

表1 表2から表14より集計した各種雄牛筋肉部のE1, E2濃度の比較

	E1 (pg/g)	E2 (pg/g)
Steers	1.53, 1.56, 1.7, 2.4, 8.4, 17	0.30, 0.68, 0.77, 0.97, 2.1, 8.6, 10.4, 22.5, 44.5
Calves Steers	0.57~1.95	0.51 ~ 2.91
Bull	7.2, 7.7	5.0, 6.3
Bull Calves	7, 10.8	5, 6.8

表2 去勢牛のバリデーション研究による測定 (n = 6, pg/g)

		Muscle	Fat	Kidney	Liver
Steers	E1	2.4 ±1.53	8.0±6.1	—	—
(T7)	E2	0.30±0.14	1.7±0.32	—	—

表3 去勢牛のバリデーション研究による測定 (n = 1, pg/g)

		Muscle	Fat	Kidney	Liver
Steers	E1	1.8	10.2	13	3.4
(T8)	E2	0.97	1.4	25.4	4.4

表4 子牛(雄牛)にSYNOVEX C and SYNOVEX S 埋め込み実験のコントロール (pg/g)

(FDA/CVM, NADA file 9-576)

Calves	day		Muscle	Fat	Kidney	Liver
Steers	61	E1 (n=5)	0.94±0.36	5.36±3.15	1.05±0.40	1.78±0.27
		E2 (n=5)	1.11±0.30	3.3±0.64	1.46±0.8	1.78±1.05
	119	E1 (n=5)	0.57±0.31	6.10±7.73	1.03±0.45	1.06±0.16
		E2 (n=5)	0.51±0.14	6.73±9.03	1.28±0.82	1.57±0.26
	241	E1 (n=5)	1.73±0.55	4.83±1.99	2.92±0.48	1.69±0.54
		E2 (n=5)	2.21±0.32	3.28±1.07	2.09±0.97	3.45±0.79
	301	E1 (n=5)	0.93±0.34	3.09±1.40	1.20±0.77	1.27±0.57
		E2 (n=5)	2.91±3.36	2.88±1.12	5.64±6.25	2.48±0.67
	329	E1 (n=5)	1.95±0.48	5.07±1.98	2.41±0.98	1.26±0.31
		E2 (n=5)	1.23±0.43	3.16±0.90	3.29±2.54	1.77±0.09
	360	E1 (n=5)	1.61±1.20	3.64±2.10	2.55±0.48	1.72±0.45
		E2 (n=5)	1.68±1.44	5.81±3.4	2.77±0.92	3.62±0.45

表5 去勢牛にSYNOVEX S 埋め込み実験のコントロール
(n=21,700 - 750 lbs, pg/g)
(JECFA)

Steers		Muscle (16)	Fat (21)	Kidney (18)	Liver (18)
	E1	1.53	7.37	1.02	0.73
	E2	0.68	1.91	1.53	0.87

表6 去勢牛にSYNOVEX S 埋め込み実験のコントロール
(n=21,700 - 750 lbs, pg/g)
(FDA/CVM, NADA file 9-576)

Steers (T9)		Muscle	Fat	Kidney	Liver
	E1	1.56±0.65	8.62±5.14	1.03±0.50	0.65±0.24
	E2	0.77±0.35	1.89±1.14	1.7 ±0.6	0.91±0.42

表7 去勢牛にSTEER-oid 埋め込み実験のコントロール(n = 8, pg/g)
(FDA/CVM, NADA file 110-315) (1982)

Steers (T-23)		Muscle	Fat
	E2	44.5±11.7	166.8±29.9

(sensitivity:muscle 26 pg/g, fat 109 pg/g)

表8 子牛 (未去勢) にCOMPUDOSE埋め込み実験のコントロール(pg/g)
(JECFA, vol. 1, p. 218)

	(n)	Lean	Kidney fat	Kidney	Liver
Bull calves (T37)	E1 (17)	10.8±8.71	13.9±4.88	9.8±4.55	9.1±3.56
	E2 (17)	6.8±3.45	11.2±14.94	10.6±5.28	14.7±5.76

表9 未去勢牛にCOMPUDOSE埋め込み実験のコントロール(pg/g)
(JECFA, vol. 1, p. 254)

	(n)	Lean	Kidney fat	Kidney	Liver
Bulls (T38)	E1 (6)	7.7±3.1	15.3±8.2	8.7±3.0	6.0±1.2
	E2 (6)	6.3±2.0	9.1±2.0	10.0±3.4	8.5±3.2

表10 去勢牛にTORELOR 埋め込み実験のコントロール(pg/g)
(FDA/CVM, INAD file 4216) (1986)

Steers (T42)		Muscle	Fat	Kidney	Liver
	E2	22.5±12.4	13.7±7.4	15.5±3.4	20.5±6.9
	Conjugated E2	9.3±8.4	9.7±7.9	41.0±4.1	34.5±9.2
	Total E2	31.8±13.2	23.3±14.7	56.5±7.1	55.0±9.2

表11 去勢牛にE2, trenbolone acetate 埋め込み実験のコントロール(pg/g)
(FDA/CVM, NADA file 140-992)

Steers (T-45a)		Muscle	Fat	Kidney	Liver
	E2	2.1	6.6	21.2	0.0

表12 去勢牛にCOMPUDOSE 埋め込み実験のコントロール(pg/g)

Steers (T-54)		Muscle	Fat	Kidney	Liver
	E1	8.4	10.9	9.1	8.3
	E2	10.4	6.3	9.4	5.9

表13 去勢牛にCOMPUDOSE 埋め込み実験のコントロール(pg/g)

ZEBU Steers (T-58)		Muscle	Fat	Kidney	Liver
	E1	17	5.3	--	8.0
	E2	8.6	5.0	--	8.1

表14 子牛(雄未去勢)にCOMPUDOSE 埋め込み実験のコントロール(pg/g)

