

5)。

考察

(4)免疫複合体量

雌では明白な差はなかったが、雄では Gen(15mg/kg)投与群で有意に減少した(図6)。

(5)血中 IFN - γ 量

雌の Gen(15mg/kg)投与群と雄の、E2投与群で有意な減少が見られた(図7)。

(6)腎臓の組織病理学的分析

糸球体腎炎は雄の BPA(3mg/kg)投与群で有意な軽減が見られたが、その他では明白な差はなかった(図8)。血管炎は、雄の Gen(15mg/kg)投与群で有意に悪化、雌の Gen(15mg/kg)投与群でも悪化の傾向が見られた(図9)。また腎変性の罹患率は雌雄ともに Gen(50mg/kg)投与群で明らかに高かった。(図10)。

(7)生存率

雄はいずれの投与群でも差が見られなかった。しかし、雌では210日目の生存率が Control 群では60%だったのに対し、E2投与群は10%、BPA(3mg/kg)投与群は40%で、Gen(15mg/kg)投与群では159日目にすべてのマウスが死亡し、生存率の有意な低下が見られた(図11)。また、生後210日目までの平均生存日数は、Control 群では183日だったが、BPA(3mg/kg)投与群では166日、Estradiol-17 β (10 μ g/kg)投与群では158日、Gen(15mg/kg)投与群では141日と、各投与群とも Control 群と比較して平均生存日数は顕著に短かった。

MRL-*Ipr*^{+/+}マウスは3ヶ月齢で自己免疫病の発症が始まる。本実験では、環境ホルモン物質が発症開始に影響するのではないかと考えて、3ヶ月齢(投与開始2ヶ月後)における体重、臓器重量、リンパ節重量、尿蛋白症、皮膚炎、血中免疫複合体およびサイトカイン量を調べた。しかしながら、いずれの発症指標も若干の変化は見られたものの、発症時期が早まったことを示すような明白な変化はいずれの投与群においても見られなかった。そのことから、本研究で投与した E2 や BPA、Gen は自己免疫病の発症開始時期にはあまり影響しないことが示唆された。

糸球体腎炎では各投与群で差が見られなかったものの、低濃度 Gen(15mg/kg)投与群では腎臓血管炎の高率な発症が見られ、また腎臓の変性も多発していた。そのため、特に、Gen(15mg/kg)投与マウスの腎臓では血管周囲のリンパ球浸潤が顕著で、腎臓の変性は血管炎の発症に伴って起きる腎臓内の出血やリンパ球の浸潤が原因ではないかと思われた。その結果として、Gen(15mg/kg)投与群の死亡率が著しく高くなったと考えられた。今後、Gen のエストロゲン様活性以外の影響、特に腎臓に与える影響についても検討する必要があると思われる。

生存率は雄では各投与群で差がなかった。しかし、雌では、Control 群の生存率が60%だったのに対し、BPA(3mg/kg)投与群は40%、Estradiol-17 β 投与群は10%で、Gen(15mg/kg)投与群では159日目にすべてのマウスが死亡した。また、雌の平均生存日数は、

Control 群では 183 日だったが、BPA (3mg/kg) 投与群では 166 日、Estradiol-17 β (10 μ g/kg) 投与群では 158 日、Gen(15mg/kg)投与群では 141 日と、低濃度の Gen は発症後の悪性進展に重大な影響を及ぼすことが分かった。この雌 Gen(15mg/kg)投与群における生存率の顕著な低下は、腎臓血管炎とそれに伴う腎臓の変性が原因である可能性が考えられた。しかしながら、雄においても腎臓変性が多発していたことから、腎炎以外の原因で死亡した可能性もあることから、より詳細な死亡原因の検討が必要と思われる。

今回、BPA および Gen はそのエストロゲン様活性の低さから自己免疫病の発症開始時期にはあまり影響しないと考えられるが、低濃度 Gen(15mg/kg)投与群では雌雄で腎臓血管炎の有意な悪化、雌の腎臓罹患率の顕著な上昇および生存率の低下など、低濃度の Gen は腎臓に重大な影響を与える可能性が示唆された。今後、BPA(10mg/kg)投与、Gen(50mg/kg)投与および 15mg/kg 以下の濃度の Gen 投与における影響、さらに Gen 投与による腎臓病変と生存率低下のメカニズムを解明する必要があると思われる。

また、本実験では BPA、Gen を用いたが、エストロゲン活性のより高い内分泌攪乱物質も存在することから、他の内分泌攪乱物質についても自己免疫病に与える影響を検討する必要があると思われる。

E. 結論

本研究の結果から、以下の 3 点が明らかとなった。

1、 E2 や BPA、Gen は自己免疫病の

発症開始時期にはほとんど影響しないことが示唆された。

- 2、 BPA および Genistein 投与群はコントロール群に比べて生存率が低かったことから、これらの物質は自己免疫病の悪性進展促進作用がある可能性が示唆された。
- 3、 Genistein は、自己免疫病の症状のうち、特に腎炎の発症および悪性進展に顕著な悪影響を及ぼすことが明らかとなった。

