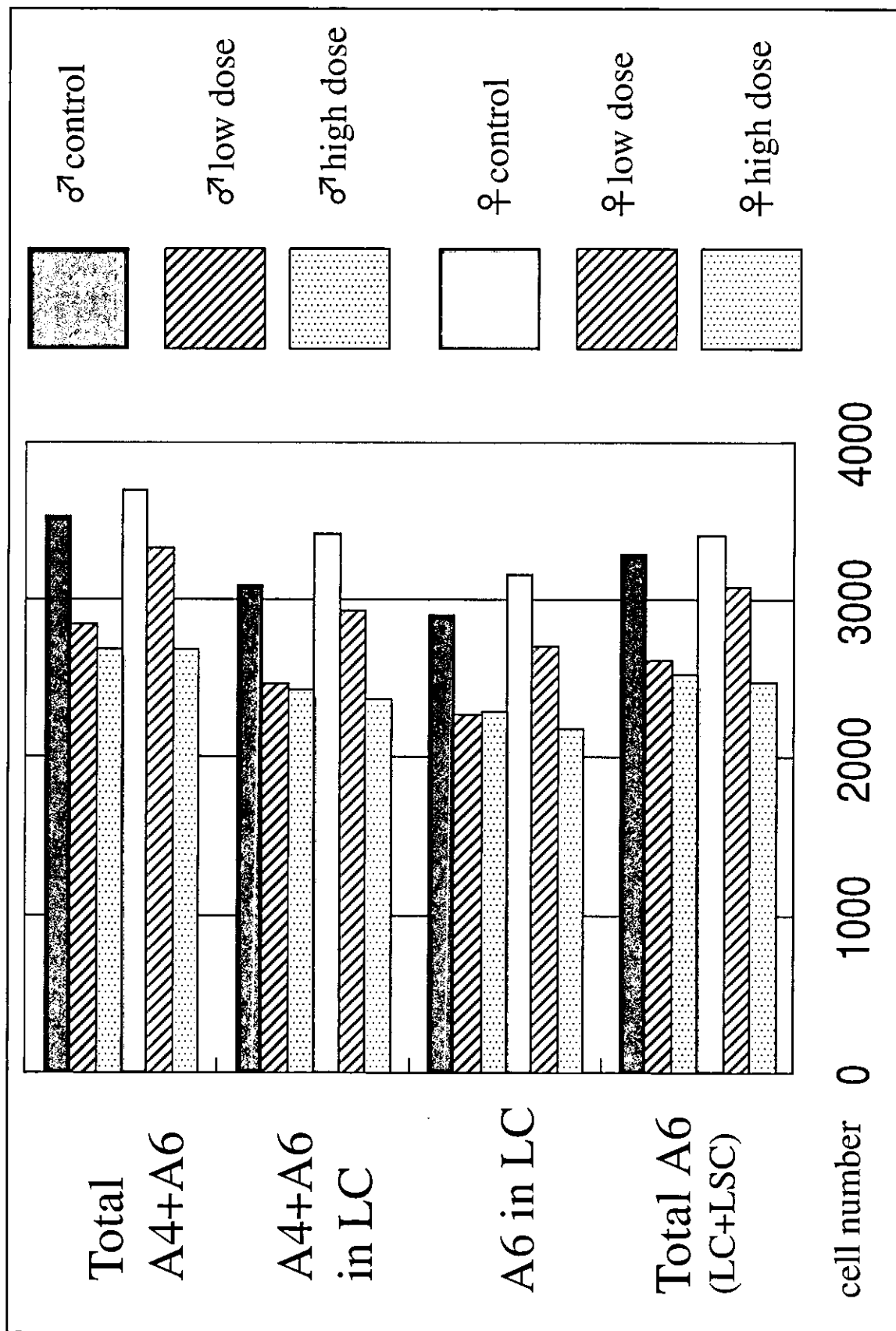


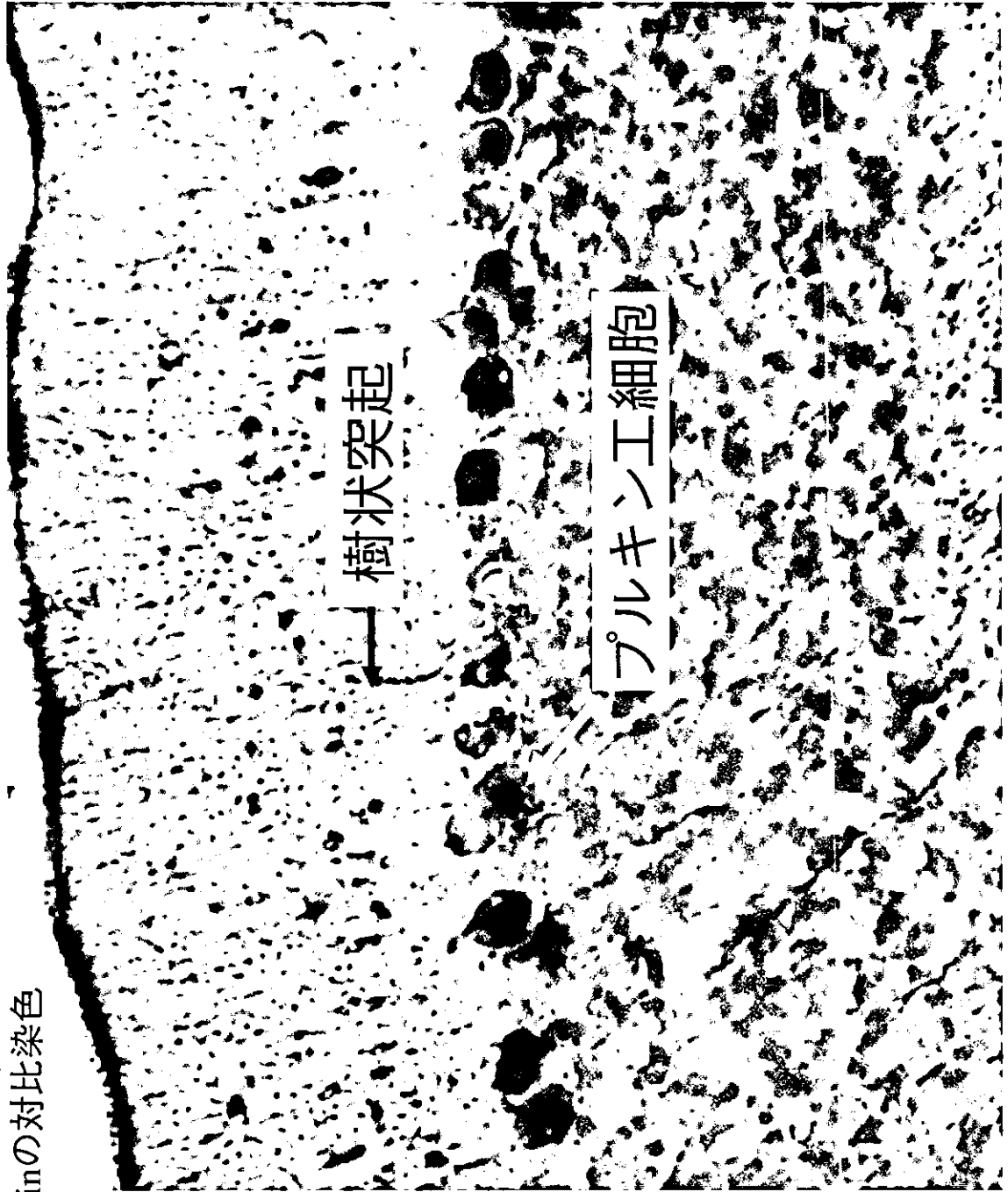
図表4 青斑核(LC)とその各亜核(およびA4・A6群の)カテコール
ルアミンニューロン数 (雌雄各6例の平均)