Bulls (T-56)		Muscle	Fat	Kidney	Liver
	E1	7	13	8	9
	E2	5	5	11	14

表15 成雄牛(未去勢)にCOMPUDOSE 埋め込み実験のコントロール(pg/g)

Bulls (T-57)		Muscle	Fat	Kidney	Liver
	E1	7.2	13.6	8.5	5.5
	E2	5.0	9.0	9.7	8.7

(2) 雌牛組織中のE1, E2測定データ

表16に表17から表21までのデータの筋肉中のE1, E2濃度をまとめた。まず、E1濃度については、未経産牛では2.3~5.9pg/gであり、中間値は2.54pg/gである。子牛の未経産牛のデータでは0.91~3.07pg/gであり、幼児期ほど、E1濃度は低い傾向にあった。部位別の濃度差は一般的には脂肪組織が高いがその他の組織ではかなりの変動が見られた。なお、妊娠牛ではE1濃度は極めて上昇しており、通常時の100倍近くまでなっている。組織内の濃度としては、やはり、脂肪組織が際立って高いがそれ以外は変動が見られ、脂肪組織>腎臓≧筋肉≧肝臓の状況であった。

E2濃度については、未経産牛では0.5~34.9pg/gであり、中間値は5.80, 7.1pg/gであった。E1濃度に比べ、若干高い値であった。子牛の未経産牛のデータでは1.14~9.51pg/gであり幼児期ほど、E2濃度は低い傾向にあった。未経産牛では子牛は成牛に比べ、E1同様に低めの値を示した。部位別の濃度差は未経産牛で脂肪組織で高い場合が多いが、妊娠時には腎臓>肝臓>脂肪組織>筋肉などの場合が多く見られ、これまでの傾向とは異なってい

た。

表16 表17から表21より集計した各種雌牛筋肉部のE1, E2濃度

	(day)	E1 (pg/g)	E2 (pg/g)
Heifers		2.3, 2.54, 5.9	0.5, 5.80, 7.1, 34.9
Heifer Calves		0.91~3.07	1.14~9.51
Pregnant Heifers	120	156	13.2
	180	482	27.3
	240	528	32.7
Pregnant Heifers	188	110	14.6
	243	458	44.9
	266	638	42.6

表17 子牛 (雌牛) にSYNOVEX C and SYNOVEX H 埋め込み実験のコントロール (FDA/CVM, NADA file 9-576) (pg/g)

Calves	day		Muscle	Fat	Kidney	Liver
Heifers (T16-19)	61	E1 (n=5)	0.91±0.20	3.88±1.87	0.83±0.17	0.64±0.10
		E2 (n=5)	1.42±0.39	2.43±0.92	1.38±0.39	1.43±0.22
	119	E1 (n=5)	3.07±1.26	3.72±2.2	1.67±0.36	1.30±0.52
		E2 (n=5)	1.14±0.24	2.94±0.84	1.96±0.52	1.71±0.33
	241	E1 (n=5)	2.61±0.40	9.92±8.94	2.91±0.44	1.22±0.13
		E2 (n=5)	3.68±2.99	5.58±1.38	2.76±0.59	3.15±1.45
	301	E1 (n=5)	1.68±0.41	5.28±1.58	2.94±1.36	1.88±0.26
		E2 (n=5)	3.42±2.03	6.19±3.38	7.13±1.07	7.56±0.41
	329	E1 (n=5)	1.39±0.33	7.88±2.51	2.68±1.94	1.02±0.15
		E2 (n=5)	2.97±2.35	9.19±9.04	2.46±1.53	2.38±0.49
	360	E1 (n=5)	2.91±0.89	13.9±4.85	1.08±0.43	1.67±0.33
		E2 (n=5)	9.51±6.03	5.36±1.11	2.02±0.32	1.91±0.51

表18 未経産牛 (未妊娠) にSYNOVEX H埋め込み実験のコントロール (400 lbs 以上) (FDA/CVM, NADA files 9-576) (pg/g)

Tissues (n)		Muscle (15)	Fat (35)	Kidney (15)	Liver (10)
Heifers (T10)	E1	2.54±1.12	10.9±5.94	1.42±0.56	1.7 ±1.15
	E2	5.80±9.05	13.4±14.1	2.89±2.50	1.54±1.12

表19 未経産牛にHEIFER-oid 埋め込み実験のコントロール (n = 8) (FDA/CVM, NADA file 110-315) (1982)

Heifers		Muscle	Fat
(T-28)	E2	34.9±15.8	96.1±38.7

(sensitivity:muscle 37 pg/g, fat 154 pg/g)

表20 未経産牛にE2, trenbolone acetate埋め込み実験のコントロール(pg/g)
(FDA/CVM, NADA file 140-992)

Heifers		Muscle	Fat	Kidney	Liver
(T-45b)	E2	0.5	0.1	17.0	0.0

表21 未経産牛にCOMPUDOSE 埋め込み実験のコントロール(pg/g)

Heifers		Muscle	Fat	Kidney	Liver
(T-55)	E1	5.9	5.3	6.5	7.5
	E2	7.1	5.6	8.5	8.2

表22 妊娠牛のバリデーション研究による測定 (n = 1, pg/g)

Pregnant	(days)		Muscle	Fat	Kidney	Liver
Heifers	188	E1	110	1,920	207	10.4
		E2	14.6	55.6	280	81.7
	243	E1	458	4,880	500	258
		E2	44.9	139	417	630
	266	E1	638	5,330	602	584
		E2	42.6	131	484	1,590

表23 妊娠牛にSYNOVEX H 埋め込み実験のコントロール
(FDA/CVM, NADA file 11-427)

Pregnant	days		Muscle	Fat	Kidney	Liver
Heifers	120 (n=10)	E1	156 ± 79.3	1,283 ± 885	85.3 ± 69.4	18.2 ± 15.2
		E2	13.2 ± 5.2	42.1 ± 19.8	118 ± 58.6	82.5 ± 75.9
	180 (n=11)	E1	482 ± 301	2,717 ± 1,259	166 ± 94.0	115 ± 82.6
		E2	27.3 ± 14.3	71.5 ± 37.2	230 ± 99.9	380 ± 280
	240 (n=4)	E1	523 ± 240	2,788 ± 1,497	142 ± 41.2	145 ± 55.4
		E2	32.7 ± 16.1	67.5 ± 34.6	274 ± 84.8	1,027 ± 365

