

C. 研究結果

成熟（65日齢）雄ラットの体重と精巣および副生殖器の重量の結果は、図表1に示している。また、それらをまとめたものが図表2である。すなわち、体重は大量投与群（平均 $250 \pm 10.0\text{g}$ ）ではコントロール群（平均 $265 \pm 29.5\text{g}$ ）に比べ、低体重傾向であったが、低量投与群（平均 $262 \pm 21.4\text{g}$ ）ではあまり変化が見られず、統計的に有意差がみとめられなかった。精巣重量は、コントロール群では左右の計が平均 $2.87 \pm 0.11\text{g}$ 、低量投与群では $2.64 \pm 0.17\text{g}$ 、大量投与群では $2.77 \pm 0.25\text{g}$ で、低量投与群がコントロール群に比し統計的有意差（ $p=0.0171$ ）を有していた。副生殖器重量も、投与群で低重量の傾向を認めたが、用量依存性や統計的有意差はなかった。

56日齢になった雌雄の仔ラット各例の青班核・各亜核（A4群とA6群）のカテコールアミンニューロンの染色結果の1例は図表3に、各例のニューロン数（左右の合計値）は、切片ごとの数字として図表4～7に、それらをまとめたものを図表8に示している。ニューロン数の計測は莫大な労力と時間を要することから本年度は各群1例ずつしかおこなえなかったため、統計的評価は不可能である。青班核（Locus ceruleus）とその副核（Locus subceruleus）を中心とするA6ニューロン群では、オスでは低量投与で増加傾向、大量投与では逆に減少、雌では減少の傾向をみとめた。しかし、青班核内でもA4群に属する領域で

はオス・メスともに暴露群で常に減少する傾向をみとめた。

D. 考察

母体摂取の Genistein の仔ラット体重への影響をみた既報の論文(1)でも、出生直後から飼料として与えた場合の影響を観た論文(2)でもともに低体重傾向を認めているので、それらはわれわれの結果を裏付けていると考える。統計的有意差は認められないものの体重への影響は少ないながらも存在する可能性がある。

男性生殖器に対する Genistein の影響は検索されていないが、ラットで Bisphenol の影響には有意差がなかったとする論文(3)、母体に Bisphenol A、Ethinylestradiol や Diethylstilbestrol を投与したところ仔マウスの男性生殖器重量が低値であったとする報告(4,5)がある。われわれの所見では、母体摂取の Genistein により成熟後の仔ラット男性生殖器、とくに精巣の重量の有意な低値をみとめたほか、統計的有意差は認められないものの大量投与群・低量投与群ともに精巣も副生殖器も低重量傾向がみとめられた。またその値に容量依存性は認められず、体重あたりの組織重量もほとんど変化がみとめられなかった。しかし生殖器は体重による影響をあまり受けない器官であるため、比較の際、体重あたり組織重量ではなく組織重量そのものを用いるのが良いと考えられるので、母体摂取の Genistein の男性生殖器重量への影響は少

ないながらも存在する可能性がある。

一方、中枢神経系の性的異型核のひとつ内側視束前野の容積を比較した既報論文(1, 6, 7)では、妊娠母胎や出生直後仔ラットへの Genistein 投与はメスの神経核容積を増大(オス化)させるが、オスの神経核容積は統計的有意差のない程度に低下(低量投与群が大量投与群に比しより大きな変化)する傾向をもつ。今回のわれわれの検索対象とした青斑核についてではないものの、これらの報告はある意味ではわれわれの結果を裏付けていると言えるかもしれない。ただし研究期間の制約から各1例ずつしかおこなえなかったため、考察することに無理があるかもしれない。青斑核に関しては、Bisphenol A, Diethylstilbestrol, Resveratrol の影響についての報告(3, 8)では、オスで容積増・メスで容積減が起こり、雌雄差が消失するか逆転するとされているが、Genistein の影響を観察した研究はこれまでおこなわれていないので、次年度以降も持続した研究をおこない、多例数をもとに正確な統計的評価をおこないたい。

脳の性差に関し、これまでの内分泌かく乱因子の影響を観察する研究が性的異型核の容積のみを指標としてきたが、近年、内分泌かく乱因子による脳内カテコールアミン含量への影響が懸念されているので、今回のわれわれの研究のように時間と労力をかけてでもカテコールアミン含有のニューロン数を指標に用いて評価することは、きわめて意義深いと考える。

(引用文献)

- 1) Levy et al, Proc Soc Exp Biol Med 208: 60-66, 1995
- 2) Lephart et al, NeuroReport 12: 3451-3455, 2001
- 3) Kubo et al, Neurosci Lett 304: 73-76, 2001
- 4) 田中ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第5回研究発表会(広島)要旨集 p.309, 2002
- 5) 荒井ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第5回研究発表会(広島)要旨集 p.306, 2002
- 6) Faber et al., Biol Reprod 45: 649-653, 1991
- 7) Faber et al., Reprod Toxicol 7: 35-39, 1993
- 8) 荒井ら, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第5回研究発表会(広島)要旨集 p.277, 2002

E. 結論

- 1) Genistein の母体摂取により、統計的有意差はないものの、仔ラットは低体重傾向を示す。
- 2) Genistein の母体摂取により、仔ラットの男性生殖器（精巣と副生殖器）は、低重量傾向を示す。
- 3) Genistein の母体摂取により、性的異型核のひとつである青班核（とくに A6 群）のカテコールアミン・ニューロン数は、オスで増加傾向に、メスで減少傾向にあるものの、統計処理には至らなかった。
- 4) 本研究は方法論的に莫大な労力と時間を要することから本年の結果だけでは単純に結論を導けないものの、Genistein はエストロゲン作用を持ち、胎児期の暴露は少ないながらも影響を受けるが、いわゆる内分泌かく乱作用は比較的少ないのではないかと推定される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし（研究初年度のため発表には至らず）

