

図 3. 検量線

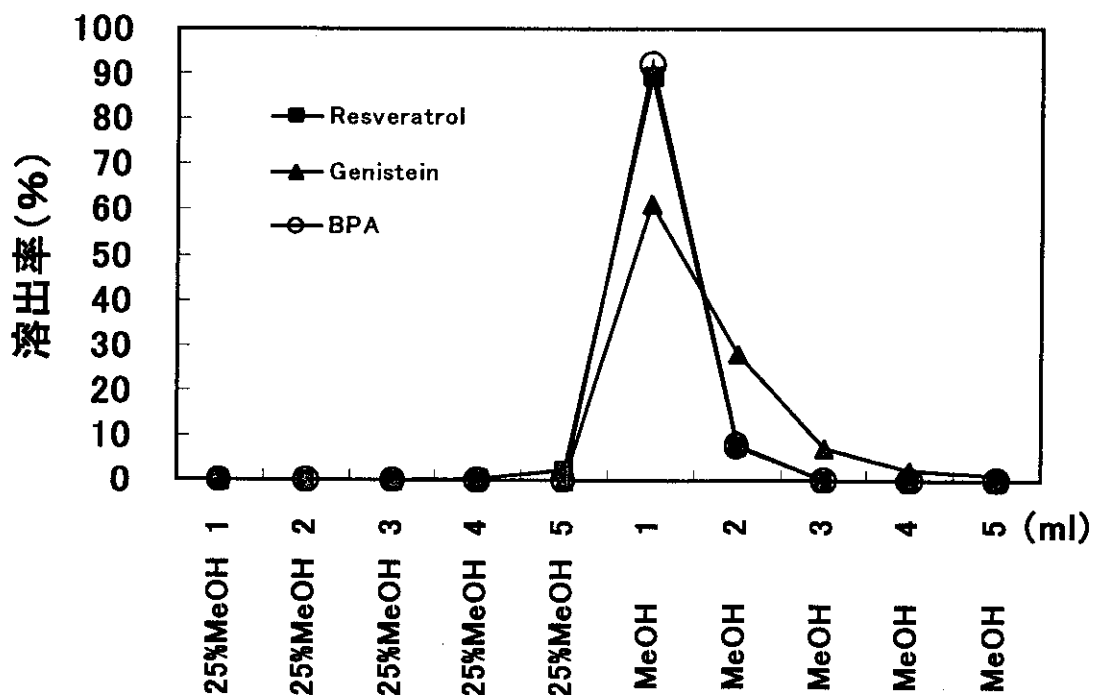


図 4. ISOLUTE Multimode カートリッジからの溶出パターン

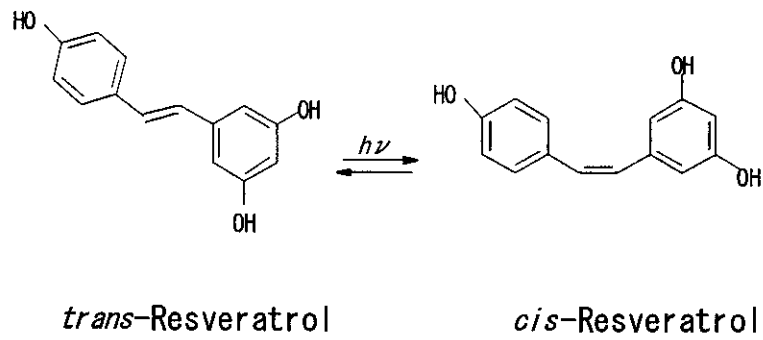


図 5. Resveratrol の光による立体異性化