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（予定を含む。）

なし

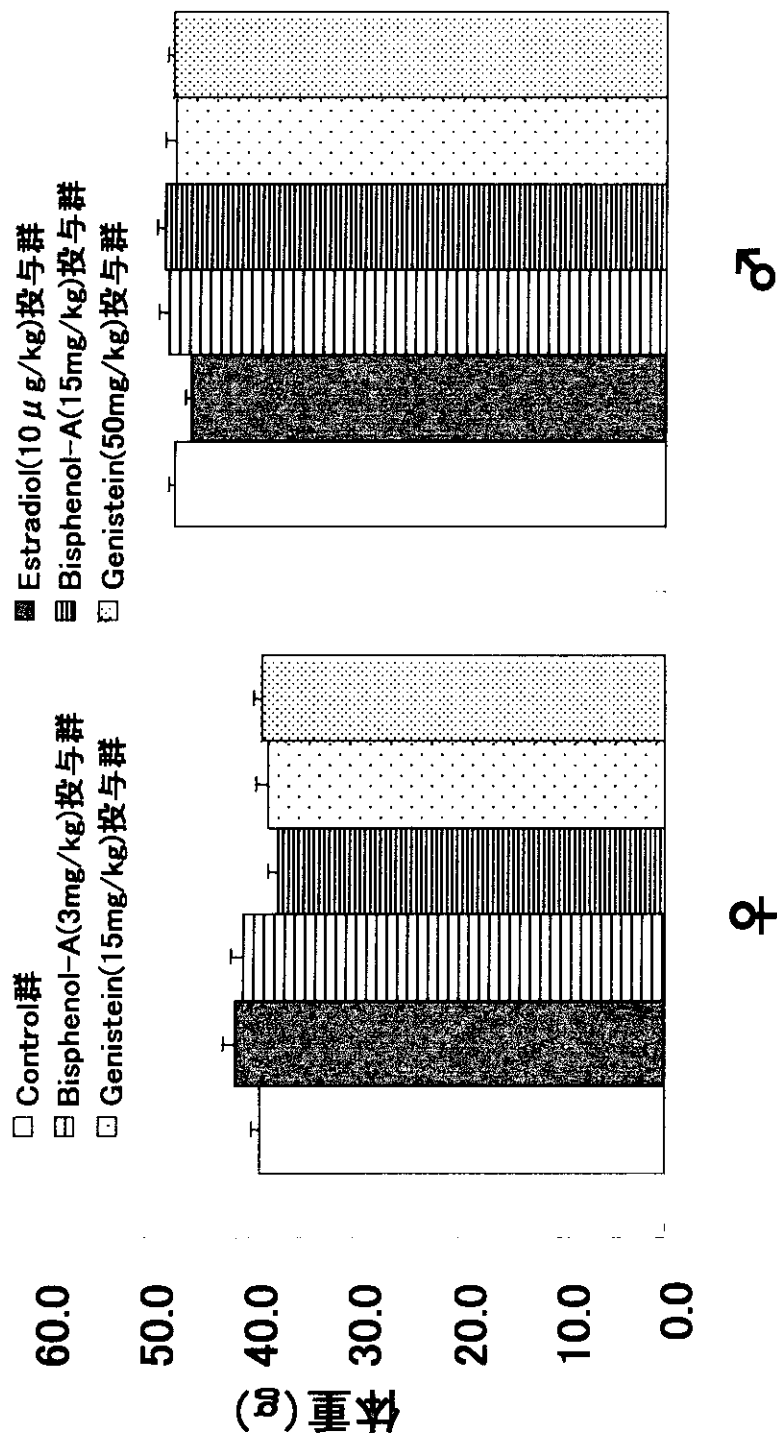


図1 自己免疫病マウスの体重に対する各種環境ホルモン物質の影響

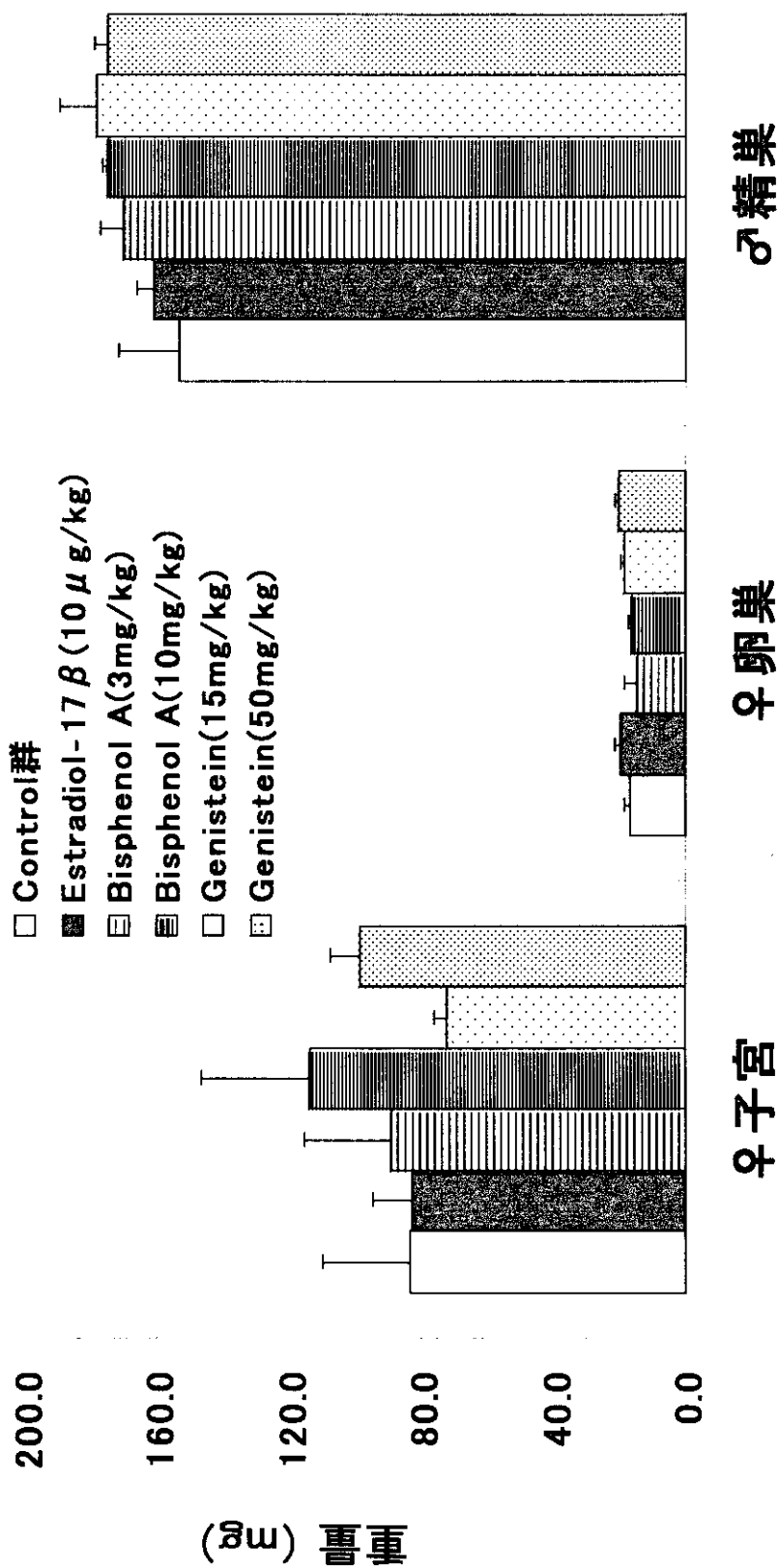


図2 自己免疫病マウスの生殖器官重量に対する各種環境ホルモン物質の影響