H. 知的財産権の出願・登録状況

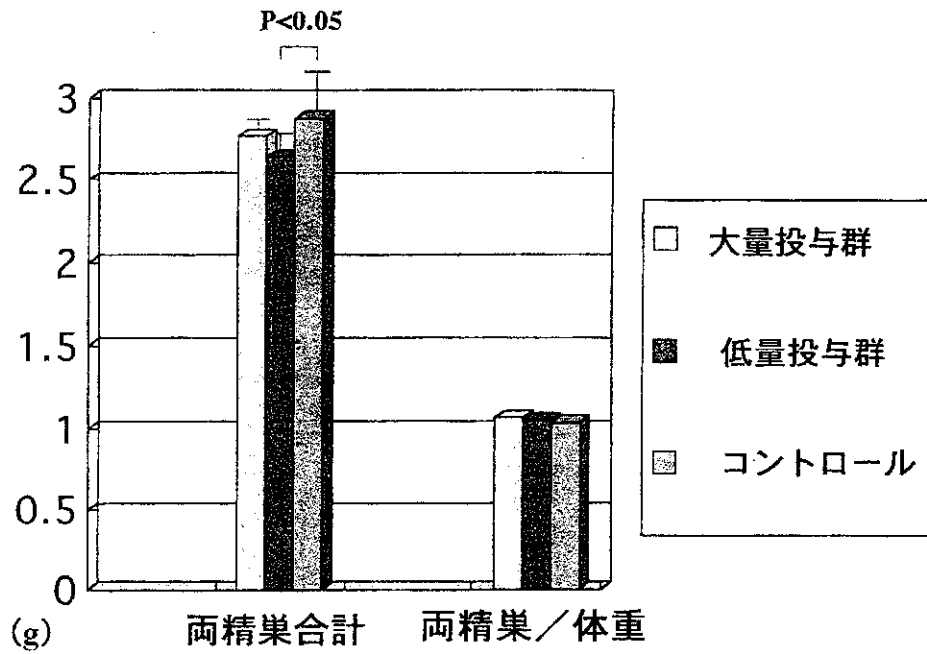
なし

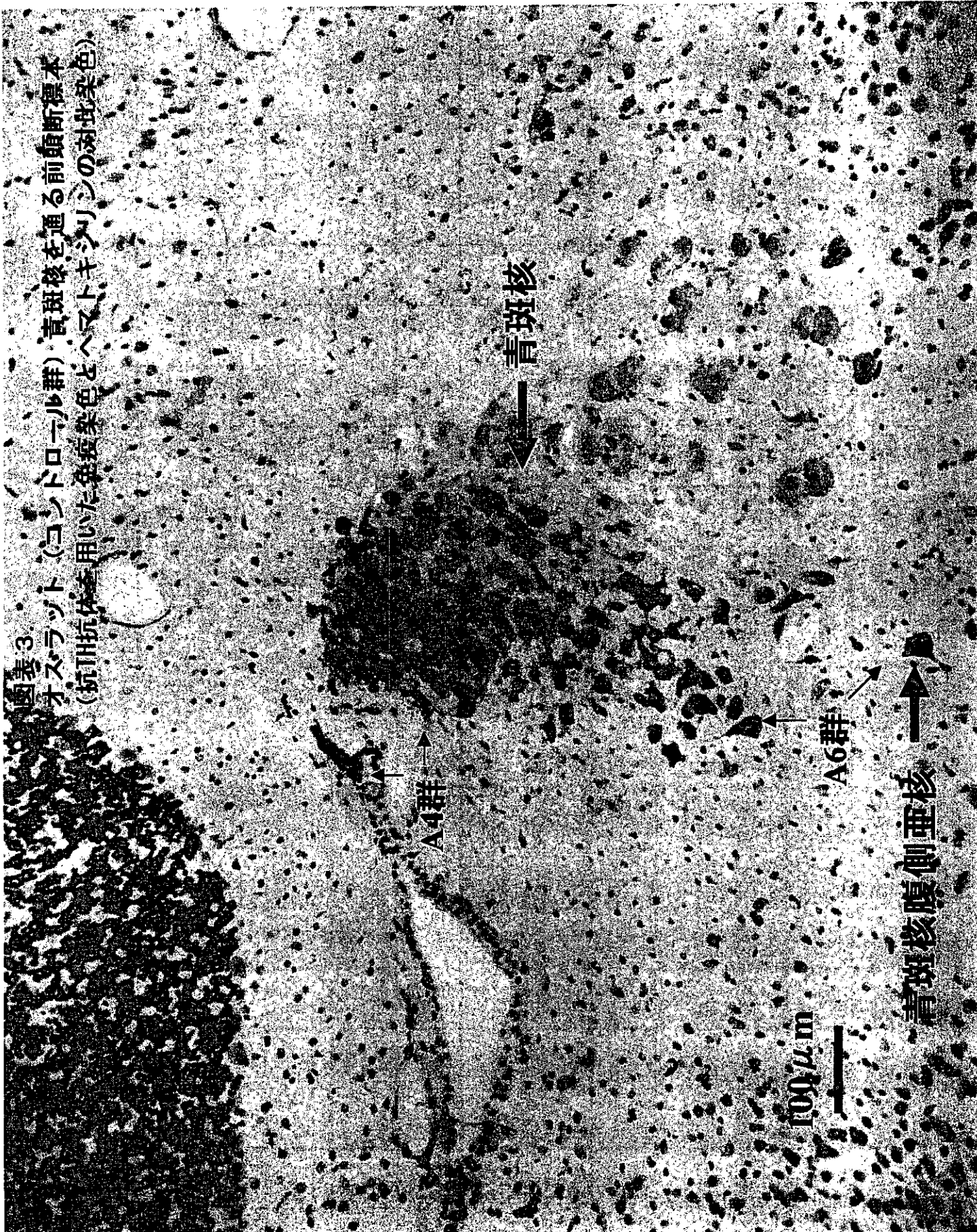
図表 1. 胎仔期 Genistein 暴露ラット(65日齢オス)の体重、精巢重量と副生殖器重量の個体別一覧