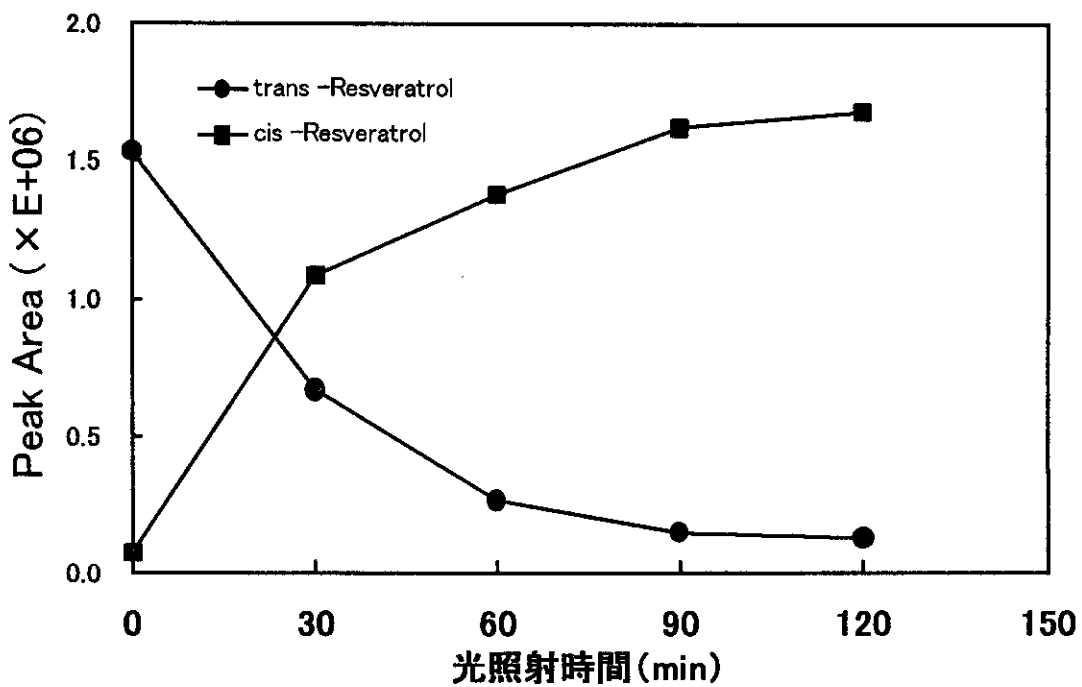


図 6. *trans*-Resveratrol の光照射によるピーク面積の変化

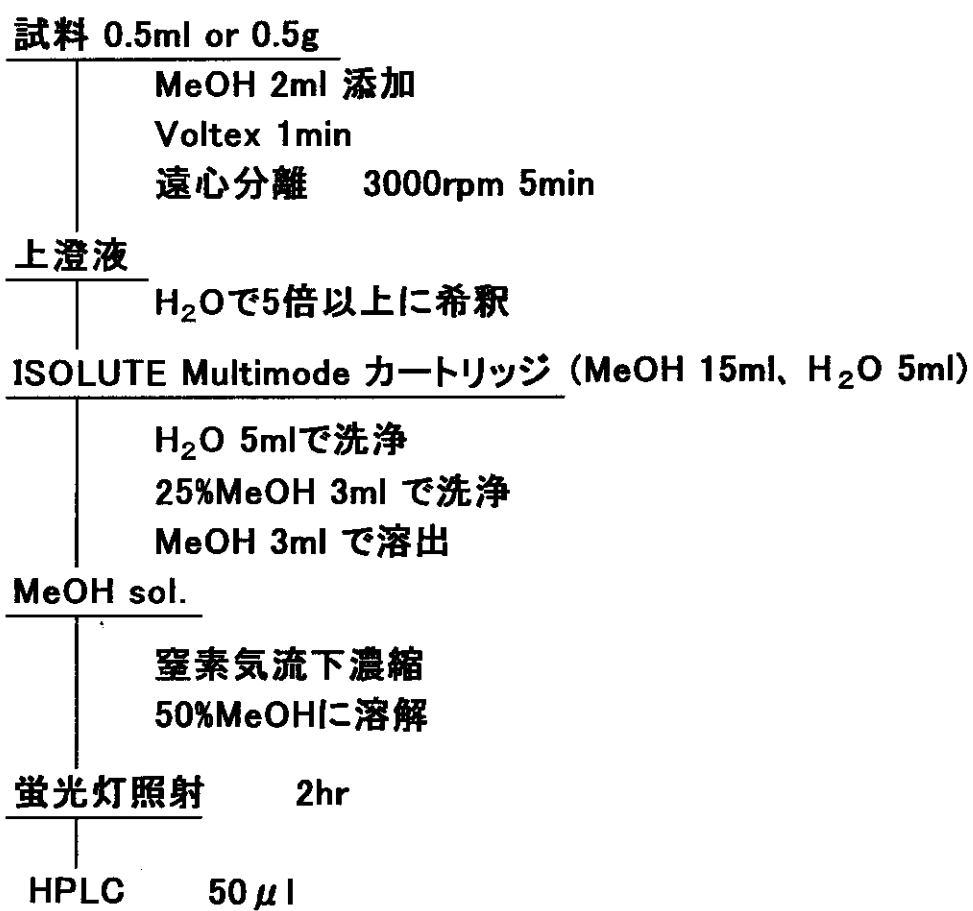


図7. 分析フロー