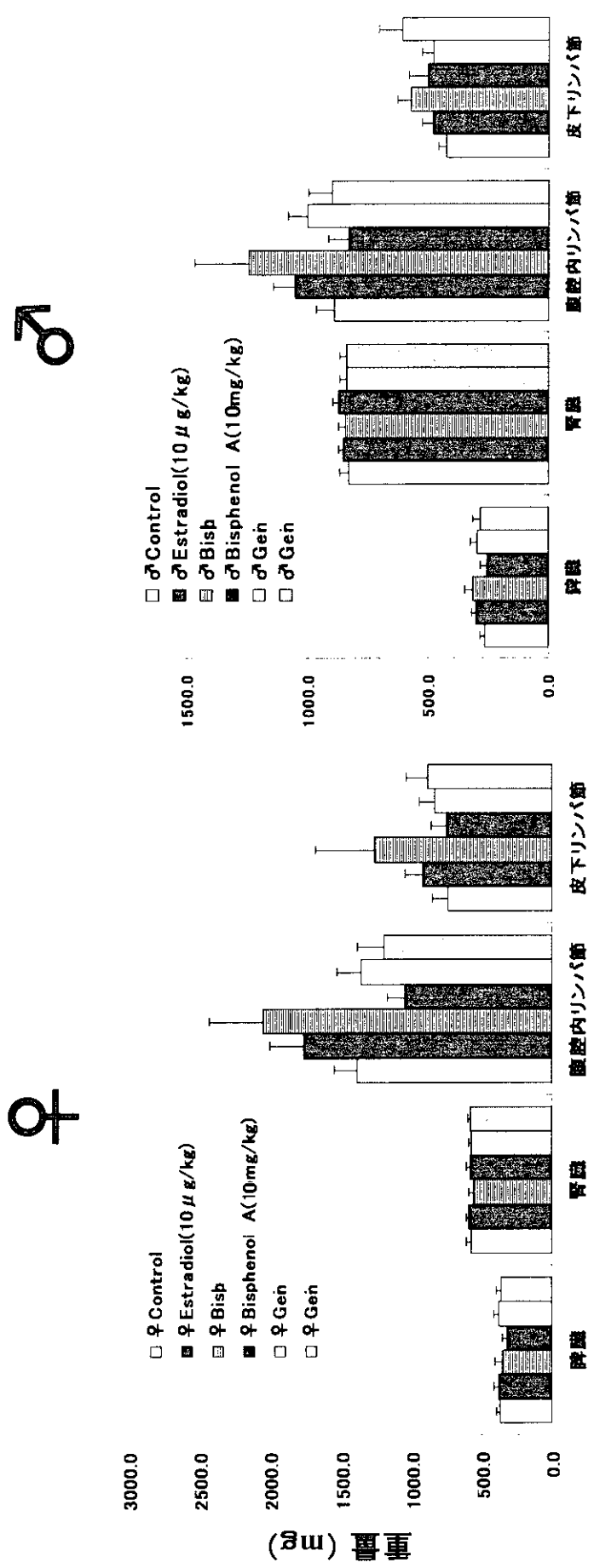


図3 自己免疫病マウスの臓器重量に対する各種環境ホルモン物質の影響

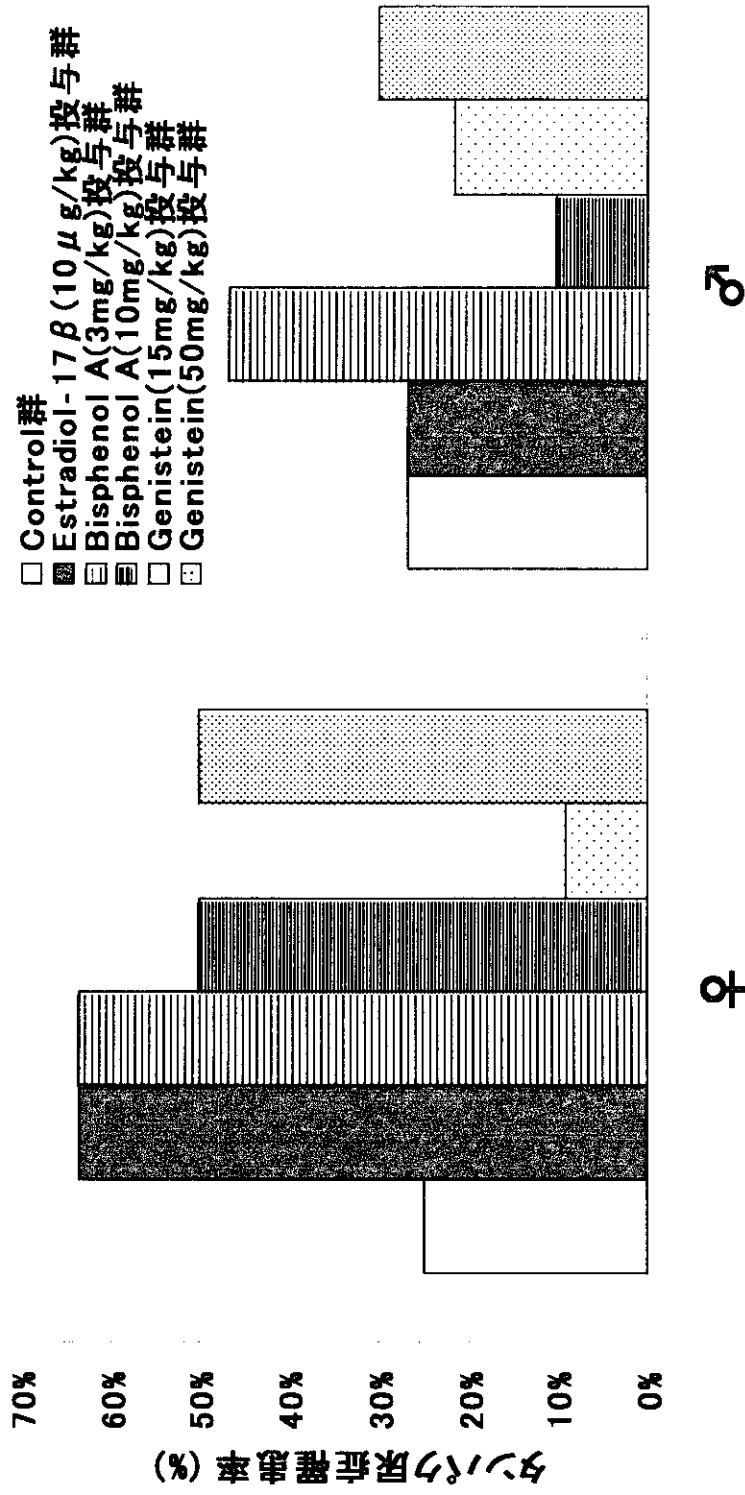


図4 自己免疫病マウスのタンパク尿症に
対する各種環境ホルモン物質の影響

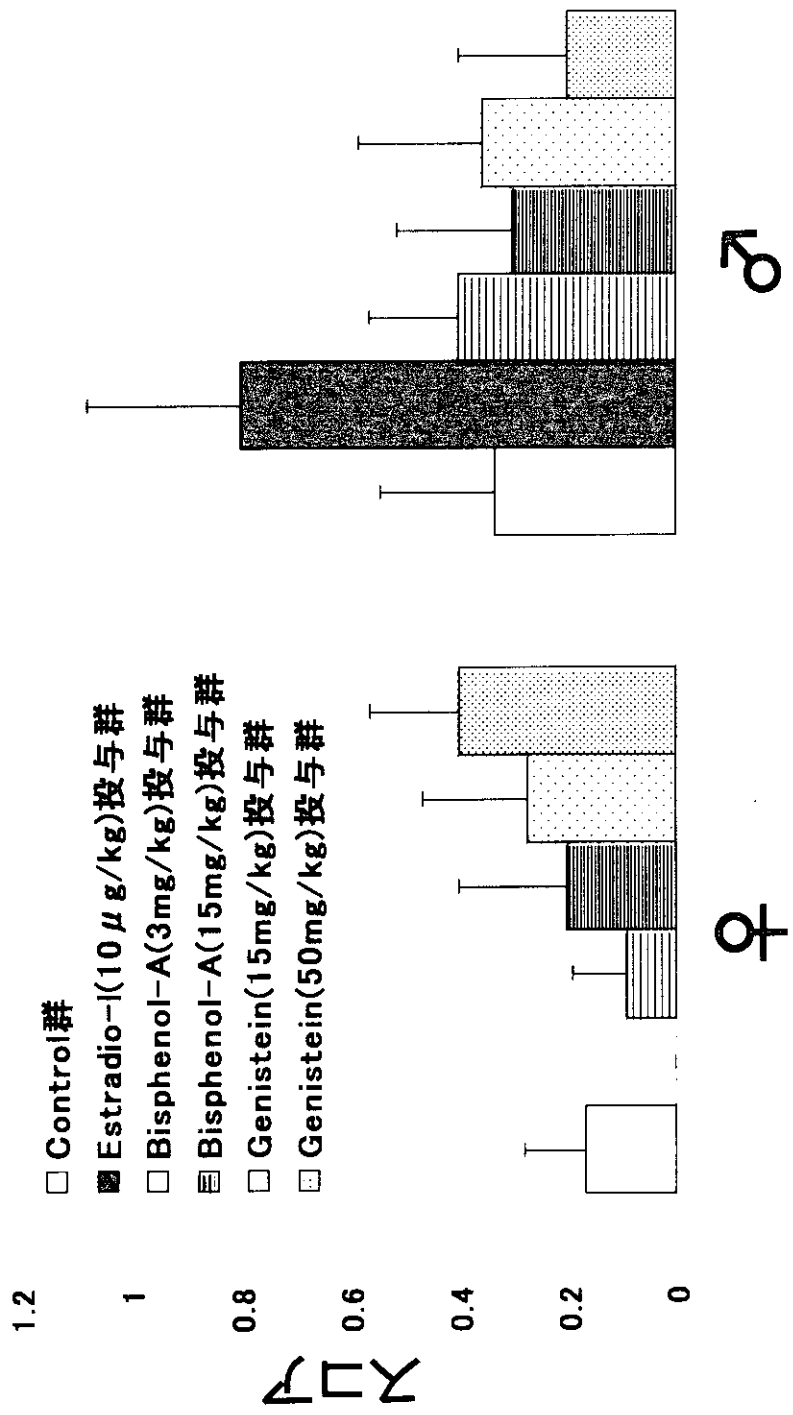


図5 自己免疫病マウスの皮膚炎発症に
対する各種環境ホルモン物質の影響