*synchronized controls

表24 未経産牛にSYNOVEX H埋め込み実験のコントロール(中間値)
(pg/g) (JECFA)

Heifers	(n)	Muscle(15)	Fat(35)	Kidney(15)	Liver(10)
(T-48)	E1	2.3	10	1.4	1.4

(3) まとめ及び考察

以上、これまでの結果をまとめると、E1, およびE2濃度は雌牛の未経産牛で経産牛より高く、特に妊娠牛では通常のE1濃度の100倍に近い濃度まで上昇している。E2濃度についても10倍程度の上昇が見られた。一方、雄牛の未去勢牛は去勢牛に比べて、E1, E2濃度とも高い傾向を示した。このように、雌雄、去勢、未去勢、妊娠、未妊娠によりE1, E2濃度は大きく変動した。エストロゲン作用を評価する場合、化合物として、エストロン、エストラジオール-17 β 、エストラジオール-17 α 、さらにこれらのグルクロン酸、硫酸抱合体などがあり、特にエストロン(E1)の活性は表25に示したようにE2の1/2~1/3程度を示している。エストロゲン作用を論ずる場合、これらのことを含めて評価する必要があると考える。

表25 エストロゲン類の効力比較

Estrogen	Relative uterotrophic potencies	
	Subcutaneous route	oral route
Estrone	1.0	1.0
Estradiol-17 β	3.41	2.01
Estradiol-17 α	0.05	0.07

② 環境ホルモン対策事業による牛肉中のホルモン測定結果

平成10年度厚生科学研究費補助金（生活安全対策総合研究事業）の中の「内分泌かく乱物質の食品、食器等からの暴露に関する調査研究」のうちの、「畜水産食品中の内分泌かく乱作用化学物質残留実態調査」報告書をもとにして、牛肉中の天然ホルモン濃度、特にエストラジオール-17 β 濃度についてまとめた。今回開発した、測定法はRIAで検出限界は食肉組織中 1 pg/gであり、検出限界以下については、検出限界値の1/2、すなわち、0.5 pg/gを入力してデータ解析を実施した。

(1) 国産及び輸入牛肉中のエストラジオール-17 β (E2)濃度

国産牛肉60検体（和牛20検体、ホルスタイン種40検体、雌雄半々などの条件）、外国産牛肉40検体（米国、オーストラリア産それぞれ20検体、検体の詳細は不明）のE2濃度を測定した。表1のように、国産の牛肉中のE2（エストラジオール-17 β ）の濃度範囲は1 >~ 12.8 pg/g、平均値と標準偏差は1.15 \pm 1.87 pg/gであり、外国産牛肉中の濃度範囲は1 >~ 10.0 pg/g、平均値は3.33 \pm 2.83 pg/gであった。この結果のように外国産が国内産に比較して、約3倍高い値を示した。なお、外国産のうち、米国产の平均濃度は3.56 \pm 3.03 pg/g、オーストラリア産では3.11 \pm 2.68 pg/gとほぼ同様な値を示した。

表1 国産及び輸入牛肉中のエストラジオール-17β (E2)濃度

	試料数	E2 濃度 (pg/g)
外国産	40	3.33 ± 2.83 (1 > ~ 10.0)
国内産	60	1.15 ± 1.87 (1 > ~ 12.8)

(2) 国内産牛肉の品種、性別による E2濃度

国内産牛肉の由来の牛についての品種 (和牛、ホルスタイン)、雌雄、経産、未経産、去勢、未去勢別に分類した時のE2濃度を表2に示す。雌雄別のE2濃度の平均は、雌の牛肉では 1.51 ± 2.41 (1 > ~ 12.8) pg/g、雄の牛肉では 0.80 ± 1.01 (1 > ~ 5.8) pg/gであり、約2倍程度雌で高い値を示した。なお、高い値としては雌の未経産牛で4.04 ± 2.85 pg/g (和牛)、雄の未去勢牛で5.8 pg/g (和牛) という結果で、いずれも若い牛で高い値を示した。品種別としてホルスタイン、和牛ではその差異は余りないようであるが、検体数が少ないなどの理由で、結論を出すのは無理と考えられた。

表2 国産牛肉の品種、性別による E2濃度

性		品種	数	脂肪 (%)	E2濃度平均±標準偏差(範囲, pg/g)
雌	経産牛	ホルスタイン	19	2.94	1.11 ± 0.99 (1 > ~ 3.9)
		和牛	5	9.86	0.68 ± 0.60 (1 > ~ 1.4)
	未経産	ホルスタイン	1	12.6	1 >
		和牛	5	2.80	4.04 ± 2.85 (1 > ~ 12.8)
(30)					(1.51 ± 2.41) (1 > ~ 12.8)
雄	去勢	ホルスタイン	19	12.57	0.66 ± 0.41 (1 > ~ 2.1)
		和牛	9	8.94	0.57 ± 0.20 (1 > ~ 1.1)
	未去勢	ホルスタイン	1	7.1	1 >
		和牛	1	2.6	5.8
(30)					(0.80 ± 1.01) (1 > ~ 5.8)

(3) 国産雌牛肉の性周期とE2濃度

雌の牛肉試料については同じ牛の卵巣を同時に採取し、その性周期について調査して、ホルモン濃度との相関を調査した。表3に示したように、E2濃度は黄体期で平均 0.87 ± 0.66 pg/g、卵胞期で 4.05 ± 5.90 pg/g、卵胞期の排卵直後で1.58 ± 2.05 pg/gであり、卵胞期では黄体期の約5倍程度高い値を示した。なお、卵胞期の排卵直前ではE2濃度は減少し、黄体期の約2倍程度となっている。卵胞期で高い値を示すことは、血液や乳では解明されており、筋肉中の濃度もこれと同様に連動することが推測された。