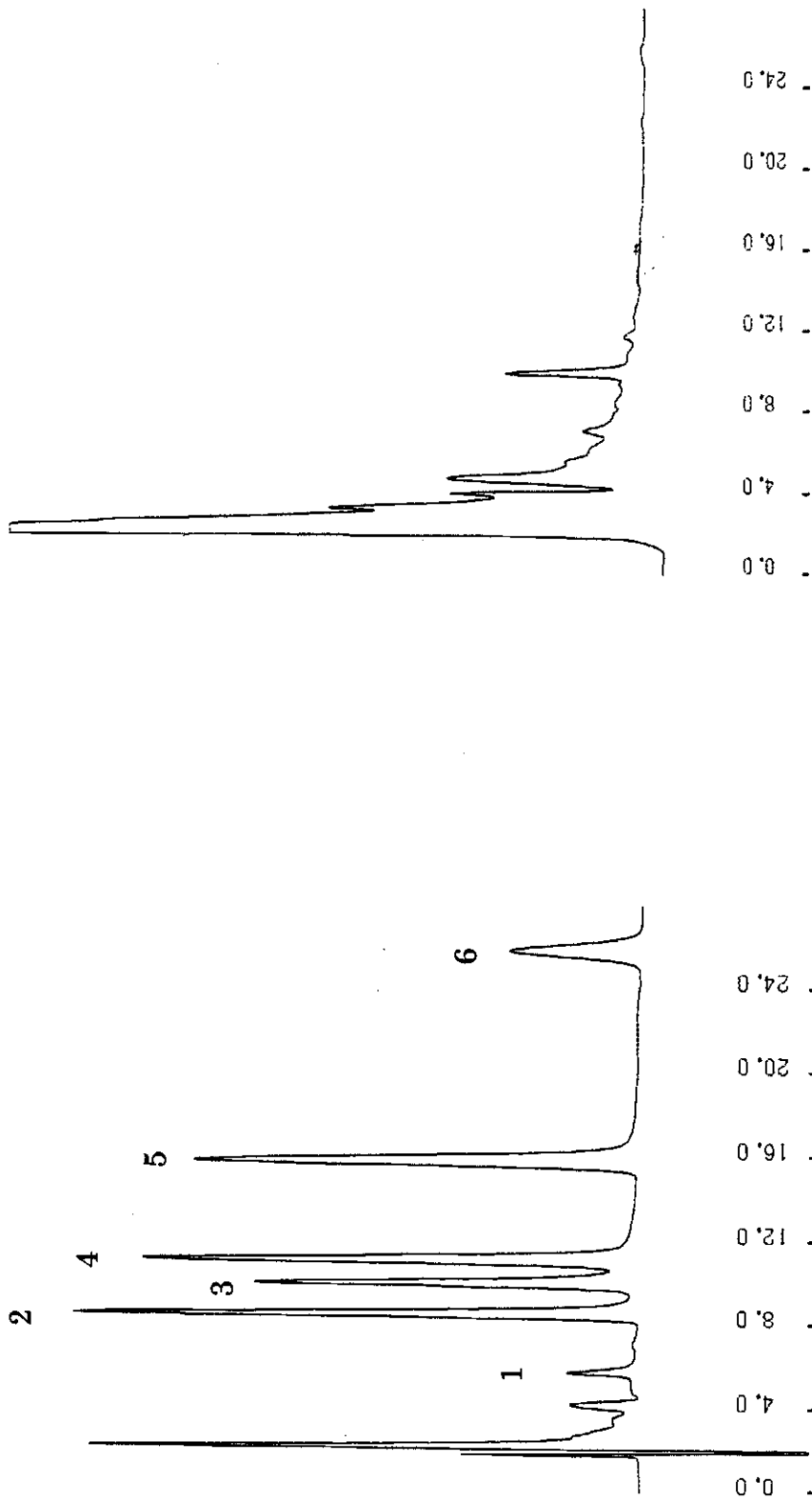


図8. 標準溶液のクロマトグラム

1: *trans*-Resveratrol, 2: *cis*-Resveratrol, 3: Daidzein,
4: Glycitein, 5: Genistein, 6: BPA (各 10ng/ml)