		体重 (g)	左精巢(g)	右精巢(g)	左右計A	副生殖器(g)	A/体重×100
大量投与群	a	240	1.40	1.45	2.85	2.25	1.05
	b	245	1.26	1.32	2.58	2.60	1.08
	c	245	1.30	1.35	2.65	2.28	1.20
	d	265	1.56	1.61	3.17	2.51	1.01
	e	255	1.31	1.27	2.58	2.44	1.00
低量投与群	a	280	1.38	1.43	2.81	2.50	1.06
	b	265	1.40	1.41	2.81	2.70	0.87
	c	290	1.23	1.28	2.51	2.56	1.06
	d	260	1.36	1.39	2.75	2.14	1.00
	e	250	1.27	1.24	2.51	2.22	1.07
コントロール	f	230	1.22	1.23	2.45	2.15	1.24
	a	215	1.30	1.36	2.66	2.14	1.15
	b	255	1.43	1.51	2.94	2.34	1.05
	c	275	1.41	1.48	2.89	2.33	1.04
	d	285	1.46	1.51	2.97	2.96	1.11
	e	260	1.45	1.43	2.88	2.53	0.67
	f	300	1.45	1.45	2.00	3.11	1.19

図表 2. 胎仔期 Genistein 暴露ラット(65日齢オス)の
 体重、精巣重量と副生殖器重量のまとめ
 (精巣重量に関してはグラフ化した)

	体重 平均 (g)	精巣左右合計 平均 (g)	副生殖器 平均 (g)	両精巣/体重 平均(g)
大量投与群	250.0	2.766	2.416	1.068
低量投与群	262.5	2.640	2.378	1.050
コントロール群	265.0	2.873	2.568	1.035





図表3.
オスラット (コントロール群) 青斑核を通る前頭断標本
(抗TH抗体を用いた免疫染色とヘマトキシリンの対比染色)

図表4. 各切片での青班核各亜核ごとの
カテコールアミンニューロンの数
コントロール群 56日齢オス

切片番号	LC (計)	LC のA6	LC のA4	LC外のA4	LSC
①-1	73	64	9	5	4
①-2	3	3	0	0	0
①-3	100	91	9	1	22
①-4	10	10	0	2	0
①-5	85	79	6	5	16
①-6	2	2	0	0	0
②-1	1	1	0	0	0
②-2	100	59	41	4	20
②-3	3	3	0	2	0
②-4	1	1	0	1	0
②-5	97	92	5	0	23
②-6	0	0	0	1	0
③-1	21	21	0	0	0
③-2	19	19	0	0	5
③-3	33	33	0	2	2
③-4	31	31	0	1	0
③-5	36	36	0	0	9
③-6	42	40	2	0	4
④-1	134	124	10	1	16
④-2	3	3	0	0	0
④-3	116	116	0	0	12
④-4	9	7	2	0	0
④-5	6	4	2	0	0
④-6	4	4	0	0	1
⑤-1	5	5	0	0	1
⑤-2	145	129	16	0	25
⑤-3	142	131	11	2	14
⑤-4	5	5	0	0	0
⑤-5	141	136	5	0	22
⑤-6	4	4	0	0	0
⑥-1	4	4	0	0	1
⑥-2	39	34	5	1	0
⑥-3	86	81	5	0	9
⑥-4	73	69	4	4	2
⑥-5	77	74	3	0	13
⑥-6	132	120	12	1	23
⑦-1	38	38	0	0	2
⑦-2	9	9	0	1	0
⑦-3	49	47	2	0	3
⑦-4	61	58	3	1	7
⑦-5	84	83	1	0	16
⑦-6	76	74	2	1	24
⑧-1	80	74	6	0	9
⑧-2	71	71	0	0	3

図表4. の続き

⑧-3	7	7	0	0	0
⑧-4	101	101	0	0	11
⑧-5	59	59	0	0	3
⑧-6	27	27	0	0	2
⑨-1	2	2	0	0	2
⑨-2	38	38	0	0	6
⑨-3	63	61	2	0	1
⑨-4	3	3	0	0	0
⑨-5	27	27	0	0	1
⑨-6	1	1	0	0	0
⑨-7	28	28	0	1	3
⑨-8	33	31	2	0	0
⑩-1	4	4	0	0	2
⑩-2	40	40	0	0	0
⑩-3	27	27	0	1	2
⑩-4	25	25	0	1	3
⑩-5	35	35	0	0	6
⑩-6	5	5	0	0	1
⑩-7	27	26	1	1	4
⑩-8	4	4	0	1	1
⑩-9	28	28	0	1	6
⑩-10	29	28	1	1	3
⑩-11	9	9	0	0	0
⑩-12	10	10	0	0	0
⑩-13	10	9	1	2	1
⑩-14	20	20	0	0	3
⑩-15	31	30	1	0	3
⑩-16	7	7	0	3	0
⑩-17	35	30	5	3	1
⑩-18	12	12	0	1	0
⑩-19	33	31	2	0	5
⑩-20	29	25	4	0	6
⑪-1	5	5	0	0	1
⑪-2	5	5	0	0	0
⑪-3	0	0	0	0	0
⑪-4	0	0	0	0	0
⑪-5	18	18	0	0	0
⑪-6	0	0	0	0	0
⑪-7	0	0	0	0	0
⑪-8	0	0	0	0	0
⑪-9	1	1	0	0	0
⑪-10	0	0	0	0	0
⑪-11	0	0	0	0	0
⑪-12	0	0	0	0	0
計	3088	2908	180	52	385