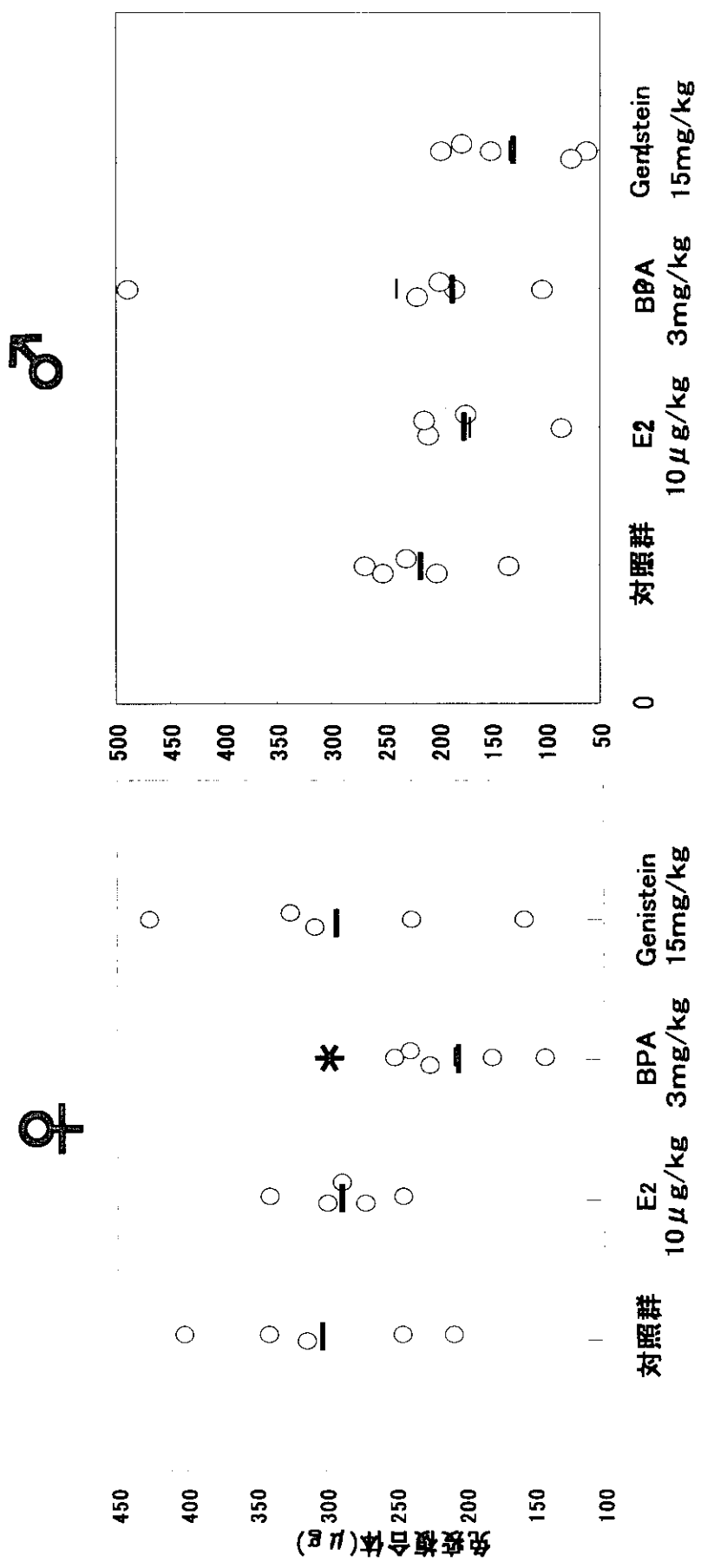


図6 自己免疫病マウスの血中免疫複合体産生に対する各種環境ホルモン物質の影響

* : 対照群に対して有意差あり (P<0.05)

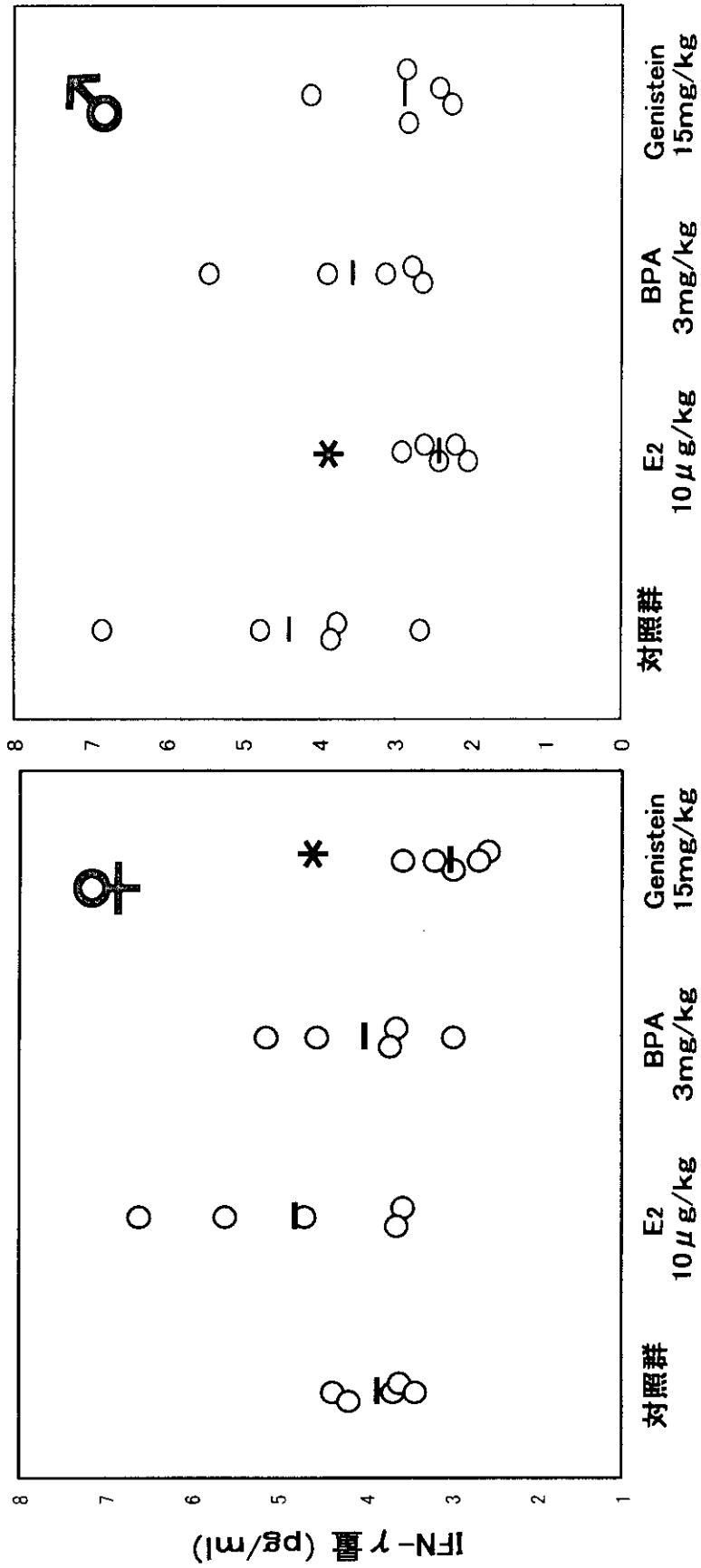


図7 自己免疫病マウスの血中IFN- γ 産生に対する各種環境ホルモン物質の影響

* : 対照群に対して有意差あり ($P < 0.05$)