図9. 牛乳のクロマトグラム

表1. 固相抽出カートリッジ処理によるMilliQ水のBPA濃度

	BPA (ng/ml)		
MilliQ水	0.0189	±	0.0046
OASIS HLB処理水	0.0038	±	0.0011
平均値±標準偏差 (n=3)			

表2. 牛乳への添加回収実験結果

添加量(ng/ml)	回収率(%) (CV %)		n=3
	Resveratrol	Genistein	BPA
20	68.4 (4.5)	67.7 (5.9)	85.0 (9.9)
2	64.8 (6.2)	69.4 (6.4)	105.0 (22.8)

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

輸入果実に使用されている防カビ剤の実際

分担研究者 西山利正 関西医科大学公衆衛生学講座 教授
研究協力者 佐々木真理 関西医科大学公衆衛生学講座 院生
神田靖士 関西医科大学公衆衛生学講座 助手
福永健治 関西医科大学公衆衛生学講座 助教授

研究要旨

輸入オレンジやレモンなどの柑橘系果物の表面にはワックスとともに OPP (オルト・フェニル・フェノール) などの防かび剤が塗布されている。OPP の毒性についてはこれまでに実験動物を用いた研究で、膀胱、腎臓に対する発ガン性、障害性が指摘されている。しかし、ヒトの日常的摂取量、頻度では、発ガンに寄与することは事実上ないと考える。一方、フェノール系化学物質には内分泌攪乱物質（環境ホルモン）であるものが多いことから、OPP についても内分泌攪乱作用が危惧されている。そこで、本研究では柑橘系果物に使用されている OPP のほか DP（ジフェニール）、TBZ（チアベンダゾール）を対象に実際の使用状況を調査した。

A. 研究目的

食品あるいは容器、包装資材由来で内分泌攪乱活性が確認されているものは一部のフェノール類であり、フェノール類すべてが活性を有するわけではない。しかし、微量でも複数の内分泌攪乱物質を摂取した場合、生体内で代謝され、相乗的に作用し、内分泌攪乱活性がどのように修飾されるかは未知である。また、OPP は環境ホルモンとしての疑いがあるとき

れ、書籍、テレビ番組、インターネットなど各種メディアを通して科学的根拠、実証が無いままに危険視され、市民の食生活に対する不安を煽っている。したがって OPP をはじめとする防カビ剤使用の実体を把握しておくことは、非常に重要である。そこで本研究では、市場に流通する柑橘系果物を対象に実際の使用状況を把握することを目的に調査、分析を行った。

B. 研究方法

分析対象試料

大阪市、守口市、京都市および京都府久御山町のスーパーマーケットで購入したレモン（8 商品）、オレンジ（8 商品）、グレープフルーツ（4 商品）の 3 種、16 品を対象とした。OPP（オルトフェニルフェノール）、DP（ジフェニール）、TBZ

（チアベンダゾール）の 3 項目について、外果皮と果肉に分けて行った。定量は、蛍光検出逆高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて行った。以下に HPLC に供する分析試料調製法を示す。

試料 20g

+ 酢酸ナトリウム 2g+ 無水硫酸ナトリウム 30g

ブレンダーでホモジネート

↓

+ 酢酸エチル 80ml

密栓をして冷暗所で一晩放置

↓

遠心分離（200rpm, 5min）

上層を分取①

↓

下層に酢酸エチル 80ml を加え攪拌後、遠心分離（200rpm, 5min）

上層を分取②

↓

上層①、②を合一して 1-ブタノール 1ml を加え減圧濃縮、HPLC 移動相を加え、全量を 20ml とし、0.45 μ m フィルターでろ過後 HPLC に供する。

次に HPLC 分析装置および条件を示す。

Pump	: CCP multi pump (Tosoh)
Fluorescence detector	: (Ykogawa)
Data processor	: CR6A Chromatopac (Shimadzu)
Column	: Inert Sil ODS80A (250×4.6mm) (GL Sciences)
Mobile phase	: AcCN:H ₂ O=7:3 (TFA, pH2.4)
Flow rate	: 1.0 ml/min
Temperature	: Ambient
Detection	: λ Ex=270nm, λ Em=330nm