表3 国産雌牛肉の性周期とE2濃度

性周期	試料数	E2 濃度(平均±標準偏差、範囲pg/g)
黄体期	17	0.87 ± 0.66 (1 >~ 2.6)
卵胞期	4	4.05 ± 5.90 (1 >~ 12.8)
卵胞期 (排卵直後)	5	1.58 ± 2.05 (1 >~ 5.2)

(4) まとめ及び考察

以上の測定結果及び前章のFDAのデータから考察を加えてみたい。牛肉中のE2濃度は外国産と国内産の値ともFDAの値と単純に比較して、特に高いというものではなかった。なお、外国産の牛肉は国内産に比較して3倍程度E2濃度が高かった原因として、米国およびオーストラリアでは肥育牛にこれらのホルモン剤が使用されており、一方、我が国では使用実態はないという現状が考えられる。しかし、これが原因と短絡的に決めるのには無理があると考え。国内産については種、雌雄別など、考慮して試料採取に当たったが、外国産については全く試料についての情報が得られていない。また、試料数についても特に多いとは言えない状況があり、結論をだすためには今後のデータの積み重ねがどうしても必要である。

今回は牛肉中のエストロゲンとしてはE2の測定のみであったが、エストロゲン作用を有するエストロン(E1)、エストラジオール-17 α , さらにE2を含めたこれらのグルクロン酸、硫酸抱合体など等についても、今後、測定について検討する必要がある。

文献

- (1) D. Arnold. :Hormones, Revised working paper on residues(26.02.99)
- (2) 平成10年度厚生科学研究費補助金(生活安全対策総合研究事業)「内分泌かく乱物質の食品、食器等からの暴露に関する調査研究」「畜水産食品中の内分泌かく乱作用化学物質残留実態調査」報告書(1999.4)

③ホルモン分析法の現状

牛組織である筋肉、脂肪、肝臓、腎臓中のエストラジオール-17 β (E2)などを測定する方法として、ラジオイムノアッセイ(RIA)が用いられてきた。しかし、米国とEUとのホルモン論争の中で、EUはRIAの低濃度の測定の信頼性に関して問題を提起している。ところで、近年、脚光を浴びている内分泌かく乱化学物質の検出の発展に伴って、酵母を用いた血漿中のエストラジオール-17 β (E2)測定法が開発され、その測定感度はRIAの100倍であると報告された。このような状況下、本報告では、E2についての測定法をこの6年間に渡って、Chemical Abstractsより検索し、まとめた。その主な測定法の分類を表1に示す。また、主な文献リストは最後の項に掲載した。E2などエストロゲンについての測定法として測定原理から、主に1) エス

トロゲンレセプターへの結合能を利用する方法、2) 抗原抗体反応を利用する方法、3) 分析機器を利用する方法等に分類できる。

エストロゲンレセプター利用法については次の項で紹介することとする。抗原抗体反応を利用する方法としてはRIA、エンザイムイムノアッセイ(ELISA, EIA)等があるが、年々改良が加えられ、感度等も上昇している。高感度測定法として、RIAによる測定例が最も多い。高感度な分析機器による方法として、GC/MS, LC/MSなどがある。GC/MSはトリメチルシリル化など誘導体化操作が必要であり、ホルモン剤の分析としては測定例が報告されている。最近、LC/MS, 特にLC/MS/MSの技法は発展してきたので期待がもたれる。現在のところはGC/MSと同程度の感度であるので、RIAの感度には遠く及ばない。しかし、確認手段としての可能性はあると考える。

表1 エストロゲン類の高感度分析法の比較

No	方法	感度	原理、試料、長所短所など	主な文献
1	酵母法 ・YES ・RCBA ・Two hybrid yeast assay	0.02 (pg/ml) (ppt)	血清中のエストロゲン類の検出限界。 (RCBAは別紙で紹介) Two hybrid yeast assay はわが国のみで多用されている。	・Environ Health Perspect, 104, 544-8('96), ・J Clin Invest 94, 2475-80 ('94) ・Toxicol Appl Pharmacol, 154, 76-83('99)
2	培養細胞 E-screen	14pgEEQ/L (ppt)	MCF-7細胞を使用	・Sci. Total Environ, 225 (1-2), 33-43('99)
3	Receptor binding assay	5nM(1.36 μ g),	Beacon 2000(Fluorescence polarization)	・Environ Health Perspect. 106, 551-7('98)

4	RIA	0.6pg/ml 5 pg/ml 0.1pg/ml	血漿中、 ultrasensitive method 血清中10-20pg/mlから2-10pg/mlへ感度アップ (チューブ固定法)。 血漿中、 エーテル抽出法	•Int J. Biol. Markers, 12(3), 102-5('97) •J Clin Endocrinol Metab, 74, 571-6('92)
5	EIA (ELISA)	38pg/ml <0.25 pg /well	UV照射,モノクローナル抗体反応 牛の血清中の濃度。エストロンとは100%交差反応	•Anal. Chem. 21(5)1002-8 ('99) •J. Reprod. Dev. 43(5) J9-14 ('97)
6	CLIA	100-1400 ng/L (ppt)	Chemiluminescence Immunoassay。RIAに比較し、感度は若干低いが安定性は高い (70-1000ng/L)。	•Clin. Lab. 43(10), 863-874 ('97)
7	LC-MS LC-MS/MS	1ng/L (ppt) 30pg/ml	水試料を予め濃縮して測定。 牛の血清中の定量限界。 (LC-APCI-MS-MS測定)	•F. J. Anal. Chem., 363, 767-70('99)
8	GC-MS GC-MS/MS	20-100ng/kg (ppt)	食肉試料、抽出、精製、シリル化後SIM。	Analyst, 123(12), 2605-9 ('98)
9	CALUX	6pM(1.6 ng),	Chemical activated luciferase gene expression (CALUX) assay	J. Chromatogr., B, 70, 4(1, 2), 105-117('97)