図表5. 各切片での青班核各亜核ごとの
カテコールアミンニューロンの数

Genistein低量 投与群 5 6 日齢オス

切片番号	LC (計)	LCのA6	LCのA4	LC外のA4	LSC
①-1	28	28	0	0	12
①-2	38	36	2	0	2
①-3	24	22	2	1	12
①-4	12	12	0	1	1
①-5	15	15	0	2	4
①-6	20	20	0	4	4
②-1	41	41	0	0	3
②-2	28	28	0	1	15
②-3	201	198	3	1	32
②-4	75	74	1	0	5
②-5	70	69	1	0	5
②-6	37	37	0	0	10
③-1	27	27	0	0	16
③-2	26	23	3	1	9
③-3	59	58	1	0	10
③-4	35	33	2	0	4
③-5	19	19	0	1	8
③-6	78	74	4	0	9
④-1	183	176	7	0	26
④-2	23	23	0	0	11
④-3	59	56	3	1	14
④-4	138	133	5	0	26
④-5	158	154	4	4	27
④-6	81	75	6	0	8
⑤-1	6	1	5	0	0
⑤-2	28	23	5	0	7
⑤-3	10	5	5	0	2
⑤-4	6	4	2	0	1
⑤-5	6	3	3	0	0
⑤-6	5	0	5	0	0
⑥-1	123	118	5	0	16
⑥-2	183	179	4	0	37
⑥-3	169	162	7	0	23
⑥-4	94	87	7	0	16
⑥-5	5	2	3	0	1
⑥-6	4	4	0	0	1
⑦-1	143	140	3	0	19
⑦-2	6	4	2	0	0
⑦-3	44	38	6	1	6
⑦-4	13	8	5	0	2
⑦-5	156	146	10	0	24
⑦-6	116	108	8	2	7
⑧-1	14	14	0	0	0
⑧-2	12	7	5	0	2
⑧-3	2	2	0	0	3

図表5. の続き

⑧-4	121	116	5	0	21
⑧-5	60	57	3	0	2
⑧-6	53	51	2	1	5
⑨-1	14	14	0	0	3
⑨-2	4	4	0	0	2
⑨-3	11	11	0	1	1
⑨-4	18	18	0	2	0
⑨-5	0	0	0	0	0
⑨-6	8	8	0	0	1
⑨-7	17	17	0	1	3
⑨-8	22	22	0	0	7
⑨-9	31	31	0	0	7
⑨-10	20	20	0	0	4
⑨-11	30	30	0	0	3
⑨-12	9	9	0	2	2
⑨-13	19	19	0	1	5
⑩-1	2	2	0	0	4
⑩-2	2	2	0	0	4
⑩-3	3	3	0	0	2
⑩-4	0	0	0	0	0
⑩-5	0	0	0	0	0
⑩-6	0	0	0	0	0
⑩-7	0	0	0	0	0
⑩-8	3	3	0	0	2
⑩-9	0	0	0	0	0
⑩-10	0	0	0	0	0
⑪-1	0	0	0	0	0
⑪-2	0	0	0	0	0
⑪-3	0	0	0	0	0
⑪-4	0	0	0	0	0
⑪-5	2	2	0	0	4
⑪-6	1	1	0	0	4
⑪-7	0	0	0	0	0
⑪-8	0	0	0	0	0
⑪-9	0	0	0	0	0
⑪-10	0	0	0	0	0
⑫-1	0	0	0	0	0
⑫-2	0	0	0	0	0
⑫-3	0	0	0	0	0
⑫-4	0	0	0	0	0
⑫-5	3	3	0	0	4
⑫-6	0	0	0	0	0
⑫-7	0	0	0	0	0
⑫-8	0	0	0	0	0
⑫-9	4	4	0	0	1
⑫-10	0	0	0	0	0
計	3077	2933	144	28	531

図表 6. 各切片での青班核各亜核ごとの
カテコールアミンニューロンの数

Genistein大量 投与群 5 6 日齢オス

切片番号	LC (計)	LC のA6	LC のA4	LC外のA4	LSC
①-1	39	33	6	0	4
①-2	33	28	5	0	4
①-3	75	70	5	0	14
①-4	83	77	6	1	10
①-5	77	72	5	1	14
①-6	45	41	4	0	5
②-1	13	13	0	0	7
②-2	0	0	0	0	0
②-3	0	0	0	0	0
③-1	17	16	1	0	7
③-2	13	13	0	0	0
③-3	19	19	0	2	4
④-1	60	60	0	0	5
④-2	2	2	0	0	0
④-3	3	3	0	0	1
④-4	1	1	0	1	0
④-5	85	77	8	3	16
④-6	102	95	7	0	17
⑤-1	55	49	6	0	13
⑤-2	24	24	0	0	1
⑤-3	6	6	0	0	0
⑤-4	94	87	7	0	15
⑤-5	95	85	10	0	9
⑤-6	50	45	5	1	6
⑥-1	90	81	9	0	5
⑥-2	3	3	0	0	0
⑥-3	11	7	4	0	1
⑥-4	5	5	0	0	1
⑥-5	26	26	0	0	3
⑥-6	88	71	17	1	10
⑦-1	7	7	0	0	2
⑦-2	52	50	2	0	5
⑦-3	7	5	2	0	0
⑦-4	99	97	2	0	7
⑦-5	11	11	0	0	1
⑦-6	12	12	0	0	5