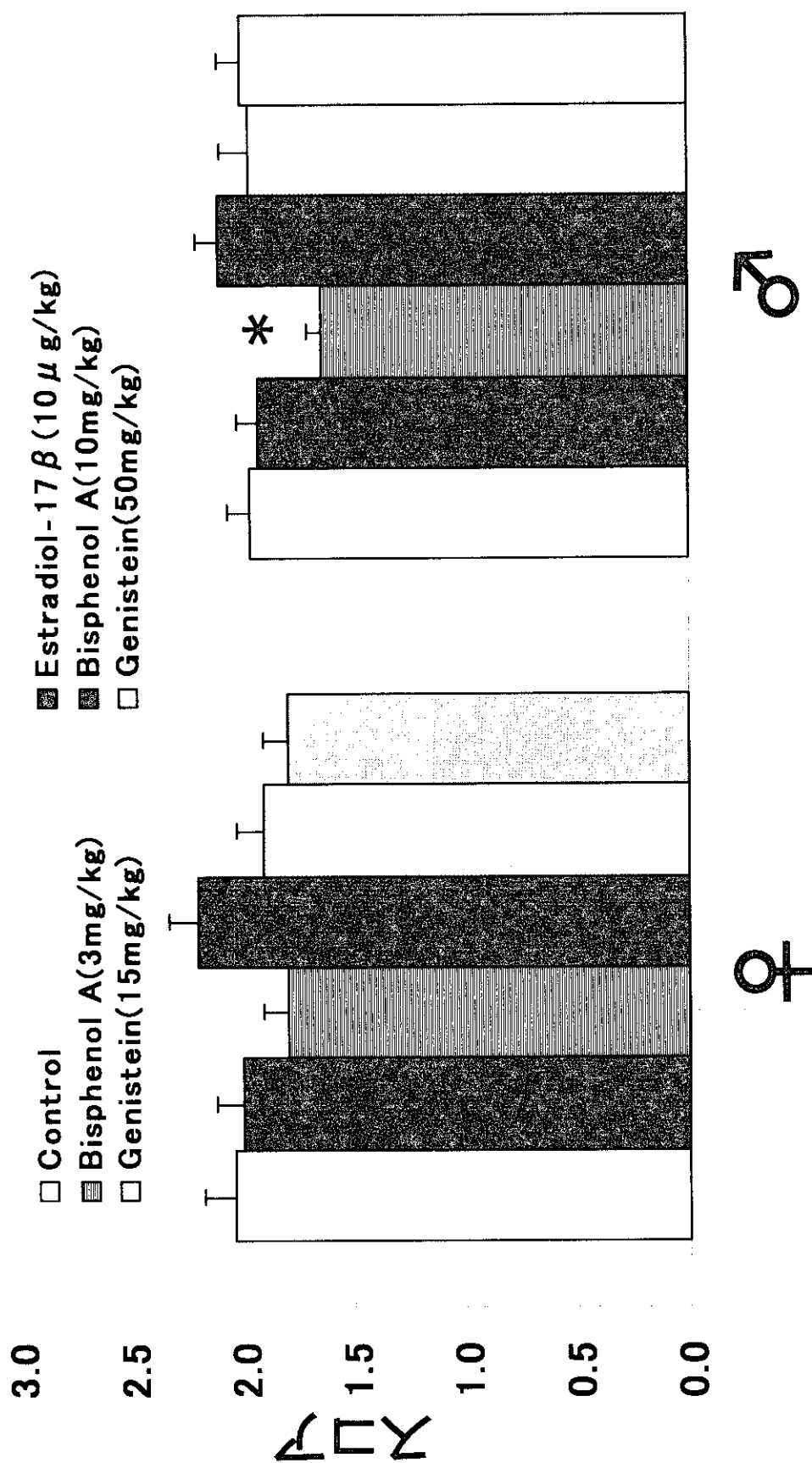


図8 自己免疫病マウスの糸球体腎炎発症に
対する各種環境ホルモン物質の影響

* : 対照群に対して有意差あり ($P < 0.05$)

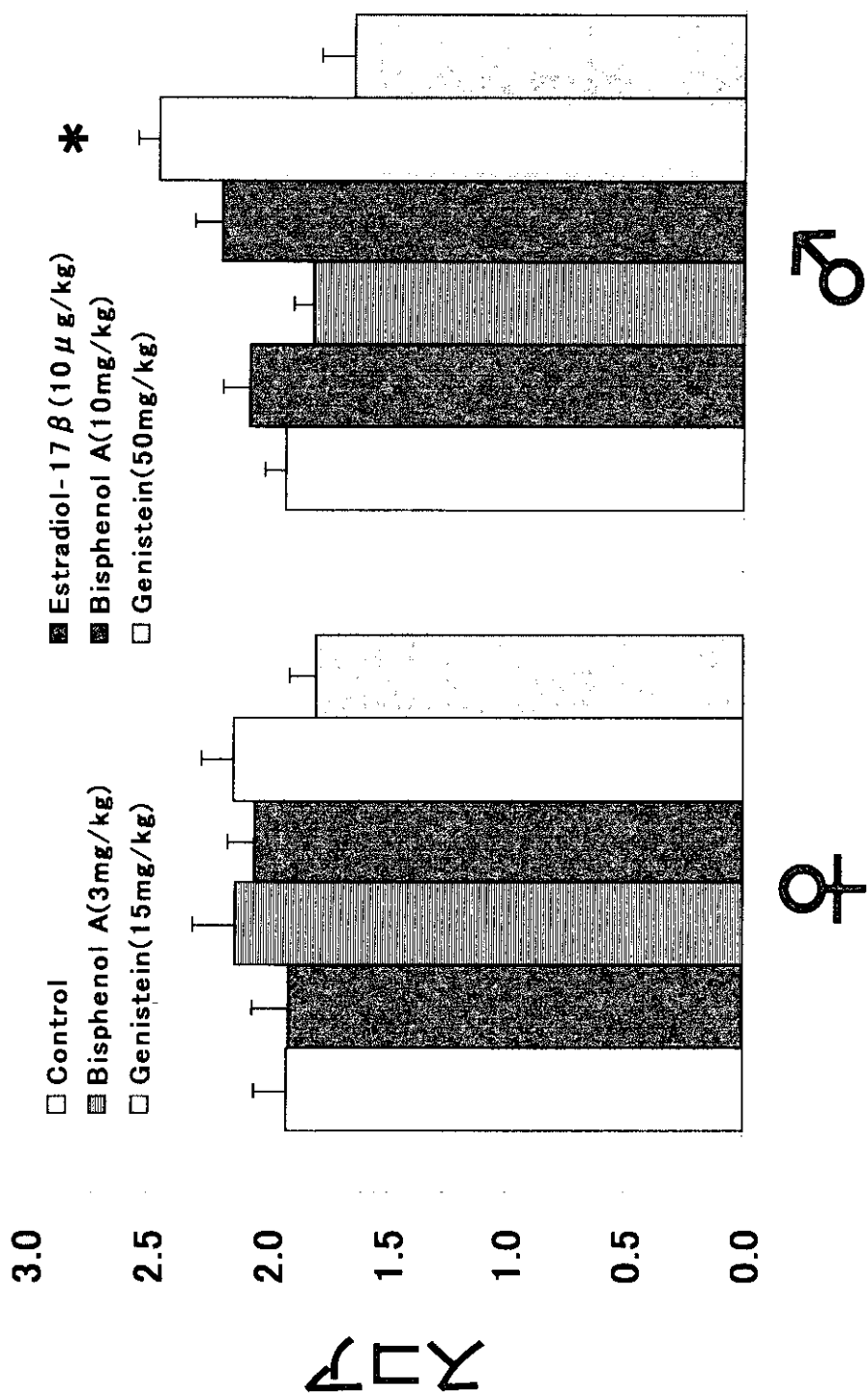


図9 自己免疫病マウスの腎臓血管炎発症に
対する各種環境ホルモン物質の影響

* : 対照群に対して有意差あり (P<0.05)

