低い値を示す傾向がみられたことによる影響と考えられる。TES では、ブランクの濃度が検出限界(10ppt)以下であり、

0及び10ppt で計算したため、回収率は40ppt で63.5~88.5%、200ppt で74.7~79.7%の範囲を示した。PRO では0.4及び4ppb 添加で80%以上の回収が得られた。

D. 結論

牛肉中のエストラジオール-17 β 、テストステロン、プロゲステロンの分析法は、試料よりアセトニトリル/メタノールで抽出し、n-ヘキサンで脱脂後、固相抽出(Sep Pak C18及び Bond Elut DEA)カートリッジで精製して RIA で測定した。牛肉にエストラジオール-17 β (5及び50ppt)、テストステロン(40及び200ppt)、プロゲステロン(0.4及び4ppb)を添加したとき、本分析法の回収率は60~90%であった。牛肉での検出限界はエストラジオール-17 β で1ppt、テストステロンで10ppt、プロゲステロンで0.04ppb と高感度な分析が可能で、牛生体中のホルモン濃度を調査する上で有効な分析法である。

E. 文献等

- 1)宮崎奉之 他：食衛誌、36(6)、786-753 (1995)
- 2)厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 理化学編、p452-459(1991)
- 3)貫山道子 他：第34回全国衛生化学技術協議会年会講演集、p54-55(1997)
- 4)Tsujioaka, T. et al. : *Research in Veterinary Science*, 52 105-109(1992)
- 5)長南隆夫 他：日本食品衛生学会第75回 学術講演会要旨集、p52(1998)
- 6)堀江正一 他：食衛誌、39(6)、383-389 (1998)
- 7)橋本常生 他：食衛誌、34(3)、211-215 (1993)
- 8)Klingler, W. et al. : *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 311, 352-353(1982)

牛肉5g(ミンチ)	アセトニトリル/メタノール(4:1) 60ml 遠心分離(3000rpm) 10分間. n-ヘキサン 30ml(分液漏斗200ml)
抽出液(下層)	イソプロパノール20ml以上添加 減圧濃縮(35°C以下) *1
残留物 *2	Sep Pak Vac C18 (1g/6cc) カートリッジ* アセトニトリル/水(2:8) 5+3+2ml 負荷 *3 アセトニトリル/水(2:8) 10ml 洗浄 吸引乾燥(5分間) アセトニトリル10ml溶出 濃縮乾固(窒素ガス気流下) *4
RIA 試験溶液	Bond Elut DEA(500mg/3cc)カートリッジ* シクロヘキサン 約2ml負荷 シクロヘキサン 10ml 洗浄 溶出 (1)イソプロパノール/シクロヘキサン(1:99)10ml(テストステロン,7-αテストロン画分) (2)イソプロパノール/シクロヘキサン(5:99)11ml(エストラジオール画分) 濃縮乾固(窒素ガス気流下) セロ濃度標準血清 1ml(テストステロン,7-αテストロン画分) 0.5ml(エストラジオール画分) 溶解

スキーム1. RIAによる牛肉中ホルモンの分析法

コンティンギング

- (1) Sep Pak C18 Vac : アセトニトリル10mlを通した後, アセトニトリル/水(2:8)で洗浄した.
 (2) Bond Elut DEA : イソプロパノール/シクロヘキサン(5:99)10mlを通した後, シクロヘキサン10mlで洗浄した.

- *1 突沸を避けるためイソプロパノールを20ml以上添加し, 35°C以下で減圧濃縮する.
- *2 イソプロパノール等を窒素気流下で除く.
- *3 必要に応じ減圧吸引して滴下させる.
- *4 十分に水分を除く.

表 1 HPLCによるホルモンの添加回収率

化合物	添加濃度(ppm)	平均回収率(%)±標準偏差
エストラジオール	0.2	90.8±2.5
テストステロン	0.2	95.0±2.8
プロゲステロン	0.2	92.7±5.0

n=5

HPLCは紫外部検出(230nm)により分析した。

ホルモンが検出されないことを確認した牛肉を用いた。

表 2 RIAによるホルモンの添加回収率

化合物	添加濃度	RIA測定値 (平均±標準偏差)	回収率(%)
エストラジオール	0(ppt)	2.9±0.4	—
	5	7.4±0.8	90.0
	50	35.2±6.1	64.6
テストステロン	0(ppt)	10未満	—
	40	35.4±6.8	63.5~88.5
	200	159.4±16.5	74.7~79.7
プロゲステロン	0(ppb)	0.38±0.06	—
	0.4	0.71±0.13	82.5
	4	3.76±0.20	84.5