図表5 小脳

メスラット(大量投与群)前頭断標本

抗Calbindin 抗体を用いた免疫染色とHematoxylinの対比染色



分子層

顆粒層

200 μ m



図表6 56日齡ラット小脳での計測結果

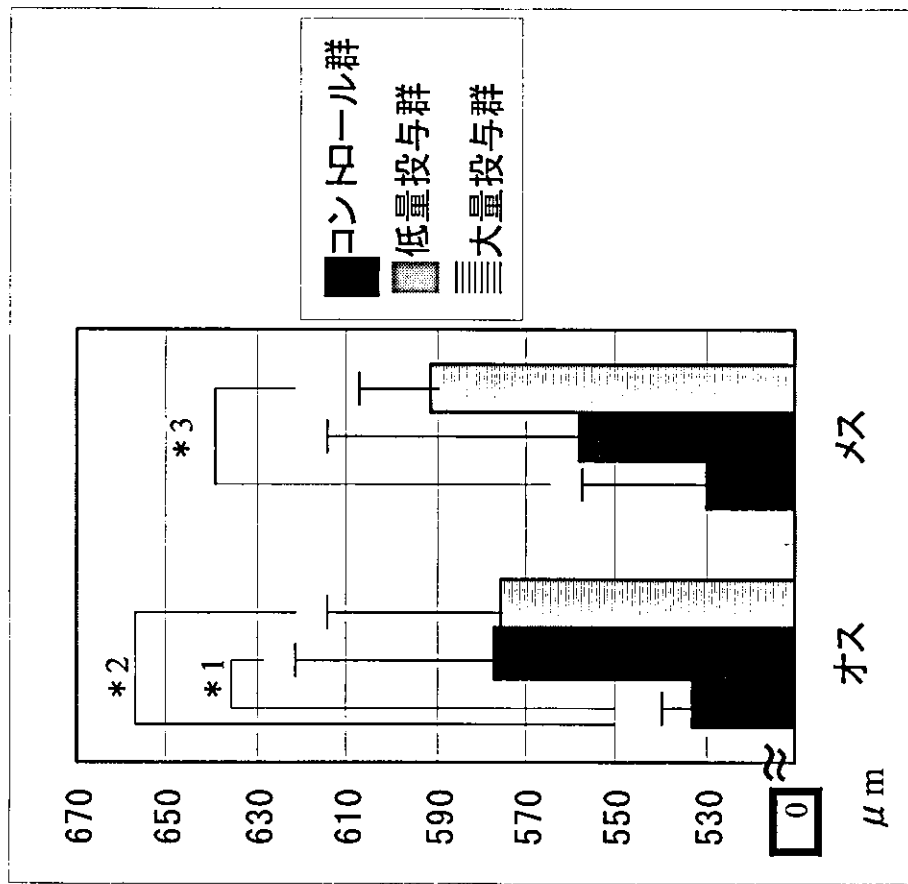
大量投与群♂	顆粒層 μm	分子層 μm	分子層／顆粒層の比	大量投与群♀	顆粒層 μm	分子層 μm	分子層／顆粒層の比
a	418	600	1.48	a	408	595	1.48
b	395	585	1.48	b	407	565	1.40
c	333	535	1.63	c	420	577	1.38
d	380	530	1.45	d	378	602	1.65
e	363	580	1.67	e	443	597	1.40
f	397	623	1.58	f	388	610	1.60
低量投与群♂	顆粒層 μm	分子層 μm	分子層／顆粒層の比	低量投与群♀	顆粒層 μm	分子層 μm	分子層／顆粒層の比
a	325	530	1.65	a	367	578	1.62
b	373	555	1.50	b	370	533	1.45
c	363	592	1.65	c	337	642	1.92
d	387	528	1.38	d	392	512	1.33
e	437	632	1.47	e	335	560	1.75
f	362	625	1.77	f	322	525	1.65
コントロール♂	顆粒層 μm	分子層 μm	分子層／顆粒層の比	コントロール♀	顆粒層 μm	分子層 μm	分子層／顆粒層の比
a	313	547	1.78	a	343	530	1.55
b	352	527	1.57	b	308	497	1.65
c	413	553	1.43	c	347	523	1.57
d	375	513	1.42	d	345	542	1.63
e	320	528	1.77	e	372	515	1.40
f	413	528	1.30	f	372	573	1.57