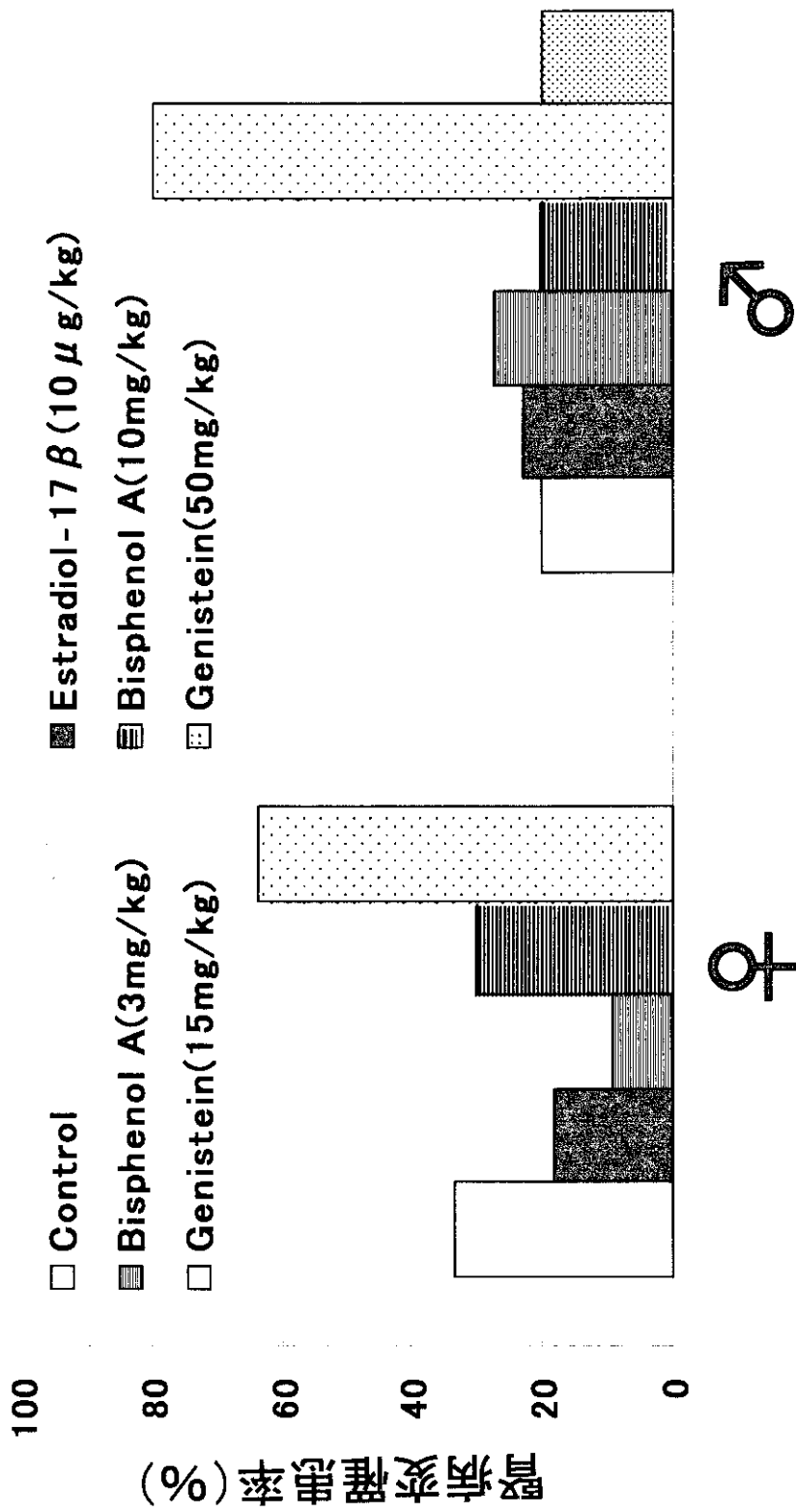


図10 自己免疫病マウスの腎変性発症に
対する各種環境ホルモン物質の影響

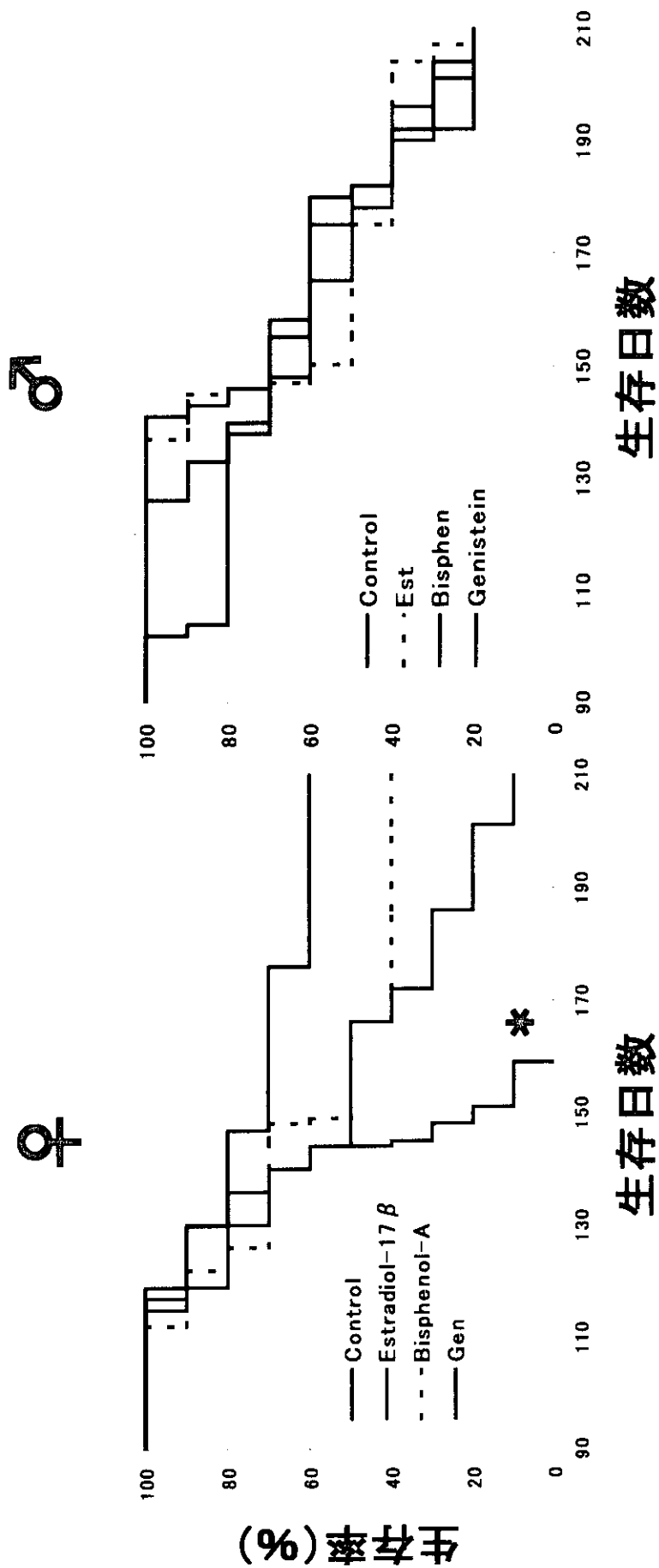


図11 各種環境ホルモン物質を投与した自己免疫病マウスの生存率

* : 対照群に対して有意差あり ($P < 0.05$)

平成15年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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感度分析法の確立（HPLC-ECD及びLC/MS/MSによる血清及び乳汁中のBisphenol A及び植物エストロゲンの一斉分析法の開発）

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	奈良県保健環境研究センター統括主任研究員
協力研究者	大前壽子	奈良県保健環境研究センター主任研究員
協力研究者	茶山和敏	静岡大学農学部助教授

研究要旨

早期新生児期における母乳を介した内分泌かく乱物質の暴露量、及びその単独あるいは複合効果を解明することを目的に、生体試料（血清、乳汁）中のBisphenol A (BPA) と植物エストロゲンのResveratrol、Genistein、Daidzein及びGlyciteinの5物質について、HPLC-ECD及びLC/MS/MSを用いた高感度一斉分析法を開発した。遊離体の測定に加え、酵素分解により抱合体を含めた総量の測定を行った。検出限界は物質により若干異なるが、5物質とも血清で0.6 ng/mL以下、乳汁で1 ng/mL以下であった。

市販正常マウス血清及びNIH-07PLDで飼育したコントロール群マウスの血清及び乳汁の分析を行ったところ、市販マウス血清ではBPAで総量が1.7 ng/mL（遊離体1.5）、Daidzeinで総量が65 ng/mL（遊離体15）、Glyciteinで総量が30 ng/mL（遊離体7.6）、Genisteinで総量が57ng/mL（遊離体11.3）検出された。一方、NIH-07PLDで飼育したマウスの血清及び乳汁では、Genistein等植物エストロゲンは総量で2.5ng/mL以下（遊離体1以下）であり、BPAは総量及び遊離体濃度が、痕跡～2.2ng/mLであったが、分析操作ブランクも同程度検出されていることから、試料採取及び分析操作中のコンタミネーションと考えられた。

また、BPA-d16を10、100 mg/kg皮下投与して血清及び乳汁への移行を調べた結果、血清では10mg/kg群で総量が1.8 ug/mL（遊離体0.30）、100 mg/kg群で総量が18.4ug/mL（遊離体1.3）検出された。乳汁では10mg/kg群で総量が0.59 ug/mL（遊離体0.52）、100 mg/kg群で総量が4.0ug/mL（遊離体2.0）検出された。遊離体の総量に対する比は、10 mg/kg群では血清7.9～41%（平均19）、乳汁81～93%（平均89）、100 mg/kg群で血清3.8～8.0%（平均6.9）、乳汁40～60%（平均49）と、乳汁の方が血清に比べて遊離体の割合が高く検出され、極性の高い抱合体に比べて脂溶性化合物である遊離体の方が乳汁に高率に移行することが示唆された。

A. 研究目的

新生児期は代謝能力が低く、内分泌かく乱物質の影響が成人に比べて大きく、かつ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、経乳汁暴露について関心が寄せられている。BPAと大豆イソフラボン、高用量経口投与により乳汁を介して次世代に移行することが報告

されているが、乳汁移行についての詳細報告はほとんど見られない。そこで、母マウスが摂取した Resveratrol、Genistein 等の植物エストロゲンやBPAが血液及び母乳ほどの程度移行するか調査し、新生仔への暴露量把握及び生体影響の基礎資料を得ることを目的に、血清及び乳汁の高感度分析法を検討した。なお、Genisteinの主たる暴露源である大豆にはGenistein以外にDaidzein、Glyciteinも含まれており、食品や飼料中の検出報告もあることから、これらも加えた5物質を分析対象とし、昨年度開発したHPLC-ECD法に加え、より特異性の高いLC/MS/MSによる分析法を検討した。また、これら物質は生体内で代謝されてグルクロン酸や硫酸抱合体となることから、遊離体に加え、代謝物を含めた分析法を開発した。また、マウスにBPA-d16を皮下投与して血清及び乳汁移行を調査した。