図表 6. の続き

⑧-1	0	0	0	0	0
⑧-2	3	3	0	0	0
⑨-1	12	12	0	0	4
⑨-2	21	21	0	1	1
⑨-3	17	15	2	0	2
⑩-1	13	13	0	0	5
⑩-2	86	79	7	1	5
⑩-3	37	36	1	1	3
⑩-4	107	97	10	0	7
⑩-5	6	6	0	0	3
⑩-6	74	69	5	0	10
⑪-1	11	11	0	0	3
⑪-2	3	3	0	0	6
⑪-3	2	2	0	0	3
⑪-4	0	0	0	0	6
⑪-5	11	11	0	0	4
⑪-6	16	16	0	1	2
⑪-7	6	6	0	0	3
⑪-8	4	4	0	1	2
⑪-9	3	3	0	1	3
⑪-10	10	10	0	1	3
⑪-11	4	4	0	0	2
⑪-12	16	16	0	0	0
⑬-1	0	0	0	0	0
⑬-2	10	10	0	0	0
⑬-3	0	0	0	0	0
⑬-4	0	0	0	0	0
⑬-5	0	0	0	0	0
⑬-6	0	0	0	0	0
⑬-7	0	0	0	0	0
⑬-8	0	0	0	0	0
⑬-9	0	0	0	0	0
⑬-10	0	0	0	0	0
⑬-11	0	0	0	0	0
⑬-12	0	0	0	0	0
計	1874	1738	136	17	269

図表 7. 各切片での青班核各亜核ごとの
カテコールアミンニューロンの数

Genistein大量 投与群 5 6 日齢メス

切片番号	LC (計)	LC のA6	LC のA4	LC 外のA4	LSC
①-1	111	109	2	1	10
①-2	108	102	6	0	0
①-3	141	136	5	1	2
①-4	139	135	4	0	1
①-5	146	143	3	0	3
①-6	129	121	8	0	1
②-1	146	140	6	0	6
②-2	132	129	3	1	7
②-3	133	129	4	0	4
②-4	125	115	10	0	13
②-5	131	123	8	0	17
②-6	104	98	6	0	11
③-1	11	11	0	0	13
③-2	24	22	2	0	20
③-3	18	18	0	0	12
③-4	23	21	2	0	16
③-5	96	95	1	0	12
③-6	13	13	0	1	5
③-7	13	13	0	1	9
③-8	14	14	0	0	6
④-1	104	98	6	0	7
④-2	11	11	0	1	6
④-3	138	133	5	0	2
④-4	15	15	0	2	11
④-5	29	29	0	0	2
④-6	101	95	6	0	1
⑤-1	29	29	0	0	16
⑤-2	20	20	0	1	1
⑤-3	20	19	1	0	1
⑤-4	12	12	0	0	11
⑤-5	72	68	4	0	9
⑥-1	12	12	0	0	7
⑥-2	3	3	0	0	0
⑥-3	4	4	0	0	4
⑥-4	0	0	0	0	0
⑥-5	2	2	0	0	3
⑥-6	5	5	0	0	3
⑥-7	0	0	0	0	0
⑥-8	0	0	0	0	0
⑥-9	2	2	0	0	0
⑥-10	0	0	0	0	0
計	2336	2244	92	9	252

図表 8.

青斑核各亜核における (TH抗体・免疫染色陽性の) カテコールアミンニューロン数

	56日齢 オス コントロール群	56日齢 オス 低量投与群	56日齢 オス 大量投与群	56日齢 メス 大量投与群
青斑核 (LC) 全体	3088	3077	1874	2336
(大型) A6	2908	2933	1738	2244
(扁平) A4	180	144	136	92
第4脳室底上衣下領域				
LC外のA4	52	28	17	9
青斑核腹側亜核 (LSC)A6	385	531	269	252

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金(食品・化学物質安全総合研究事業)
分担研究報告書

内分泌かく乱物質と大豆等既存食品の発育・癌化及び内分泌かく乱作用の比較

内分泌かく乱物質の高速液体クロマトグラフ (HPLC) による
高感度分析法の確立

分担研究者	今井俊介	奈良県保健環境研究センター所長
協力研究者	北田善三	同上 食品担当統括主任研究員
協力研究者	大前壽子	同上 食品担当主任研究員

研究要旨

内分泌かく乱作用を有することが知られている Bisphenol A (BPA)、Genistein、Resveratrol について、単独あるいは複合効果を実験動物における周生期暴露実験で解明するため、これら 3 物質の乳汁中の高速液体クロマトグラフ (HPLC) による高感度分析法を開発した。検出器としてアンペロメトリック型電気化学検出器(ECD)を、カラムとして逆相分配系の Inertsil ODS-3V を、移動相として 0.025M リン酸一カリウム溶液-メタノール(52 : 48, v/v)を用いたとき、3 物質が良好に分離した。乳からの 3 物質の抽出にはメタノールを用い、精製には逆相分配とイオン交換を組み合わせた固相抽出カートリッジを用いた。また、Resveratrol が操作中に光を受けて立体異性化を起こすことから、異性化率を一定にするために分析前に蛍光灯を 2 時間照射した。市販牛乳に標準品を 20ppb 濃度添加したときの 3 物質の回収率は、67.7~85.0%であった。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質は成体においては可逆的に作用するが、機能・形態形成期では不可逆的に作用し、重大な結果を招く恐れがあることから、特に胎児及び新生児・乳幼児暴露の状況とその影響の可能性に関心が寄せられている。そこで、内分泌かく乱作用を有することが知られている BPA、Genistein 及び Resveratrol の 3 物質について、単独あるいは複合影響を調べることを目的に、乳汁中の 3 物質の高感度分析法を検討した。