C. 結果および考察

移動相を酸性にしないと TBZ の蛍光発光強度が低いためトリフルオロ酢酸を添加し、pH を 2.4 に調整して用いた。その後の検討で、カラム内径が 2.1mm、充填剤粒子径 3 μm のセミマイクロカラムを用い、移動相の水を 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH3.0 に変更することで検出限界を上記条件の約 1/10 にすることが可能であった。

上記条件で測定した標準品のクロマトグラム、オレンジおよびレモンを分析したクロマトグラムを図1および2に示す。

次にレモン (8 商品)、オレンジ (8 商品)、グレープフルーツ (4 商品) の 3 種、16 品を分析した結果を表 1 および 2 に示す。表 1 からわかる通り、DP はオ

レンジ、レモンおよびグレープフルーツいずれからも検出されなかった。OPP はグレープフルーツから検出されなかった。また、オレンジ、レモンそれぞれ一検体から OPP、TBZ 両方が検出された。市販の柑橘類からは表 3 に示した基準値 (残留量) 以下ではあるが無視できないレベルで防かび剤が検出された。

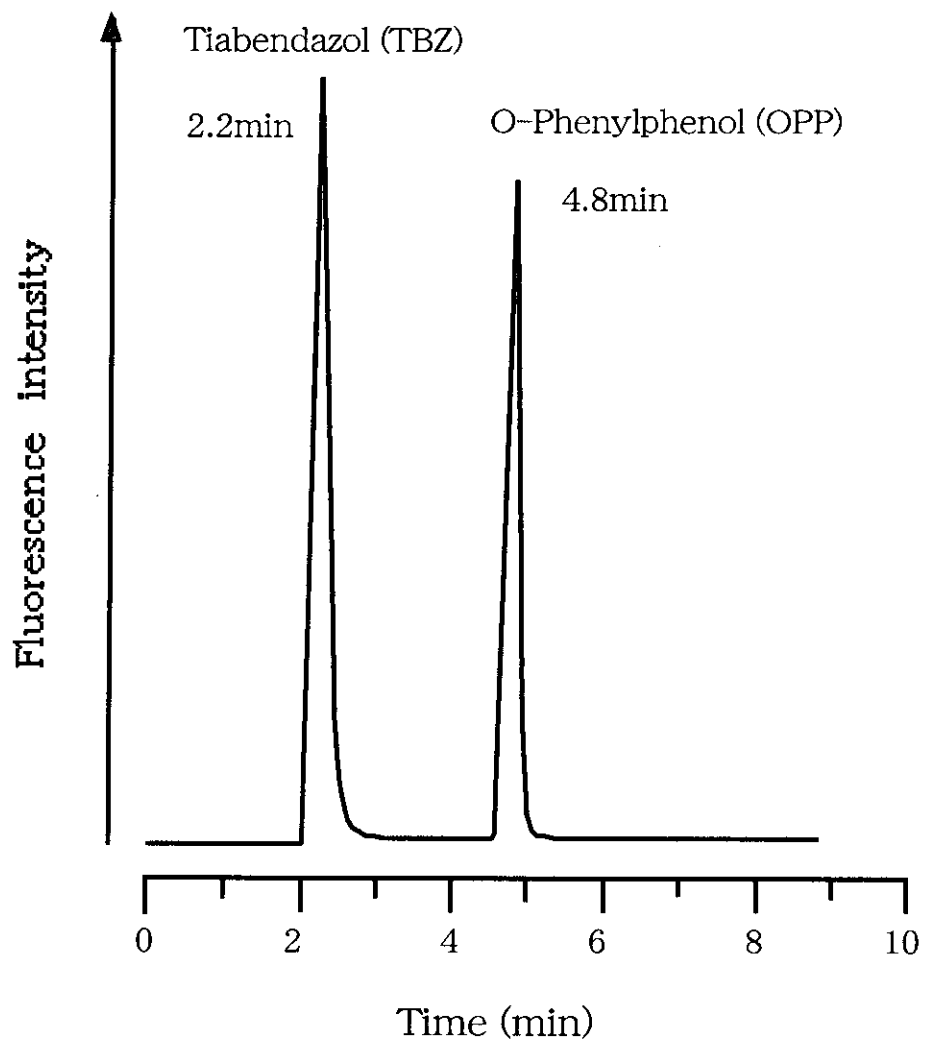


図1 OPP および TBZ 標準品のクロマトグラム

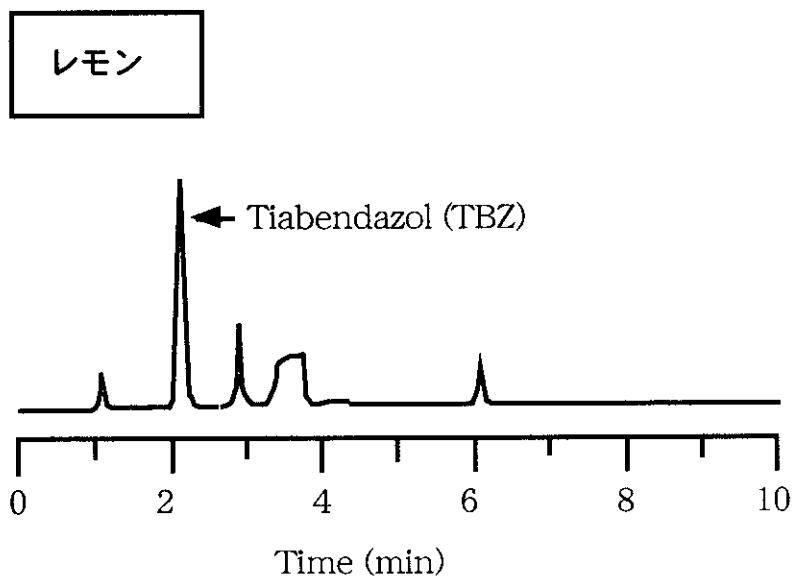
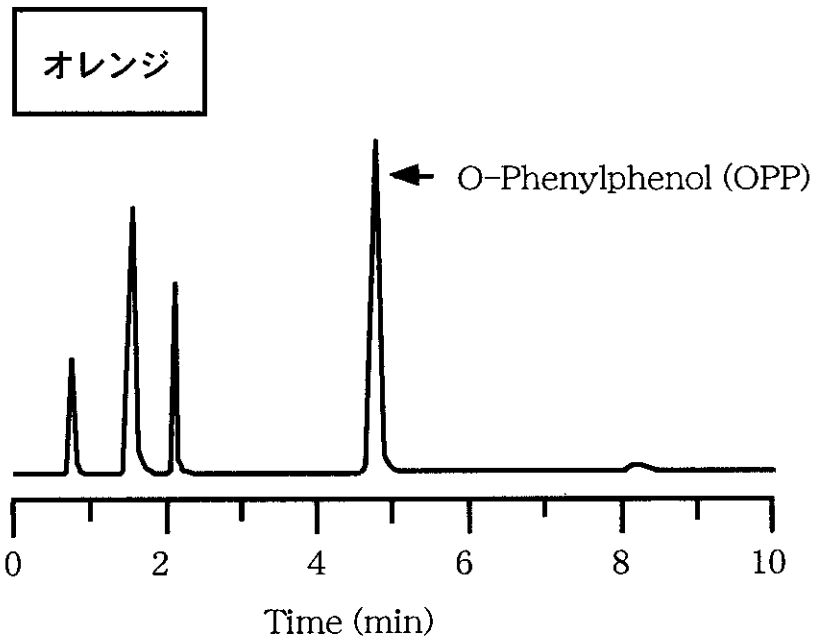


図2 オレンジおよびレモン中の OPP、TBZ のクロマトグラム

試料調製の問題点と分析対象部分について

柑橘類は有機酸、糖類を多量に含有するため、果実全体を分析対象とした場合、抽出操作時に酢酸エチル層へ相当量の有機酸、糖類が混入する。添加回収試験を行ったところ、定量分析に負に影響することが判明した。とくに検出限界付近では定量的検出が不可能に近く、分析精度に影響があると判断せざるを得なかった。また、試料の固相抽出などによる前処理は有機酸、糖分の除去を可能とするが、煩雑な操作が必要であるためルーチン分析には不適切と考える。そこで果実を外果皮および果肉に分別して、定量したところ果肉には OPP、TBZ ともに検出されなかったため、果肉を除いた部分、すなわち外果皮を試料とするのが適当と判断して定量分析を行った。