B. 研究方法

B-1 試薬及び器具

標準品としてBPA (MW228.29) は和光純薬工業社製、BPA-d16 (MW244.39) は関東化学社製の環境分析用を用いた。なお、マウスの投与には和光純薬工業社製 BPA-d16 を用いた。Resveratrol (MW228.25) 及びGenistein (MW270.24) は東京化成工業社製を、Daidzein (MW254.24) 及びGlycitein (MW284.27) は和光純薬工業社製の生化学用を用いた。

ソムノペンチルはピットマン・ムーア社製、オキシトシンは帝国臓器製薬社製を用いた。

β -Glucuronidase溶液はSigma社製タイプH-2 (β -Glucuronidase 124,400 units/mL、Sulfatase 3,610 units/mLを含む) を酢酸緩衝液で10倍希釈して用いた。

メタノールは和光純薬工業社製HPLC

用または残留農薬用を用いた。アセトンは和光純薬工業社製特級及び残留農薬試験用を用いた。市販正常マウス血清は和光純薬工業社製免疫化学用を用いた。他の試薬類は和光純薬工業社製特級を用いた。

水はMilliQ水を用いたが、検体の処理及びLC/MS/MSの移動相に用いる水は、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、BPAのコンタミのチェックを行ったものを使用した。

固相抽出カートリッジは、International Solvent Technology社製 ISOLUTE Multimodeカートリッジ(500 mg/3ml)を用いた。

標準溶液は各標準品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調製した。

酢酸緩衝液は0.2M酢酸溶液と0.2M酢酸ナトリウム溶液を混和して、pHを5に調整した。

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°Cで乾燥後、蓋付ステンレス製容器に保管して使用した。マイクロピペットのチップ類及びマイクロチューブは使用前にアセトンで洗浄し、乾燥後、蓋付ステンレス製容器に保管して使用した。

B-2 装置及び測定条件

HPLCは島津製作所製LC-6A、電気化学検出器(ECD)は医理化社製E-502を用いた。測定条件を表1に示す。

LC/MS/MSはWaters製 HPLC 2695 / Applied Biosystems 製 API3000 MSDを用いた。測定条件を表2及び表3に示す。

B-3 マウスへの内分泌かく乱物質の

投与

マウスはddy系のメスを用いた。静岡大学農学部の実験動物飼育室で、温度； $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度； $60 \pm 10\%$ 、照明；14時間明期・10時間暗期、飼料及び水；自由摂取の条件下で飼育し、また、飼育ケージはアルミ製、給水瓶はガラス製のものを使用した。交尾確認後のマウスには環境ホルモン実験用飼料であるオリエンタル酵母社製 NIH-07PLDを給与し、また、ケージにはアイソレーションキャップを被せて環境中のBPA汚染を防止した。

交配して交尾が確認されたマウスについて、分娩翌日に仔の数を6匹に揃え、哺乳10日目に母マウスと子マウスを離乳する。離乳5時間目にコントロール群としてオリーブ油のみを、実験群としてオリーブ油に溶解した10、100mg/kg濃度のBPA-d16を皮下に投与し、投与2時間後（離乳7時間目）にソムノペンチル麻酔及びオキシトシンを注射して乳汁を採取し、投与2時間40分後（離乳7時間40分目）にクロロホルム過剰麻酔によって屠殺し、心臓穿刺により血液を採取する。得られた血清及び乳汁は直ちに -20°C 以下で凍結保存し、これを投与群とする。また、オリーブ油のみを皮下投与したものをコントロール群とする。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた実験は静岡大学農学部動物実験に関する指針（平成2年2月15日制定）に基づいて適切に行った。

B-4 試験溶液の調製

B-4-1 血清の前処理

遊離体だけを測定する場合は、血清125 μL に酢酸緩衝液125 μL 、メタノール1mLを加えて攪拌後、遠心分離する。上澄液1mLを分取後、メタノール濃度が

20%以下になるように水で希釈し、固相抽出カートリッジで精製後、濃縮または希釈し、メタノール濃度を50%とする。また、抱合体を含めた総量を測定する場合は、血清125 μL に酢酸緩衝液100 μL と β -Glucuronidase溶液25 μL を加え、 37°C 1時間インキュベートし、放冷後メタノール1mLを加え、以下遊離体と同様に操作する。

B-4-2 乳汁の前処理

遊離体だけを測定する場合は、乳汁250 μL に酢酸緩衝液250 μL 、メタノール2mLを加えて攪拌後、遠心分離する。上澄液2mLを分取後、メタノール濃度が20%以下になるよう水で希釈し、固相抽出カートリッジで精製後、濃縮または希釈し、メタノール濃度を50%とする。また、抱合体を含めた総量を測定する場合は、乳汁250 μL に酢酸緩衝液225 μL と β -Glucuronidase溶液25 μL を加え、 37°C 1時間インキュベートし、放冷後メタノール2mLを加え、以下遊離体と同様に操作する。

C. 研究結果

C-1. HPLC-ECD条件の検討

昨年度は、乳汁中の遊離体についてHPLC-ECD法の条件を検討したが、今年度は血清を加え、酵素処理により抱合体を加水分解した検体について検討したところ、目的5物質のピーク分離には250mmカラムが必要であった。他の条件は、昨年度と同じである。図1に市販マウス血清及び酵素処理した血清検体のクロマト例を示す。

C-2. LC/MS/MS条件の検討

より特異性の高いLC/MS/MSによる分析法を検討し、前記分析条件を開発した。移動相の酢酸アンモニウム濃度とピーク

高との関係を図2及び図3に示したが、塩濃度が低い程感度が高くなり、目的5物質中ピーク高の最も低いBPAでは0.5 μ Mの時に最も感度が高かったが、血清サンプルでマトリックス効果により感度が不安定になったため、より安定な5 μ Mを用いることとした。絶対面積法により検量線を作成したところ、0.5から250ng/mLの広い範囲で良好な直線性 ($R^2=0.998$ 以上) が得られた。図4に検量線例を示す。検出限界は物質により若干異なるが、Resveratrol、Daidzein、Glycitein、Genistein及びBPAの5物質では、血清(0.2mLに定容した場合)で0.6 ng/mL以下、乳汁(0.5mLに定容した場合)で1 ng/mL以下であった。なお、BPA-d16の感度は、BPAの約1/3であった。血清に20ng/mL濃度添加したときの回収率を表4に示したが、5物質とも75%以上と良好な結果であった。

C-3実試料への応用

市販正常マウス血清及びNIH-07PLDで飼育したコントロール群マウス (n=5) の血清及び乳汁の分析を行ったところ、市販マウス血清では図5に示したように、BPAで総量が1.7ng/mL (遊離体1.5)、Daidzeinで総量が65 ng/mL (遊離体15)、Glyciteinで総量が30 ng/mL (遊離体7.6)、Genisteinで総量が57ng/mL (遊離体11.3) 検出された。一方、NIH-07PLDで飼育したマウスの血清及び乳汁では、Genistein等植物エストロゲンは、総量で2.5ng/mL以下 (遊離体で1以下) であり、BPAについては総量及び遊離体濃度が痕跡 \sim 2.2ng/mLであったが、分析操作ブランクも痕跡 \sim 1.7ng/mL検出され、また、総量と遊離体が同程度検出されていることから、試料採取及び分析操作中のコンタミネーションと考えられた。

LC/MS/MSによる標準溶液 (各25

ng/mL)、市販マウス血清及びコントロール群マウス乳汁のクロマトグラム例を図6 \sim 8に示す。

C-4. 投与実験

BPA-d16を10、100 mg/kg皮下投与して血清及び乳汁への移行を調べた結果を図9に示す。n=5の平均値で、血清では10mg/kg群で総量が1.8 μ g/mL (遊離体0.30)、100 mg/kg群で総量が18.4 μ g/mL (遊離体1.3) 検出された。乳汁では、10mg/kg群で総量が0.59 μ g/mL (遊離体0.52)、100 mg/kg群で総量が4.0 μ g/mL (遊離体2.0) 検出された。遊離体の総量に対する比は、10mg/kg群では血清7.9 \sim 41% (平均19)、乳汁81 \sim 93% (平均89)、100 mg/kg群で血清3.8 \sim 8.0% (平均6.9)、乳汁40 \sim 60% (平均49) と、乳汁の方が血清に比べて遊離体の割合が高く検出され、極性の高い抱合体に比べて脂溶性化合物である遊離体の方が乳汁に高率に移行することが示唆された。