これまでの報告ではヒトや実験動物の血液の分析例^{1)~5)}はあるが、乳汁の分析例は見られない。そこで、これら 3 物質がフェノール性水酸基を有することよ

り、分析操作が容易でフェノール性化合物に選択性の高い HPLC-ECD を用い、乳汁中の 3 物質の高感度一斉分析法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 試薬及び器具

BPA は和光純薬工業社製環境分析用を、Genistein 及び Resveratrol は東京化成工業社製を用いた。

リン酸二水素カリウムは和光純薬工業社製特級を、メタノールは和光純薬工業社製 HPLC 用を用いた。アセトンは和光純薬工業社製特級及び残留農薬試験用 300 を用いた。水は MilliQ 水を用いたが、検体の処理に使用する水は、さらに Waters

社製固相抽出カートリッジ OASIS HLB (500 mg/12ml) で処理した。

標準溶液：各標準品 10mg を精秤し、メタノールに溶解して標準原液を調製し、これを 50%メタノール溶液で適宜希釈して標準溶液とした。

固相抽出用のカートリッジは、Internation Solvent Technology Ltd. 製 ISOLU-TE Multimode カートリッジ (500 mg/3ml)、Waters 社製 OASIS HLB (60mg /3ml)及び Varian 社製 Bond Elut C18(500 mg/6ml)を用いた。固相抽出操作には、GL Sciences 社製 SPE マニホールドを用いた。ガラス器具は、洗剤とイオン交換水で洗浄した後、使用前にアセトンで洗浄し、150℃で乾燥させ、蓋付ステンレス製容器に保管して使用した。

2. 装置

HPLC は島津製作所製 LC-6A、ECD は医理化工業社製 E-502、データ処理器は島津製作所製クロマトパック C-R7A を用いた。遠心分離器は久保田製作所社製 KC-70 型を、蛍光灯スタンドは市販の 27W 蛍光管のものを使用した。

3. HPLC 条件

カラム：GL Sciences 社製 Inertsil ODS-3V(4.6×150mm)、カラム温度：40℃、流速；0.8ml/min、移動相：0.025M リン酸一カリウム溶液-メタノール (52：48、v/v)、印加電圧：+850mV vs Ag/AgCl、注入量：50ul。

4. 試験溶液の調製

乳 0.5g にメタノール 2ml を加え、攪拌、静置後、3,000rpm で 5 分間遠心分離し、上澄液を採取した。残さに少量の水を加えて軽く攪拌し、上澄液を先の上澄液に合わせ、メタノール濃度が 20%以下となるように水で希釈した。この液を、あらかじめメタノール 15ml 及び水 5ml でコンディショニングした ISOLUTE Multimode カートリッジに負

荷し、水 5ml 及び 25%メタノール溶液 3ml で洗浄後、メタノール 3ml で溶出した。この溶出液を窒素気流下で溶媒留去し、50%メタノール溶液を加えて全量 1ml とした後、蛍光灯を 2 時間照射し、これを HPLC 試験溶液とした。

C. 研究結果

1. HPLC 条件の検討

今回測定対象とした 3 物質がいずれもフェノール性の水酸基を有することから、検出器として ECD を用いたところ、紫外外部吸収検出器(UVD)や蛍光検出器(FLD)に比較して高感度分析が可能となった。

HPLC のカラムとして逆相分配系の Inertsil ODS-3V を、移動相としてリン酸一カリウム溶液-メタノールの系を用い、3 物質の分離条件を検討した。リン酸一カリウムの濃度とピーク面積との関係を図 1 に示したが、0.025M 以上でほぼ一定になったため、リン酸一カリウムの濃度を 0.025M とした。また、メタノール濃度は 48%としたとき 3 物質が良好に分離した。

次に、ECD の印加電圧とピーク面積の関係を求めたところ、図 2 に示したように 3 物質とも電圧の上昇につれてピーク面積も大きくなったが、もっとも面積の小さい BPA の面積が、+850mV vs Ag/AgCl でほぼ平衡に達したため印加電圧を +850mV vs Ag/AgCl とした。

以上の条件における標準溶液の検出限界 (S/N=3)は、50ul 注入で 0.2ng/ml(10pg)であった。また、0.2ng/ml から 100ng/ml の範囲で検量線を求めたところ、図 3 に示したように 3 物質とも良好な直線性が得られた。

2. 試験溶液調製方法の検討

乳からの 3 物質の抽出には、除蛋白効果も兼ねてメタノールを 80%濃度となるように試料に加え、遠心分離で得られた上澄液を固相抽出カートリッジに負荷し、水及び 25%メタノール溶液で洗浄後、メタノールで溶出する方法を検討した。固相抽出カートリッジとしてシリカ系逆相

分配の Bond Elut C18、ポリマー系逆相分配の OASIS HLB、及びシリカ系で逆相分配とイオン交換を組み合わせた ISOLUTE Multimode の 3 種類のカートリッジを検討した。その結果、シリカ系逆相分配及びポリマー系逆相分配はともに高極性部の精製効果が悪く、特に Resveratrol が乳成分の妨害を受けた。従って、本研究では逆相分配とイオン交換を組み合わせた ISOLUTE Multimode カートリッジを用いることとした。図 4 に 3 物質のカートリッジからの溶出パターンを示したが、25%メタノール溶液 3 ml までは 3 成分とも全く溶出せず、4ml 目から Resveratrol がわずかに溶出し始めたため、洗浄は 25%メタノール溶液 3ml とした。また、メタノールでの溶出を試みたところ BPA と Resveratrol が 3ml でほぼ定量的に溶出したのに対し、Genistein が 4ml 以降も少しずつ溶出したが、同時に乳中の成分も溶出するため、溶出はメタノール 3ml とした。