③-2 エストロゲンレセプターを応用したエストロゲン作用物質の検出法
エストロゲン類のエストロゲンレセプターを応用した検出法として、下記に示したように主に3種の方法がある。

(1) 受容体結合試験

蛍光偏光度測定システム(Full-Range Beacon 2000 System:PanVera Corp.)を用いたエストロゲン受容体結合活性測定キットが市販されている。我が国では宝酒造(株)で販売しており、環境庁、通産省などで使用が増加している。

FP Screen-for-Cmpetitors Kit, ER- α , high sensitivity

(2) 酵母を用いた試験

2-1) 受容体遺伝子を導入して検出する方法

受容体遺伝子(receptor)を組み込んだプラスミドと応答領域遺伝子及びレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを酵母に入れたもの。

- YES: Yeast Estrogen Screen
- RCBA: Recombinant Cell Yeast Bioassay(Klein, Coldhamら) 0.02 pg/ml
- Two Hybrid Assay: Nishikawa ら(日本), Sumpterらの方法がある。

(3) 培養細胞を用いた試験

3-1) 受容体遺伝子を導入して検出する方法

受容体遺伝子(receptor)を組み込んだプラスミドと応答領域遺伝子及びレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを培養細胞に入れたもの。

培養細胞: MCF-7(ヒト乳ガン由来の培養細胞株)、HeLa(ヒト子宮頸ガン由来の上皮細胞株)、HepG2(ヒト肝ガン由来の培養細胞株)

3-2) 細胞増殖を指標とする方法

培養細胞: MCF-7(ヒト乳ガン由来の培養細胞株)、MDA-MB-453(ヒト乳ガン由来の培養細胞株)、LNCap(ヒト前立腺ガン由来の培養細胞株)

- E-Screen: MCF-7: Sotoら

これら3種の方法の主な長所、短所は以下の通りである。

- 1) 受容体結合試験: 蛍光偏光度測定システム(Full-Range Beacon 2000 System:Pan Vera Corp.)はタカラ(宝酒造(株))から装置及びキットを販売されており、高感度で迅速に測定が可能であるが、装置及びキットが高価な点が短所である。
- 2) 酵母を用いた試験: 酵母には細胞壁があって化学物質の透過性が悪いことから、化合物によっては感度が若干低下することがある。しかし、酵母の維持は培養細胞より容易で、コスト的に培養細胞より安価である。
- 3) 培養細胞を用いた試験: 培養細胞系では通常牛胎仔血清あるいはヒト血清を添加するため、すでに血液中に含まれている性ステロイドホルモンなどの存在を考慮する必要があり、低濃度の定量性には問題がある。

以上、いずれの方法も、エストロゲンレセプターと結合する物質、すなわち、化学構造の近いものは陽性となる。そして、その構造の違いにより検出感度が

異なり、原理的にエストラジオール-17 β (E2)のみが検出される訳ではない。例として、合成ホルモンのDESはE2と同じ程度か、それ以上の活性を持つ場合が多い。天然のイソフラボン類も陽性を示す。

牛肉組織中のE2を測定するための応用としては、1), 2)の方法の可能性はあるが未だ報告は見当たらない。なお、2)の酵母法の応用例の1つであるRCBAによりヒト及び牛血漿中のエストロゲン類を測定例があり、牛組織中E2への応用が期待される。なお、RCBAについては次項で議論する。

③-3 RCBA (Recombinant Yeast Cell Bioassay) : 酵母を用いたエストロゲンの測定法

今回のエストロゲン類の測定法で最も高感度な測定法として注目を浴びている方法でその評価が問題となっている。文献としては以下の5報が論議の中心である。

- ①Klein, K. O et al., J. Clin Invest. 94, 2475-2480(1994)
- ②Klein, K. O. et al., J. Clin Endo. Metab. 80(9), 2658-2660(1995)
- ③Coldham, N. G., et al., Environ. Health Persp. 105(7), 734-742(1997)
- ④Burdge, G. C. et al., Analyst, 123, 2585-2588(1998)
- ⑤UK:Sub-Group of the Veterinary Products Committee. p19-21(91-96)

(1) RCBAの検出限界等について

文献①のKleinの報告によると、標準血漿にE2を加えた場合の測定濃度範囲は3桁、測定感度は < 0.02 pg/mlであり、このように感度はRIAに比較して、2桁(100倍)程良い。その測定精度(バラツキ)は 2 pg/ml (CV:15%)、 0.2 pg/ml (CV:~50%)であり、選択性(交差反応)としてはE2を100%として、Estrone:0.3%, DES: < 3 %, Estriol 0.03%, Estrogen metabolite (sulfate, glucuronide): < 2 %であった。なお、文献③のColdhamらによる報告では、交差反応はこれより大きく、 17β -EST(E2)を100として、E2- 17α 5.25, Ethinyl estradiol(E2E2) 88.8, diethylstilbestrol(DES) 74.3, hexestrol(HES) 30.6, Dienestol(DIS) 25.4, Coumestrol 0.67, Genestein などであった。本法は 15 pg/ml以上の濃度でRIAとの相関係数は 0.90 ($p < 0.001$) (40人の女性血清)と高く、測定値はRCBAがやや高めの値を示した。なお、Kleinの文献②ではRCBA, RIAの相関係数は 0.79 ($p < 0.01$, $n=14$)であった。

(2) ヒト、牛血漿などにおけるRCBA, RIA測定結果の相違

測定例として、文献①の思春期前の男子、女子の血漿中のE2濃度をRCBAとRIAにより比較したところ、表2に示すようにRCBAによる測定値はRIAに比較し、極めて低い値を示した。RCBA, 及びRIAによる高い濃度では相関性あるが、低濃度領域ではRIAに比較して極めて低い値であった。同じ、Kleinによる文献②では表3に示したように女性乳ガン患者の血清中のレ