D. 考察

D-1. HPLC-ECD及びLC/MS/MS条件の検討

HPLC-ECDでは、マウス血清について5物質を妨害ピークから分離するために、4.6 \times 250mmのカラムを用いた。 β -Glucuronidase処理した検体ではピーク面積とともに目的ピーク付近のピーク数も増加した。

LC/MS/MSでは選択性が高く、酵素処理後も妨害ピークはほとんど見られなかった。

LC/MS/MSではBPAの分析に移動相中に酢酸を添加した報告があるが、装置の違いか酢酸添加では感度が悪く、酢酸アンモニウムの添加が効果的であった。酢酸アンモニウムの添加は、図2及び図3に

示した様に濃度が低い程感度が高くなり、0.5 μ Mの時が最も高感度であったが、血清サンプルにおいてマトリックスの影響を受け、イオン化が不安定になる現象が見られたため、より安定な5 μ Mを用いることとした。グラジエント溶出条件では、MeOH95%3分のフラッシングでは乳サンプルは共存物質が次の検体の分離に影響したため、フラッシング時間を20分としたところ、再現性よく分析できた。測定物質毎の条件設定は、機器により自動的に求められた最適化条件を採用した。

D-2. 試験溶液調製方法の検討

抱合体を含めた総量を測定するために β -Glucuronidaseによる加水分解処理を行った。処理条件については、血清、尿中BPA代謝物についての堀江ら（平成14年度厚生科研費報告）と母乳中イソフラボン代謝物における Franke A.A.ら（*Clinical Chemistry*, 42, 955-964, 1996、*Biochemical Society Transactions*, 27, 308-318, 1999）の方法に準拠し、37 $^{\circ}$ C1時間インキュベートした。その他は昨年度の条件に準じた。

D-3. BPA-d16投与における乳汁移行

試料採取及び分析時におけるBPAのコンタミネーションを0にすることが難しいため、今年度はBPA-d16を皮下投与して血液及び乳汁への移行を調査した。皮下投与においては血中濃度が最高になるのは経口投与に比べて早く、1時間以内との報告があり、投与2時間後に搾乳を行い、搾乳後直ちに（投与2時間40分後）屠殺し血液を採取した。

BPAの経口投与の場合、未変化体の血中濃度は、腹腔内及び皮下投与に比べて1桁から2桁低く（Pottenger L.H.ら、*Toxicol. Sci.*, 54, 3-18, 2000）、授乳中CDラットへ

の経口投与（100mg/kg）では最大で約1.5 μ g/mLの濃度の 14 C-BPAが乳汁中に検出された（Snyder R.W.ら、*Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168, 225-234, 2000）との報告や、経口投与により乳汁中排泄の最高濃度時に血漿中濃度の約1/4であったとの報告（大野ら、平成10年度厚生科研費報告）がある。しかし、今回のデータは皮下投与であることより総量で血清中18.4、乳汁中4.0 μ g/mLと経口投与の報告に比べて約10倍の濃度が検出され、また、血中BPAの乳汁移行率は総量として先の報告と同程度であった。

今回の投与量10及び100mg/kgは、BPAにおけるヒトの暴露推定量である1 μ g/kg/day以下（Hirose A.ら、*Jpn. J. Food Chem.*, 10, 1-12, 2003）に比べて大変高濃度であり、乳汁への移行は総量で0.59 μ g/mL（遊離体0.52）及び4.0 μ g/mL（遊離体2.0）と量的には低濃度ではあるが、遊離体の方が抱合体に比べ、乳汁に移行しやすいという結果であったことは、代謝の未発達な新生児への影響や乳腺への影響を考えると興味深い。また、100mg/kg投与群の方が10mg/kg投与群に比べて血清及び乳汁中の遊離体比率が低い結果であったことから、高濃度投与により、何らかの代謝酵素誘導が起こっている可能性も考えられる。今後植物エストロゲンのResveratrol やGenisteinについても調査を行い、BPAとの比較を行う予定である。

E. 結論

1. マウス血清及び乳汁中のBPAと植物エストロゲンのResveratrol、Genistein、Daidzein及びGlyciteinを含めた5物質について、HPLC - ECD及びLC/MS/MSを用いた高感度一斉分析法を開発し、遊離体の測定に加え、酵素分解により抱合体を含

めた総量の測定を行った。検出限界は物質により若干異なるが、5物質とも血清で0.6 ng/mL以下、乳汁で1 ng/mL以下であった。

2. 市販正常マウス血清及びNIH-07PLDで飼育したコントロール群マウスの血清及び乳汁の分析を行ったところ、市販マウス血清ではBPAで総量が1.7ng/mL（遊離体1.5）、Daidzeinで総量が65 ng/mL（遊離体15）、Glyciteinで総量が30 ng/mL（遊離体7.6）、Genisteinで総量が57ng/mL（遊離体11.3）検出された。一方、NIH-07PLDで飼育したマウスの血清及び乳汁では、Genistein等植物エストロゲンは、総量で2.5ng/mL以下（遊離体で1以下）であり、BPAについては、総量及び遊離体濃度が痕跡～2.2ng/mLであったが、分析操作ブランクも痕跡～1.7ng/mL検出され、また、総量と遊離体が同程度検出されていることから、試料採取及び分析操作中のコンタミネーションと考えられた。

3. BPA-d16を10、100 mg/kg皮下投与して血清及び乳汁への移行を調べた結果、n=5の平均値で、血清では10mg/kg群で総量が1.8 µg/mL（遊離体0.30）、100 mg/kg群で総量が18.4µg/mL（遊離体1.3）検出された。乳汁では、10mg/kg群で総量が0.59µg/mL（遊離体0.52）、100 mg/kg群で総量が4.0µg/mL（遊離体2.0）検出された。遊離体の総量に対する比は、10mg/kg群では血清7.9～41%（平均19）、乳汁81～93%（平均89）、100 mg/kg群で血清3.8～8.0%（平均6.9）、乳汁40～60%（平均49）と、乳汁の方が血清に比べて遊離体の割合が高く検出され、極性の高い抱合体に比べて脂溶性化合物である遊離体の方が乳汁に高率に移行することが示唆された。

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

表1 HPLC-ECD分析条件

装置	(株)島津製作所製LC-6A型
データ処理器	(株)島津製作所製 クロマトパック CR-7A
検出器	医理化工業製 E-502型
カラム	GL Sciences Inc.製 Inertsil ODS-3V (4.6×250mm) 5μm
移動相	0.025M KH ₂ PO ₄ -MeOH (52:48)
流速	0.8ml/min
カラム温度	40℃
印加電圧	850mV vs Ag/AgCl
注入量	50 μl

表2 LC/MS/MS測定条件(1)

HPLC	Waters alliance 2695
MS/MS 検出器	Applied Biosystems API3000™ system
カラム	Inertsil ODS-3 2.1mm i.d.×150mm
カラム温度	40℃
流量	0.2mL/min
移動相	5 μM CH ₃ COONH ₄ in 45-95% MeOH (グラジエント)
注入量	10 μL
イオン化モード	Negative-ESI
イオンスプレー電圧	-4500 V
イオンソース温度	550 °C
ネブライザーガス	Air 8

グラジエント条件

移動相	A液: 0.1mM CH ₃ COONH ₄ B液: H ₂ O C液: MeOH					
時間 (min)	0	15	15.01	18(35)	20(37)	33(50)
A液 (%)	5	5	5	5	5	5
B液 (%)	50	15	0	0	50	50
C液 (%)	45	80	95	95	45	45

()内は乳の場合

表3 LC/MS/MS測定条件(2) 各測定物質毎の条件

		Resveratrol	Daidzein	Glycitein	Genistein	BPA	BPA-d16
Declustering Potential [DP]	(V)	-4	-51	-41	-56	-46	-61
Collision Energy [CE]	(V)	-28	-40	-26	-46	-26	-30
Focusing Potential [FP]	(V)	-190	-220	-160	-210	-170	-220
Collision Cell Exit Potential [CXP]	(V)	-5	-13	-13	-7	-15	-19
Precursor Ion	(m/z)	227	253	283	269	227	241
Product Ion	(m/z)	185	224	268	133	212	223