Resveratrol が操作中に光を受けて図 5 に示したように *trans* 体から *cis* 体への立体異性化を起し、その変化の割合が標準品と試料とで異なり分析に支障を来すため、一定時間強制的に光を照射し *cis* 体に変換した後分析する方法を検討した。光源として卓上型の蛍光灯スタンドを、照射時期を HPLC 注入直前とし照度約 15,000LUX の条件で *trans* 体と *cis* 体の量的変化を調べたところ、図 6 に示したように 2 時間で異性化率がほぼ一定になったため、照射時間は 2 時間とした。分析フローを図 7 に示した。

また、大豆中には Genistein 以外にもいくつかのイソフラボンが含まれており、ヒトの生体試料から Genistein の他に Daidzein 及び Glycitein を検出した報告⁸⁾がある。そこで、Daidzein 及び Glycitein が 3 物質の定量を妨害するか否かを調べるために、5 物質の分

離条件を検討した。図 8 及び図 9 に Daidzein 及び Glycitein を含む 5 物質のクロマトグラムと牛乳から得た試験溶液のクロマトグラムを示したが、標準 5 物質は、Daidzein と Glycitein が多少重なる以外は良好な分離を示した。一方、試験溶液では Daidzein の位置に牛乳由来のピークが検出された以外は妨害がみられなかった。

3. 添加回収

市販牛乳に標準品を添加したときの回収率を表 1 に示したが、20ppb 濃度で 67.7%~85.0%、2ppb 濃度で 64.8%~105%であった。

D. 考察

1. HPLC 条件の検討

今回測定対象とした 3 物質のようにフェノール性の水酸基を有する物質を HPLC で測定する際、高感度を確保するために一般に検出器として ECD が用いられる。井上らは、HPLC による生体試料中の BPA の高感度分析としてクーロメトリック型 ECD、UVD 及び FLD を比較し、ECD が UVD の 3,000 倍、FLD の 200 倍高感度であったと報告している¹⁾。しかし、生体試料の分析にはアンペロメトリック型 ECDの方が広く普及しており、電極のメンテナンスが容易であることから、検出器としてアンペロメトリック型 ECD を用いた。ECD の印加電圧は高いほどピーク面積も大きくなるが、同時に乳成分のピークも大きくなる。そこで、3 物質の中でもっとも感度の悪い BPA のピーク面積がほぼ平衡に達する +850mV vs Ag/AgCl を印加電圧として用いた。

HPLC の移動相として、当初リン酸一カリウム溶液-アセトニトリルの系を用いて検討したところ、Resveratrol が Genistein と同様の大豆イソフラボン化合物である Daidzein 及び Glycitein の妨害を受けた。そこで、アセトニトリルに換えてメタノールを用いたところ Daidzein、Glycitein を含む 5 物質は良好に分離した。

2. 試験溶液調製方法の検討

げっし目動物乳中には 10%近い蛋白質が含まれており⁶⁾、3物質の回収率の低下や分析を妨害する可能性が考えられるため除蛋白を検討した。除蛋白法として一般に酸や塩、アセトニトリル、アルコールなどを用いる方法が知られているが、本研究では抽出後の精製処理と HPLC 移動相条件を考慮してメタノールを用いた。

固相抽出カートリッジによる精製の際にも用いる有機溶媒としてアセトニトリルについても検討を行ったが、メタノールに比べて溶出力が強く、わずかな濃度変化で目的物質が溶出し、妨害成分との分離溶出が困難であった。

また、**stilbene** 骨格を持つ **Resveratrol** が操作中に光を受けて直ちに *trans* 体から *cis* 体への立体異性化を起こすことが知られており、極力光を避けて迅速に分析することが行われている⁷⁾。しかし、本研究においてその変化の割合が標準品と試料とで異なり測定に支障を来したため、蛍光灯を照射し強制的に *cis* 体に変換した後測定する方法を採用した。

次に、分析法を開発するに当たって問題となったのが **BPA** のコンタミである。原因として使用する薬品や器具などあらゆる可能性が考えられた。そこで、厚生労働省による食品中の内分泌かく乱化学物質分析ガイドライン⁸⁾ に準拠し、ガラス器具類はアセトンで洗浄し、薬品は可能な限りコンタミの少ないものを選んだ。水についても Milli Q 水を用いたが、約 0.02ppb の汚染が判明したため、ポリマー系逆相分配の **OASIS HLB** カートリッジによる **BPA** の除去を検討した。すなわち、1カートリッジで 1 L 通水処理し、その 50ml を、あらかじめメタノール 15ml で洗浄した **ISOLUTE Multimode** カートリッジに負荷、メタノール 3ml で溶出し、**BPA** 濃度を求めたところ、表 1 に示し

たように約 0.004ppb まで汚染を減らすことが出来た。なお、処理水は作成毎に汚染のチェックを行った。

E. 結論

内分泌かく乱作用を有することが知られている **BPA**、**Genistein** 及び **Resveratrol** について、単独あるいは複合効果を実験動物における周生期暴露実験で解明するため、これら 3 物質の乳汁中の HPLC による高感度分析法の検討を行った。

HPLC は、検出器として高感度検出が得られる **ECD** を、カラムとして逆相分配系の **Inertsil ODS-3V** を、移動相として 0.025M リン酸一カリウム溶液-メタノール(52:48, v/v)を用いたとき、3物質が良好に分離した。

乳からの 3 物質の抽出には、除蛋白も兼ねてメタノールを用い、精製は逆相分配とイオン交換を組み合わせた **ISOLUTE Multimode** カートリッジを用いたとき、良好な精製効果が得られた。また、**stilbene** 骨格を持つ **Resveratrol** が操作中に光を受けて立体異性化を起こすことから、分析前に蛍光灯を 2 時間照射することにより **Resveratrol** を定量的に測定することが出来た。