ベルについて薬剤投与(Letrozole)による変化を追跡しているが、RCBA測定値はRIAによるものと比較して23%の値と低かった。

表2 思春期前の男子、女子の血清中のエストロゲン濃度

	男子	女子
RCBA	0.08 pg/ml	0.6 pg/ml
RIA	7.5 pg/ml	~ 8 pg/ml

表3 女性乳ガン患者の血清中のエストロゲンレベル (薬剤投与後の変化)

	baseline	week-6	week-12 (pmol/L)
RCBA	7.2 ± 1.9	0.26 ± 0.11	0.48 ± 0.18
RIA	22.0 ± 5.1	2.54 ± 0.41	2.1 ± 0.33

この相違する理由として、1) RIAは低濃度でブランク、交差反応があるためである。2) 血清中に低濃度の場合、RCBAの反応を妨害する物質がある可能性がある。などが議論されているが未だ、明快な結論は出されていない。

文献③によれば文献①のKleinによる牛血漿から抽出の際、血漿：エーテル比率を(1:1)では回収率は20.6±7.3%であったという。これをエーテル比率を1:6に上昇させることで、回収率は97.1±0.7%(n=3)に上昇したという。

文献④によるラジオアイソトープを利用した実験によれば各操作の回収率は表4のように、エーテル抽出操作、150 μ lエーテル溶解操作は回収率が良好であったが、培地への溶解の回収率が31.4±4.5%という低い結果であった。また、雌牛血漿中のE2を測定する際、Helix pomatia を作用させ、抱合体を加水分解した後にRCBAにより測定すると、RIAの値及び濃度パターンに近づいたという。しかしながら、RCBA, RIAの信頼度については未だ結論はでないのが現状と考える。

表4 各操作におけるE2の回収率

エーテル抽出操作(1:6法)	97.1 ± 0.7 %
150 μ Lx2 エーテル溶解	86.1 ± 0.6 %
Mininal培地へ溶解	31.4 ± 4.5 %

(3) 相違の原因についての意見

文献⑤の英国のレポートにはRCBAとRIAのデータの相違についての様々な意見が掲載されているので参照されたい。いずれにしても結論は今後の展開に待つしかないと考える。

(4) 今後の考察

今後、この相違の原因は明らかにされるであろうが、現在はRCBA法とRIAの新たな報告を待つか、自ら証明するしかない。今後、最終的には理化学的な手法であるGC-MS/MS, LC-MS/MSなど、の情報量の多い方法を用いて確認する必要があると考える。しかし、現在のところ、この濃度

で測定できる機器及び方法は報告されていないのが現状である。

(参考文献)

エストロゲン類検出法等の主な文献リスト

[RCBA]

- (1) Klein, K.O. et al., Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *J. Clin. Invest.*, 94, 2475-2480, 1994.
- (2) Klein, K.O. et al., Use of ultrasensitive recombinant cell bioassay to measure estrogen levels in women with breast cancer receiving the aromatase inhibitor, letrozole. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism*, 80(9), 2658-2660, 1995.
- (3) Coldham, N.G. et al., Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ. Health Perspect.*, 105(7), 734-742, 1997.
- (4) Burdge, G.C. et al., Determination of estrogen concentrations in bovine plasma by a recombinant estrogen receptor-reporter gene yeast bioassay. *Analyst*, 123(12), 2585-2588, 1998.

[Two-Hybrid Assay]

- (1) Nishikawa, J. et al., New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154, 76-83, 1999.
- (2) Routledge, E. J. Sumpter, J. P., Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinants yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(3), 242-248, 1996.

[YES]

- (1) Rehmann, K. et al., Applicability of a yeast estrogen screen for the detection of estrogen-like activities in environmental samples. *Chemosphere*, 38(14), 3303-3312, 1999.
- (2) Collins, B.M. et al., The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids*, 62(4), 365-372, 1997.
- (3) Arnold, S.F. et al., Differential interaction of natural and synthetic estrogens with extracellular binding proteins in a yeast estrogen screen. *Steroids*, 61(11), 642-646, 1996.
- (4) Arnold, S.F. et al., A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.*, 104(5), 544-548, 1996.
- (5) Rehmann, K. et al., Application of a yeast estrogen screen for the detection of estrogen-like response of environmental samples. *Organohalogen Compd.*, 37, 331-335, 1998.
- (6) Graumann, K. et al., Monitoring of estrogen mimics by a recombinant

yeast assay: synergy between natural and synthetic compounds?. *Sci. Total Environ.*, 225(1.2), 69-79, 1999.

[E-screen]

- (1) Korner, W. et al., Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents, *Sci. Total Environ.*, 225(1.2), 33-48, 1999.
- (2) Soto, A.M. et al. The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.*, 103(suppl. 7), 113-122, 1995.

[他]

- (1) Balaguer, P. et al., Assessing the estrogenic and dioxin-like activities of chemicals and complex mixtures using in vitro recombinant receptor-reporter gene assays, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 74(2), 216-222, 1996.
- (2) Lutz, Ilka, et al., Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding, *Sci. Total Environ.*, 225(1.2), 49-57, 1999.
- (3) Kloas, W. et al., Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci. Total Environ.*, 225(1.2), 59-68, 1999.
- (4) Gaido, K.W. et al., Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143(1), 205-212, 1997.
- (5) Sauerwein, H. et al., Determination of estrogenically active compounds in beer and its raw materials. *Monatsschr. Brauwiss.*, 50(7/8), 142-146, 1997.
- (6) Oosterkamp, A.J. et al., Reversed-phase liquid chromatography coupled online to receptor affinity detection based on the human estrogen receptor. *Anal. Chem.*, 68(7), 1201-1206, 1996.

[RIA]

- (1) Tummon, I. et al., Precision and method bias of two assays for oestradiol: consequences for decisions in assisted reproduction. *Hum. Reprod.*, 14(5), 1175-1177, 1999.
- (2) Martinetti, A. et al., Development of a rapid and ultrasensitive RIA method for estrogen (E2, E1, E1-S) determination with selective solid phase extraction. *Int. J. Biol. Markers*, 12(3), 102-105, 1997.
- (3) Hubl, W. et al., Evaluation of automated radioimmunoassays for progesterone, estradiol, and testosterone using the RIAMat 280. *Laboratoriumsmedizin*, 21(3), 153-159, 1997.
- (4) Ono, T. et al., Serum level of estradiol measured by high sensitive RIA and gonadotropin responsiveness to LHRH in prepubertal and pubertal female. *Hormon to Rinsho*, 43(9), 911-915, 1995.