図表7 56日齡ラット小腦の計測結果のまとめ(表)

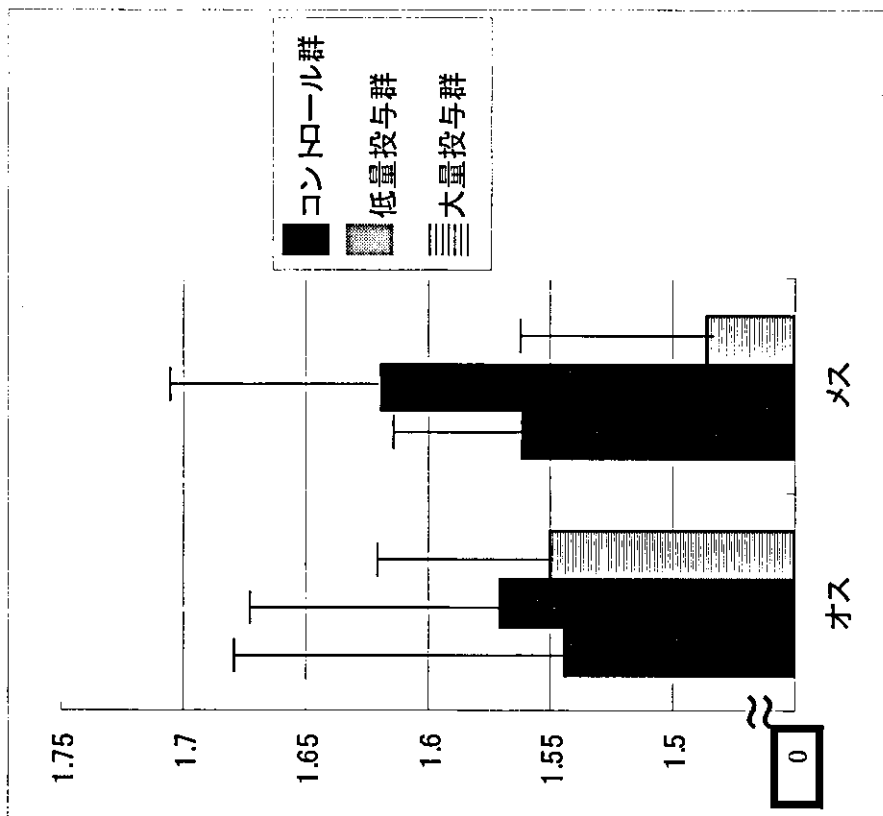
		分子層(μm)	分子層/顆粒層
オス	コントロール群	532.8	1.46
	低量投与群	576.9	1.54
	大量投与群	575.6	1.51
メス	コントロール群	530.0	1.52
	低量投与群	558.3	1.58
	大量投与群	590.8	1.45

図表8 56日齡ラット小脳の計測結果のまとめ(グラフ)

分子層の厚さ



分子層／顆粒層の比



t検定
 *1 p<0.05
 *2 p<0.025
 *3 p<0.025

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・総合研究報告書

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
Bisphenol A 及び植物エストロゲンの高感度分析法の開発と
食品関連化学物質の体内移行調査

分担研究者 今井俊介 奈良県保健環境研究センター所長
研究協力者 北田善三 畿央大学健康科学部教授
大前壽子 奈良県保健環境研究センター総括研究員
茶山和敏 静岡大学農学部助教授