n=5

「牛肉中のホルモンの濃度調査」

分担研究者	東京都立衛生研究所	宮崎奉之
研究協力者	東京都立衛生研究所	橋本常生
研究協力者	静岡県西部食肉衛生検査所	秋山真人

研究要旨

牛生体内の天然ホルモン（エストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロン）濃度は様々な要因により変動する。そのため牛から生産される食肉中のホルモン濃度もこれに連動して変化すると推察される。その要因として、ホルモン剤の使用の有無、牛の品種、雌雄、組織、部位、年齢、飼料、栄養源、性周期など多くの要因が挙げられる。ここでは今回、開発した RIA による測定法を用いて、我が国で消費されている牛肉中のホルモン濃度を測定することを目的として、国内品、輸入品を対象に試料を収集し、様々な要因を解析して測定し、得られた結果を文献調査結果と比較して考察した。なお、今年、JECFA(FAO/WHO)のコーデックス委員会において、天然ホルモンについて ADI(一日摂取許容量)が提案されており、この値と牛肉の摂取量からみた安全性について推定を試みた。その結果、牛肉中のホルモン濃度は牛の正常な生理的変動の範囲にあり通常の摂取量であれば問題ないレベルであった。すなわち、内分泌かく乱作用の面からも特に問題はないと結論した。

A. 研究目的

国内産及び外国産の牛肉中の天然型ホルモン（エストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロン）の濃度を測定し、食品としての内分泌かく乱作用を含めた食品の安全性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

当初、国内産の牛肉については、ホルモン剤を使用している実態があると考えた。そのため、ホルモン剤使用牛と無使用の牛肉中のホルモンを比較し、その牛肉を食品としてとらえ、食の安全性を調査する計画をたてた。しかし、調査の結果、我が国ではエストラジオールとプロゲステロンの混合剤の販売が許可されているが、この数年前から、その販売実績が全くなく、ホルモ

ン剤使用の国産牛肉の入手が不可能であることが明らかとなった。

そのため、今回は国産牛肉については品種（和牛、ホルスタイン種）、雌雄（経産、未経産、去勢、未去勢）、年齢、部位、産地などの情報を収集し、牛肉中のホルモン濃度を調査し、解析することとした。一方、文献調査から、牛の組織中のホルモン濃度のデータを収集し、様々な要因を調査して比較することとした。その中で、これらは卵胞、黄体、男性の性ホルモンであるため、性周期などにより、各組織中の濃度は変動することが推定されたため、雌牛の場合には、牛肉に加え、卵巣を同時に採取し、その牛肉の屠殺時の性周期を特定することとし、その濃度相関を調査することとした。

一方、外国産（アメリカ産、オーストラ

リア産)の牛肉については情報が限られており、集められの情報の範囲で収集することとした。ホルモン濃度の測定結果は文献調査との比較、国別比較、国内産との比較などにより評価することとした。

1) 試料

国内産の牛肉として、下記の各検査所の協力で、国内産の試料を買い上げた。試料数は各20検体、合計60検体である。なお、買い上げの際、表. 1 に示した調査表にデータの記載をお願いし、さらに、買い上げた雌牛の牛肉と同一個体の卵巣について採取を依頼した。採取の依頼先は下記の3事業所である。集められた試料は冷凍庫に保存後、クール便(冷凍)で搬送、冷凍庫(-20℃)に保存し、分析を開始直前に、冷凍庫から取り出し、迅速に分析操作を実施した。

静岡県西部食肉衛生検査所

〒436- 静岡県掛川市金城 93
(TEL: 0537-24-0725)

東京都芝浦食肉衛生検査所

〒108-0075 東京都港区港南 2-7-19
(TEL:03-3472-5175)

北海道帯広保健所帯広食肉衛生検査所

〒080-2465 北海道帯広市西 25 条北 2-1
(TEL:0155-37-5168)

外国産牛肉として、合計40検体を調査することとした。なお、輸出国の輸出比率がアメリカ、オーストラリアとも比較的近いいため、各20検体とした。買い上げの方法は、(株)ゼンチク(〒108-0075 東京都港区港南 2-5-7、TEL 03-3471-5150)に依頼し、実務的な業務は東京食肉検査センター(〒108-0075 東京都港区港南 2-5-7、TEL: 03-3471-5150)が担当した。試料は冷蔵(チルド)及び冷凍品で、クール便(冷凍)で