- (5) Trunet, P.F. et al., The effects of Fadrozole hydrochloride on aldosterone secretion in healthy male subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 571-576, 1992.

[ELISA]

- (1) Buscarlet, L. et al., Crosslinking of 17β -estradiol to monoclonal antibodies by direct uv irradiation: Application to an enzyme immunometric assay. *Anal. Chem.*, 71(5), 1002-1008, 1999.
- (2) Monteverdi, G.H. et al., An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocyte culture from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37(1), 62-69, 1999.
- (3) Seifert, M. et al., Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens. *Anal. Chim. Acta*, 386(3), 191-199, 1999.
- (4) Takenouchi, N. et al., Microtiter plate enzyme immunoassay for determination of estradiol- 17β in bovine plasma. *J. Reprod. Dev.*, 43(5), j9-j14, 1997.

[Chemiluminescent Immunoassay等]

- (1) Nagai, M. et al., Evaluation of hormone assay utilizing totally automated chemiluminescent immunoassay system Immulyze. *Igaku to Yakugaku*, 37(2), 479-484, 1997.
- (2) Bohm, R. et al., Determination of 17β -estradiol in assisted reproduction. Comparison of an automated chemiluminescence immunoassay with a conventional radioimmunoassay. *Clin. Lab.*, 43(10), 863-874, 1997.
- (3) Doncoine, F. et al., Analytical and clinical evaluation of the Immulite estradiol assay in serum from patients undergoing in vitro fertilization: estradiol increase in mature follicles. *Clin. Chem.*, 43(7), 1165-1171, 1997.
- (4) Legler, J. et al., Determination of dioxin- and estrogen-like activity in sediment extracts using in vitro chemical activated luciferase gene expression (CALUX) assays. *Organohalogen Compd.*, 29, 347-352, 1996.
- (5) Sato, H. et al., Competitive chemiluminescent immunoassay for estradiol using an N-functionalized acridinium ester. *J. Biolumin. Chemilumin.*, 11(1), 23-29, 1996.

[LC-MSMS, LC-MS]

- (1) Seifert, M. et al., A new concept for the bioeffects-related analysis of xenoestrogens..Hyphenation of receptor assays with LC-MS. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 363(8), 767-770, 1999.
- (2) Draisci, R. et al., Quantification of 17β -estradiol residues in bovine serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Analyst*, 123(12), 2605-2609,

1998.

- (3) Ma, Yee-Chung, et al., Determination of steroids by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8(9), 1010-1020, 1997.
- (4) Matsumura, K. et al., Advantage of application using LC/APCI-MS. *Int. Symp. Chromatogr., 35th Anniv. Res. Group. Liq. Chromatogr. Jpn.* 791-796, 1995.

[HPLC-RIA]

- (1) Hoffmann, B. et al., Determination of free and conjugated estrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 105(5), 296-303, 1997.

[GC/MS, GC-MSMS]

- (1) Daeseleire, E. et al., Validation of multi-residue methods for the detection of anabolic steroids by GC-MS in muscle tissues and urine sample from cattle. *Analyst*, 123(12), 2595-2598, 1998.
- (2) Hartmann, S. et al., Simultaneous determination of anabolic and catabolic steroid hormones in meat by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., B:Biomed. Sci. Appl.*, 704(1+2), 105-117, 1997
- (3) Casademont, G. et al., Simultaneous determination, in calf urine, of twelve anabolic agents as heptafluorobutyryl derivatives by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., B:Biomed. Sci. Appl.*, 686(2), 189-198, 1996.
- (4) Ternes, T.A. et al., Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I, investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.*, 225(1.2), 81-90, 1999.

8 EU報告書等の問題点

厚生科学研究「畜産食品中残留ホルモンのヒト健康に及ぼす影響に関する研究」 平成11年度研究報告

分担研究者：渡邊昌（東京農業大学応用生物科学部）

1998年 JECFA (The Joint Food and Agricultural Organisation/World Health Organisation expert committee on food additives) は食肉中の残留ホルモンにの安全性についてレビューし、消費者にとって安全であると結論した。しかしEUはその後の測定法の進歩や小児、とくに思春期の子供はエストロジオールに感受性が高いことを指摘し、JECFAの結論は再検討が必要であると主張している。なぜなら JECFAの安全性を出した過程にはいくつかの不確定な仮定が使われていたからである。

それに対して1999年4月30日に Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH)のレポートが出された。このレポートはカナダの Minister of Agriculture, Fisheries and Food のサブグループがおこなったEUのSCVPHレポートに対する反論である。本研究ではこの2つの報告書を中心にレビューし、問題点を評価した。

1 EUの骨子となったアンダーソンとスカケベックの論文の要旨は以下のとおりである。

(Andersson A-M, Skakkebek NE. Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. Eur J Endocrinol 1999; 140: 477-485.)