市販牛乳に標準品を 20ppb 濃度添加したところ、67.7~85.0%の回収率が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 参考文献

- 1) K.Inoue et al., J.Chromatogr. B, 749, 17-23. (2000)
- 2) J.Sajiki et al., J. Chromatogr. B, 736,

- 255-261 (1999)
- 3) Y.Zhu et al., J. Chromatogr. B, 740, 129-133 (2000)
 - 4) M.Emilia Juan et al.,Anal.Chem. 71, 747-750. (1999)
 - 5) 牧野恒久,平成 11 年度厚生科学研究費補助金 (生活安全総合研究事業) 研究成果報告書,131-144
 - 6) 日本薬学会編 : 乳製品試験法・注解, 金原出版, (1999) p15
 - 7) M.Sato et al., Biosci. Biotech. Biochem., 61, 1800-1805 (1997)
 - 8) 厚生労働省医薬局化学物質安全対策室 : 内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会中間報告書追補, (2001.12.26)

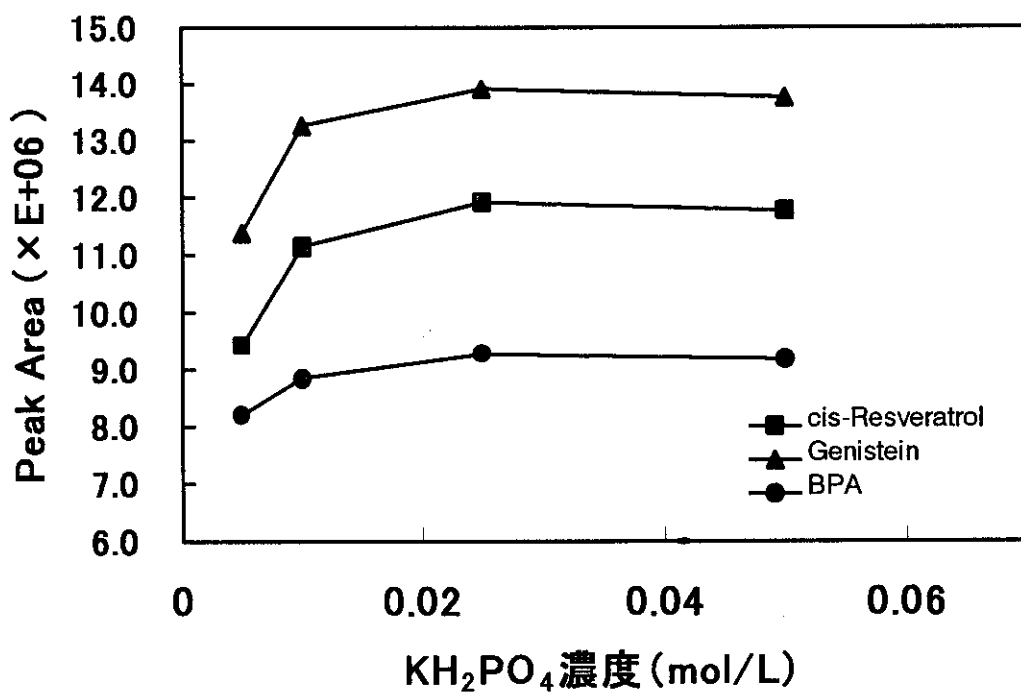


図 1. 移動相塩濃度とピーク面積

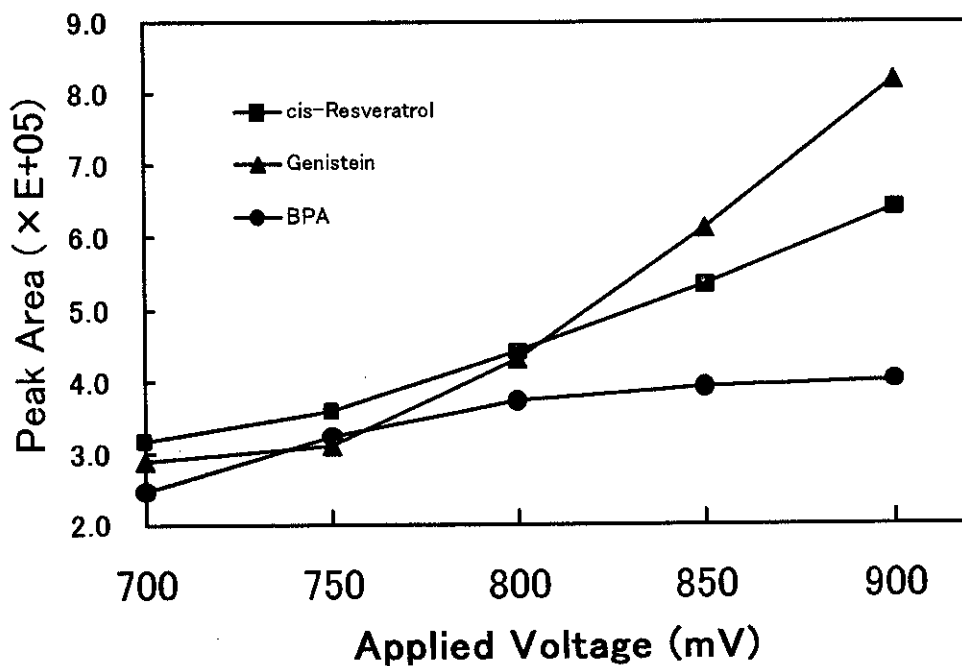


図 2. 印加電圧とピーク面積