搬送、冷凍庫(-20℃)に保存し、国内品と同様に迅速に分析操作を実施した。

2) 測定法

「牛肉中のホルモンの分析法の開発」の項を参照のこと。分析法についての信頼度についても本項を参照のこと。なお、RIA測定は株式会社エスアールエル(本社:〒190-8567 東京都立川市曙町 2-41-19 安田火災立川ビル:TEL:042-526-711 代表)が実施し、測定の信頼性に関しては貴社の試験管理体制の中で実施された。

3) データの処理法

本測定法による測定結果では、エストロジオールの検出限界は1 ppt、プロゲステロンは0.04 ppb、テストステロンは10 pptであった。これらの検出限界以上を数値化した。

しかし、これらの検出限界以下のものの値にゼロを入力するとデータ処理ができないこと、そしてこれらホルモンは天然に存在するものである点などから、これらの検出限界以下の値には全て検出限界値の半値を入力し、データ処理を行った。

なお、脂肪含量は%で、ホルモン濃度は湿重量当たり(全重量当たり)の濃度である。脂肪重量当たりの濃度も全て算出したが、脂肪濃度とホルモン濃度の相関が一部の要因を除いて、明確にならなかったため、参考値として作成したにとどめた。測定データの処理はマイクロソフト・エクセルを用い、平均値、標準偏差、各項目間の相関係数を算出した。

4) 脂肪含有量の測定法

細切した牛肉試料 10.0 gを精密に秤量し、これに水 10mL、アセトン:ヘキサン(1:2) 80m Lを加えて、ホモジナイズした。遠心分離、アセトン・ヘキサン層を分

取した後、無水硫酸ナトリウムを用いたカラムにより脱水した。予め容器の重量を測定したナス型フラスコに得られた抽出液をとり、減圧下に濃縮乾固した。容器ごと重量を測定して、予め測定した容器重量を差し引くことにより脂肪重量を算出した。さらに、計算により濃度%とした。

2) 卵巣の性周期の判定

卵巣の試料の合計 20 検体は東京農工大学農学部小久江栄一教授及び同大学臨床繁殖講座田中助手が実施した。

C. 研究結果

1) 国内産牛肉のホルモン濃度

国内産牛肉、各 60 試料中の全重量当たりのホルモン（エストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロン）の測定結果を表 2 に示す。全検体のホルモンの濃度範囲及び平均濃度は表 4, 5 に示すように卵巣ホルモンのエストラジオール-17 β 濃度は 1 ppt $>$ ~ 12.8 ppt、平均 1.15 \pm 1.87 ppt、黄体ホルモンのプロゲステロン濃度は 0.04 ppb $>$ ~ 8.17 ppb、平均 3.19 \pm 5.80 ppb、男性ホルモンのテストステロン濃度は 10 ppt $>$ ~ 952 ppt、平均 30.9 \pm 122.1 ppt であった。この中で、標準偏差値が示しているようにテストステロンは濃度にバラツキが大きい特徴があった。このようにホルモンの平均濃度はプロゲステロン $>$ テストステロン $>$ エストラジオールの順であった。すなわち、プロゲステロンは ppb 濃度であり、テストステロンは数十 ppt、エストラジオール-17 β は数 ppb 濃度であった。エストラジオール-17 β の検出限界は 1ppb であるが、44 検体/60 検体 (73.3%) が検出限界以下であった。また、テストステロンでは 32 検体/60 体 (53.3%) が、プロゲステロンでは 4 検体/60 検体 (6.6%) が検出限界以下であった。

今回の国産牛肉試料（モモ肉、頸肉、頭肉）の平均脂肪含有率は 7.69 \pm 10.11 % であった。

2) 品種によるホルモン濃度

国内産牛として、和牛の黒毛和種、乳牛のホルスタイン種、F1種（雑種）の他、多くの種類があるが、ここでは我が国では最も一般的である 2 種類、和牛（黒毛和種）、乳牛種のホルスタイン種の 2 種に限定して、調査した。

品種別のホルモン濃度を表 4 に示す。数値は各種ホルモンの濃度範囲、平均値、標準偏差を示している。

エストラジオール-17 β ではホルスタインが平均 0.87 \pm 0.76 ppt、和牛が 1.73 \pm 3.02 ppt、プロゲステロンではホルスタイン種が 2.62 \pm 4.17 ppb、和牛では 4.34 \pm 8.18 ppb、テストステロンではホルスタインが 16.6 \pm 18.1 ppt、和牛が 59.6 \pm 210.5ppt といずれも和牛の濃度はホルスタイン種の 2 倍以上高い値を示した。和牛のテストステロン濃度の標準偏差が大きく、バラツキがあることを示している。