研究要旨

高速液体クロマトグラフ-電気化学検出器 (HPLC-ECD) 及び LC/MS/MS を用いた生体試料（血清、乳汁）中の Bisphenol A (BPA) 及び植物エストロゲンの高感度な一斉分析法を開発した。また、BPA、Genistein 及び Resveratrol を 100 mg/kg または 10mg/kg で授乳マウスに単独あるいは 3 種混合して皮下あるいは経口投与し、これら物質の血液と乳汁への移行を遊離体及び、抱合体を含めた総量について調べ、その挙動を比較した。

10mg/kg の投与後 2 時間目搾乳群で、単独皮下投与では、BPA、Genistein 及び Resveratrol の乳汁中総量及び遊離体濃度の平均値は各々 590 ng/mL（遊離体 520）、96 ng/mL（遊離体 65）、1,400 ng/mL（遊離体 1,100）であり、3 種混合経口投与では、各々 110 ng/mL（遊離体 21）、170 ng/mL（遊離体 10）、120 ng/mL（遊離体 45）であった。血清中濃度と比較すると、乳汁中にはいずれの投与物質も抱合体よりも遊離体の方が移行しやすいことが示唆された。また、混合投与では、若干の値変動が見られ、相互作用が考えられたが単独投与と同程度の検出値であった。経口投与では、各物質ともに血中遊離体濃度が皮下投与に比べて 1/8 以下と低く、遊離体の存在比率も小さくなり、腸管からの吸収率が低く且つ肝臓における初回通過効果が大いことが示唆された。一方、マウスでは Genistein の経口摂取における吸収・代謝機能が発達していることが示唆された。

BPA、Genistein 及び Resveratrol においては、グルクロン酸抱合等による代謝は早い、体内を循環している代謝物の濃度は遊離体に比べて非常に高いことが明らかになった。腸内細菌等による抱合体の分解と遊離体の再吸収が言われていることから、新生児や乳児における体内作用には、抱合体の影響も考えられ、今後さらに検討する必要があると思われる。

- A. 研究目的 露により内分泌かく乱作用が懸念される
BPA や植物エストロゲンは、日常の暴 他に、植物エストロゲンにおいてはエス

トロゲンの作用に関連した各種疾病の予防効果に関心が寄せられている。これらの化合物は生体内では肝臓等で主にグルクロン酸抱合体に代謝されて活性を失うが、さらに腸内細菌等により抱合体が加水分解を受け遊離体に変化する可能性も有り、遊離体とともに、抱合体を含めた総量の濃度を把握する必要がある。また、内分泌かく乱物質の作用は胎児期、新生児期には不可逆的に作用し、重大な影響を及ぼすことが知られており、経乳汁曝露の可能性については十分な検討が必要である。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 (Snyder R.W. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168, 225-234, 2000)、(大野ら、平成 10 年度厚生科学研究報告書)、(池上ら、平成 10 年度厚生科学研究報告書)が、乳汁移行についての詳細な報告はほとんど見られない。そこで、我々は内分泌かく乱作用や有効性を動物実験で解明するに当たり、母親から乳児への移行に関する基礎的研究を行うため、BPA 及び植物エストロゲンの高感度一斉分析法を開発した。そして開発した分析法を用いて授乳マウスに投与したこれら物質の遊離体と総量の血液と乳汁への移行について比較検討を行った。なお、植物エストロゲンとしては大豆に含まれる Genistein、Daidzein、Glycitein 及び赤ワインに含まれる Resveratrol を用いた。

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。Genistein (MW270.24) 及び Resveratrol

(MW228.25) 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。なお、マウスの投与には BPA-d16 は和光純薬工業社製を、Genistein はフジッコ社製、Resveratrol は Sigma 社製を用いた。

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 -グルクロニダーゼ溶液は Sigma 社製タイプ H-2 (β -グルクロニダーゼ 124,400 units/mL、サルファターゼ 3,610 units/mL を含む) を酢酸緩衝液 (pH=5) 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、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、他の試薬類は和光純薬工業社製特級を用いた。

分析に使用する水は MilliQ 水をさらに 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 Solbent Technology 社製 ISOLUTE Multimode カートリッジ(500 mg/3ml)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。