JECFA (The Joint Food and Agricultural Organisation/World Health Organisation expert committee on food additives)は1988年食肉中の残留ホルモンの安全性についてレビューし、消費者にとって安全であると結論した。しかしその後の測定法の進歩や小児、とくに思春期の子供はエストロジオールに感受性が高いことから JECFAの結論は再検討が必要である。なぜなら JECFAの安全性を出した過程にはいくつかの不確定な仮定が使われていたからである。

その結果、以下のような問題点が明らかになった。

- (1)食肉中のホルモンレベルは1970年代、1980年代のラジオイムノアッセイ(RIA)の方法が使われている。この方法は動物組織中の低レベルのホルモン量を測定するのに適当ではない。
- (2)ホルモン代謝産物も生物学的活性をもつが、この点に関してわずかな情報しかない。
- (3)健康な思春期の子供達のステロイドホルモン産生率に関する信頼できるデータがない。このことは今までのガイドラインは、疑問視される子供での産生率をもとに残留ホルモン量の許容量を決めたことになる。

(4)とても低い濃度でのエストラジオールの生物作用を無視している。
以上の諸点から、ホルモン剤を使用して飼育された食肉の人健康への悪影響をおよぼす可能性を除外することはできない。

1 Introduction

近年環境中の内分泌攪乱物質としてさまざまなものが問題になっているが、生体内ではエストラジオールは環境中のこれら物質の 10,000 倍もの活性をもつ。

米国では 50 年ほど前から家畜の飼育に性ステロイドホルモンを使用してきた。更に 3 種のより強い作用をもつ合成ホルモン、ゼラノール（エストロゲン作用）、メレンゲステロール、酢酸トレンボロン（アンドロゲン作用）が広く使われるようになってきている。前 2 者はペレットとして皮下に埋め込まれ、屠殺時まで残っている。メレンゲステロールは子牛の餌に混ぜられる。もっとも広くつかわれているのはエストロゲンでエストラジオール-17 β 、エストロジオールベンゾエイト、合成ゼラノール等である。その他のホルモン剤はエストロゲンとの組み合わせで使われることが多い。

しかし、繁殖用の雄牛にはホルモン剤は使われない。それは睾丸の発達を遅らせ、受精率を下げるからである。また繁殖をめざす heifer への使用も勧められていない。また、採乳用の動物へのホルモン剤使用は米国でも使われていない。ヨーロッパでは食肉生産にホルモン剤使用することは 1989 年以来禁止されている。

食肉生産にホルモン剤を使用して良いかどうかをきめる為に次の 3 点が明らかにされなければならない。

- ①自然の状態で飼育された動物にくらべて、性ホルモンを使用した動物組織に代謝物も含めて残留ホルモン量が有意に高いか？
- ②残留性ホルモンおよび代謝物は人の生理的レベルを上回って意味あるものか？
- ③食肉から摂取される残留ホルモンによっておきるヒトでの生物学的影響について何を知っているだろうか？

2 残留ホルモン量：

1988 年の JECFA 報告では RIA 法による値であり、多くの検体で検出限界すれすれの値であった。しかも方法により値のばらつきが大きく、信頼性にかける。JECFA の結論でもエストラジオール、エストロン、プロゲステロン、テストステロンの残留量はすべて高かった。しかし、これらレベルは妊娠 heifer よりは低かった。参考値としてしめされた値はテストステロンでは雄牛の値が、エストラジオールやプロゲステロンは妊娠中の heifer の値が使われた。

妊娠していない動物でエストロゲン値があがる意味は——妊娠が遅い雌牛はもっともホルモンレベルが高くなる。家畜にホルモンを使用することは食肉中にホルモンとして残るのみでなく、尿尿から排出される

ホルモンによって環境が汚染され、水源にも入る可能性がある。

3 ヒト、特に思春期の子どもの性ホルモン産生：

ガイドラインでは少年の場合、エストラジオールが $6 \mu\text{g}/\text{日}$ 、プロゲステロン $150 \mu\text{g}/\text{日}$ 、少女のテストステロンは $32 \mu\text{g}/\text{日}$ とされている。一日産生率 (PR) は代謝クリアランス率 (MCR : 24 時間に血漿中のホルモンが排除されるのに必要な血清の量) と血漿中のホルモン量から下記の式によって計算できる。

$$\text{PR}(\mu\text{g}/\text{day}) = \text{plasma concentration}(\mu\text{g}/\text{ml}) \times \text{MCR}(\text{ml}/\text{day})$$

健康な少年、少女のMCRに関してはいままで報告がない。アイソトープで標識したホルモンを与えるという倫理的問題もある。1960年代、1970年代には成人男女に関して少数のMCRのレポートがだされた。また、先天性副腎過形成とアンドロゲン抵抗性の2名の思春期児のテストステロンのMCRが報告された。しかしこれら病的状態のホルモン値は著しく異常であり、健康な思春期のこどもの状態を反映するものではない。JECFAの報告でPRの参考文献とされたものは上記疾患を有するものであり、健康な思春期のこどもの参考値としうるものではない。また、MCRについては成人の値を使用していると思われる。その結果少年のエストロジオールのPRとして $100 \mu\text{g}/\text{日}$ とされる(表6)。この値には疑問が多い。まずMCRは身体の大きさが関係していて、特に体表面積に比例する。成人女性にくらべ3,4歳の少女は30-50%の体表面積なのでJECFAの試算は2,3倍PRを過剰に見積もっている。また血清中の結合たん白質、主として肝における代謝酵素活性も問題である。血漿中の大部分のエストラジオールはSHBGと、またテストステロンはTeBGと結合している。フリーのステロイドホルモンがクリアランスをうけるのでMCRはSHBGに結合したホルモンの分画と反比例する。つまり、SHBGのレベルが高かったり、結合能が強いとMCRは低くなる。血漿からステロイドホルモンが肝細胞にとられるとミクロゾームでリダクターゼによって代謝される。

甲状腺ホルモンとアンドロゲンはリダクターゼ活性を高める。SHBGの低いこととあわせ、このことは男性のMCRを低くする要素である。また、子どもはSHBGが高いので体表面積で補正してもMCRは2-4倍低くなる。

思春期のこどものテストステロンとエストラジオール値は検出限界値に近いか下回る。それでも最新のデータでは思春期まで加齢とともに高くなることが発見された。このエストラジオールのPR値は $0.04 \mu\text{g}/\text{日}$ であり、いままで考えられていた値の100分の1程度である。少年におけるエストラジオールのPRが $0.04 \mu\text{g}/\text{日}$ とすると、1%の増加は $0.4\text{ng}/\text{日}$ となる。JECFAの1988年の報告では食肉のエストラジオールレベルは5-100ng/kg 無処置の肉にくらべて高いとされる。また、エストロン値も高かった。他の代謝産物も報告書にはなかったが