品種別の脂肪含有量はホルスタインで 7.86 \pm 11.30 %、和牛で 7.32 \pm 7.41 % であり、若干ホルスタイン種で高かった。

3) 雌雄の違いによるホルモン濃度

同様に雌雄別によるホルモン濃度の比較を表 7 に示す。エストラジオール-17 β 濃度は雌牛で 1.51 \pm 2.41 ppt、雄牛で 0.80 \pm 1.01 ppt であり、プロゲステロン濃度は雌牛で 6.00 \pm 7.20 ppt、雄牛で 0.37 \pm 0.50 ppb であり、テストステロン濃度は雌牛で 22.7 \pm 20.2 ppt、雄牛で 39.0 \pm 172.5 ppt であった。この結果は女性ホルモンのエストラジオール-17 β 、プロゲステロンが雄牛に比べ雌牛で、エストラジオール-17 β 及びプロゲステロン濃度が高い

ことは当然の結果である。一方、男性ホルモンのテストステロン濃度は、同じ様に雌牛に比べ雄牛でテストステロン濃度が高かった。

さらに、雌（経産、未経産）、雄（去勢、未去勢）の情報に品種の要素を入れて、平均値を求めると、表7に示すように、雌、経産の和牛、ホルスタイン種のエストラジオール、テストステロン濃度はほぼ近い。和牛に高い濃度を示すのは未経産牛で、エストラジオールで高く、テストステロンで低い。同様に雄、去勢のホルスタイン種、和牛の各種ホルモン濃度もかなり近い。一方、未去勢和牛でテストステロン濃度が高い検体があり、これが和牛の平均テストステロン濃度を高いものとしている。

雌雄による濃度脂肪含有量は雌で 4.39 ± 4.54 、雄で 10.97 ± 12.83 と平均2倍以上、雄牛で高かった。

さらに、雌雄については、雌では、経産、未経産、雄では去勢、未去勢に分類して調査した。その結果を表8に示す。未経産、及び未去勢の検体が少ないため、バラツキが大きいことを念頭に置く必要がある。

すなわち、エストラジオール-17 β 濃度は経産牛で 1.02 ± 0.92 ppt、未経産牛で 3.45 ± 4.93 pptであった。去勢では 0.63 ± 0.36 pptであり、未去勢では 3.15 ± 3.75 pptであった。プロゲステロン濃度は経産牛で 5.66 ± 7.47 ppb、未経産牛で 7.38 ± 6.43 ppbであった。去勢では 0.39 ± 0.52 ppbであり、未去勢では 0.20 ± 0.11 ppbであった。テストステロン濃度は経産牛で 24.5 ± 20.8 ppt、未経産牛で 15.9 ± 17.4 pptであった。去勢では 7.7 ± 5.9 pptであり、未去勢では 478.5 ± 669.6 pptであった。

以上のように、例数が少ないため、結論づけることはできないが、経産、未経産、去勢、未去勢により、ホルモン濃度はかなり異なっている。特に去勢牛のテストステ

ロン濃度は低い、未去勢牛のテストステロン濃度が極めて高い。エストラジオール-17 β 濃度も未経産、未去勢牛で高い。

4) 部位、脂肪含量によるホルモン濃度

国産牛肉の部位別ホルモン濃度を表9に示す。エストラジオール-17 β 濃度はモモ肉で平均 0.87 ppt、頭肉 0.82 ppt、頸肉で 0.50 pptであり、プロゲステロン濃度はモモ肉で平均 3.40 ppb、頭肉 2.54 ppb、頸肉で 4.93 ppbであり、テストステロン濃度はモモ肉で平均 43.90 ppt、頭肉 11.84 ppt、頸肉で 16.12 pptであった。また、脂肪濃度はモモ肉で平均 10.23% 、頭肉で 3.40% 、頸肉で 6.94% であり、頭肉の含有量が低い。

なお、全試料について、各エストラジオール、プロゲステロン、テストステロン濃度の相互の相関について調べたが、いずれも相関のある値は得られなかった。同様に、脂肪濃度(%)と、エストラジオール-17 β 、プロゲステロン、テストステロン濃度の相関を求めたが、相関があるデータは得られなかった。

5) 牛（卵巣）の性周期と牛肉中のホルモン濃度

国産雌牛の牛肉と、同じ生体の卵巣を採取し、性周期を判定した。その結果を表3に示す。このデータを基に性周期とホルモン濃度の関係を調査した。なお、膿種様黄体の判定は黄体期に、卵胞膿種は卵胞期に分類した。卵巣の性周期と牛肉のホルモン濃度の関係を表8に示す。