外果皮と果肉の分別定量

前述のように外果皮を除去し、残った部分を果肉としたとき、果肉にはいずれの防カビ剤も残留しないことが判明した。外果皮と果肉は通常の可食部、すなわち皮をむいて残った部分を果肉とした。果肉にはいずれの防カビ剤も残留しないことがわかった。外果皮については、最外皮（着色している部分）とその内側の白い部分に分別したが、レモン、オレンジについては最外皮にのみ OPP が残留することが分かった。TBZ はグレープフルー

ツで最外皮のみならずその内側の白い部分にも約 20%程度が分布していることが分かった。これはグレープフルーツの最外皮が比較的薄く、浸透性が高いためと予想できる。オレンジについては最外皮のみから検出できた。

洗浄による防かび剤の除去効果

OPP を対象に中性洗剤による洗浄効果を検討した。洗浄は中性洗剤水溶液に浸漬し、食器洗浄用スポンジでブラッシングした。その結果、市販品のレモンおよびオレンジの OPP は検出限界以下にであった。冷水浸漬（1 時間）による洗浄効果はほとんど認められなかった（99%以上残存）。これは、製造、加工条件によっては、マーマレードや果皮を用いた菓子類などに防カビ剤が混入することを示すものである。一方、温水浸漬（約 80 度、1 時間）では、約 40%の減少が確認できた。これは、直接柑橘類の果皮を摂取しなくても、紅茶にスライスレモンを入れたりすることで摂取することを示している。

表1 レモン、オレンジおよびグレープフルーツ中の OPP, TBZ 検出数

		OPP	TBZ	OPP+TBZ	N. D.
オレンジ	(n=8)	4/8	1/8	1/8	2/8
レモン	(n=8)	2/8	2/8	1/8	3/8
グレープフルーツ	(n=4)	0/4	2/4	0/4	2/4

N. D. : not detected

表2 レモン、オレンジおよびグレープフルーツ中の OPP, TBZ 濃度

		OPP	TBZ
オレンジ	(n=8)	0.02~0.9mg/kg	0.02~1.1mg/kg
レモン	(n=8)	0.05~1.5mg/kg	0.01~2.4mg/kg
グレープフルーツ	(n=4)	N. D.	0.05~0.1mg/kg

N. D. : not detected

表3 OPP および TBZ の基準値

	OPP	TBZ
FAO/WHO 食品規格案 暫定最大残留量	10mg/kg	10mg/kg
日本の残留基準量	10mg/kg	10mg/kg
FAO/WHO 1日摂取許容量	0.02mg/kg	0.3mg/kg

以上の結果から、直ちに発癌に関与するような量の防かび剤が輸入柑橘類に含有しないことは確かである。また、これら内分泌攪乱作用の発現に単独で寄与する可能性に言及することは出来ないが、実際にこのように基準値以下ではあるが、防かび剤が使用されていることから他に摂取している内分泌攪乱物質の影響をどのように修飾するかについては未知であり安全であるとは言えない。

D. 結論

輸入果実の全被験商品からではないが、防かび剤として使用が許可されているフェノール系化合物であるオルトフェニルフェノール (OPP) を検出した。果肉には存在しないが、外果皮に残留することが判明した。これは、外果皮を材料とする食品から OPP を摂取する可能性を示している。また、温水浸漬により OPP の溶出をみたことは、調理法によってはヒトが摂取する可能性のあることを示している。フェノール系化合物は内分泌攪乱作用を示すものが多いので、速やかに OPP の内分泌攪乱作用の有無の同定、さらに他の内分泌攪乱物質の影響を修飾する可能性について検討する予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 参考文献

- 1) 中里光男ら：衛生化学、34、401、1988
- 2) 掘 伸二郎ら：防菌防黴誌、18、87、1990
- 3) 北田善三ら：食衛誌、23、21、1982
- 4) Kirada, Y. et al.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 65,1302,1982

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takatori S, Kitagawa Y, Oda H, Miwa G, Nishikawa J, Nishihara T, Nakazawa H, Hori, S.	Estrogenicity of Metabolites of Benzophenone Derivatives Examined by a Yeast Two-Hybrid Assay	J Health Sci			in press
Kitagawa Y, Takatori S, Oda H, Nishikawa J, Nishihara T, Nakazawa H, Hori S.	Detection of Thyroid Hormone Receptor-Binding Activities of Chemicals Using a Yeast Two-Hybrid Assay.	J Health Sci			in press