エストラジオール-17 β 濃度は黄体期で 0.87 ± 0.67 ppt、卵胞期に 2.58 ± 4.10 ppt、卵胞期（排卵直前）に 0.68 ± 0.35 pptであり、エストラジオール-17 β 濃度は卵胞期に高い値を示し、排卵直前には低下している。プロゲステロン濃度は黄体期に

7.40 ± 8.31 ppb、卵胞期に 4.31 ± 5.63 ppb、卵胞期（排卵直前）に 1.86 ± 2.67 ppb であり、黄体期でプロゲステロン濃度は高く、卵胞期に低下するが、さらに排卵直前にはさらには低下する。一方、テストステロン濃度は黄体期で 24.9 ± 22.5 ppt、卵胞期に 15.8 ± 14.4 ppt、卵胞期（排卵直前）に 10.0 ± 5.7 ppt で、プロゲステロン濃度に類似したパターンをとり、テストステロンとプロゲステロン濃度は図 1 のように、相関係数 R^2 0.445 ($y = -1.87x + 11.51$) でかなりの相関があった。また、脂肪濃度とプロゲステロン濃度との間に、相関係数 R^2 0.237 ($y = 0.77x + 2.62$) で、低い相関があった。

6) 外国産牛肉のホルモン濃度

外国産牛肉 40 検体のホルモン濃度を表 10 に示す。表に示すように英名による原料名、ブランド名、工場 No.、解体日などが情報としてわかるのみで、国内で収集した牛肉の情報には遠く及ばない。試料の輸出国はオーストラリア及びアメリカで試料数はそれぞれ 20 である。エストラジオール-17 β 濃度はオーストラリア産で 3.11 ± 2.68 ppt、アメリカ産で 3.56 ± 3.03 ppt であり、プロゲステロン濃度はオーストラリア産で 0.55 ± 0.60 ppb、アメリカ産で 0.50 ± 0.40 ppb であった。テストステロン濃度はオーストラリア産で 8.51 ± 8.71 ppt、アメリカ産で 9.05 ± 16.41 ppt であった。このように、両国によるいずれのホルモン濃度も近似している。

一方、平均脂肪濃度はオーストラリア産が 7.36 ± 4.56 %、アメリカ産は 12.31 ± 6.88 % であり、アメリカ産の方が 2 倍近く高濃度であった。

7) 国内、外国産牛肉のホルモン濃度比較

国内産牛肉と外国産牛肉中のホルモン濃度は表 6、表 10 中に示されている。すな

わち、エストラジオール-17 β 濃度は国内産（計 60 検体）1.15 ± 1.87 ppt、外国産（計 40 検体）3.33 ± 2.83 ppt であり、プロゲステロン濃度は国内産 3.19 ± 5.80 ppb、外国産 0.52 ± 0.520 ppb であり、テストステロン濃度は国内産 30.9 ± 122.1 ppt、外国産 8.78 ± 12.97 ppt であった。

この値からは国内産はプロゲステロン及びテストステロン濃度が高く、外国産はエストラジオール-17 β 濃度が高い。

一方、牛肉中の脂肪濃度（%）は国内産 7.68 ± 10.11%、外国産 9.83 ± 6.29% であった。

D. 考察

1) 国内産牛肉のホルモン濃度

国内産牛肉のエストラジオール-17 β 濃度は最高 12.8 ppt、平均 1.15 ppt、であり、検出限界(1ppb)以下の検体は、73.3%であった。この濃度は文献調査 1) の未経産牛、筋肉 7.1 ± 3.38 ppt、繁殖用雄牛 6.3 ± 2.08 ppt のバックグラウンド値より、かなり低く、最高値も妊娠牛の値、13.3 ~ 32.7 pp よりも低く、生理的な正常の範囲と推定される。同様に黄体ホルモンのプロゲステロン濃度は最高 8.17 ppb、平均 3.19 ppb であり、文献調査の値、妊娠未経産牛、去勢牛、肉用雄小牛でそれぞれ 10.1, 0.27, 0.90 ppb であり、やはり正常な範囲と言える。

男性ホルモンのテストステロン濃度は最高 952 ppt、平均 30.9 ppt であった。なお、テストステロンでは 32 検体/60 体(53.3%) が検出限界以下であった。最高の 952 ppt を示した検体は雄の未去勢牛であり、文献調査 1) による雄種牛 535 ± 525 ppt の生理的な濃度範囲に入るものである。

和牛、ホルスタイン種という品種による 3 種のホルモン濃度に平均値では和牛で高い傾向であったが、雌雄、経産、去勢など