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℃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、ECD は医理化社製 E-502 を用いた。

LC/MS/MS は Waters 社製 HPLC 2695 / Applied Biosystems 社製 API3000 MSD を用いた。

B-3 マウスへの BPA、Genistein 及び Resveratrol の投与

マウスは ddY 系のメスをを用いた。静岡大学農学部の実験動物飼育室で、温度；24±1℃、湿度；60±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した。そして離乳直後 (0 時間目) または 5 時間目にオリーブオイルに溶解した BPA-d16、Genistein 及び Resveratrol を、100mg/kg または 10mg/kg の投与量で単独あるいは 3 種混合して皮下あるいは経口投与した。また、オリーブオイルのみを投与した群をコントロール群とした。投与後 2 時間または 7 時間目 (ともに離乳 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、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した。得られた血清及び乳汁は直ちにマイナス 20℃以下で凍結保存し、分析時に室温で解凍した。

なお、分析の前処理に用いる器具類や水については BPA のコンタミネーションの可能性があるため、「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」による分析法の指針に基づき特別の処理を行なった。しかし、それでもブランク値を完全に除去できなかったため、マウスに投与する BPA については d16 体を用いた。

B-4 統計処理

測定値は個体差が大きく見られ、正規性が棄却される群も見られたため、有意差の検定は、マン・ホイットニの U 検定により行った。

(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。

C. 研究結果

C-1 試料の前処理法の検討

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、遠心分離でを行った。その上澄液を水で希釈して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。25%メタノール溶液 3ml 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、カートリッジのロットによりマウス乳汁では溶出パターンの遅れも見られたため、溶出はメタノール 6ml とした。

さらに、Resveratrol が操作中に光を受けて *trans* 体から *cis* 体への立体異性化を起こし、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、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。

抱合体を含めた総量を測定するために β -グルクロニダーゼ溶液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 代謝物についての報告(堀江ら、平成 14 年度厚生科学研究報告書)と母乳中イソフラボン代謝物における Franke A.A.らの方法 (*Clinical Chemistry*, 42, 955-964, 1996. *Biochemical Society Transactions*, 27, 308-318, 1999) に準拠し、37°C 1 時間インキュベートした。

以上の結果、血清及び乳汁の前処理は、遊離体の測定には、試料 125 μ L (乳汁の場合は 250 μ L) に酢酸緩衝液(pH5)を同量加え、メタノールで除蛋白処理し、遠心分離した上清を水で希釈して逆相分配とイオン交換を組み合わせた ISOLUTE Multimode カートリッジにより精製した。メタノール 6mL で溶出し、溶出液を窒素気流下で濃縮した後、50%メタノール溶液で定容とし試料溶液とした。また、抱合体を含めた総量の測定には、試料 125 μ L (乳汁の場合は 250 μ L) に酢酸緩衝液(pH5)及び β -グルクロニダーゼ溶液を加えて 37°C、1 時間酵素分解した後、メタノールによる除蛋白以降は遊離体の分析と同様の操作を行って測定した。分析フローを図 1 に示す。

C-2 高感度一斉分析法の開発

分離には高分解能が期待できる HPLC を、検出器にはフェノール性の水酸基などの還元性物質に対して高感度が得られるアンペロメトリック型電気化学検出器(ECD)と、感度及び選択性に優れた MS/MS を用いて、一斉分析条件の検討を行った。

今回測定対象とした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、ECD では、紫外吸収検出器(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、5物質の分離条件と感度を検討した。ピーク面積はリン酸一カリウムの濃度が、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

5物質が良好に分離した。

また、ECDの印加電圧とピーク面積の関係を求めたところ、5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。

標準溶液における検出限界(S/N=3)は、50 µL 注入で0.2 ng/ml(10 pg)で、検量線も、0.2 ng/ml から 100 ng/ml の範囲で良好な直線性が得られた。しかし、酵素処理後の検体では妨害ピークが見られ、また高感度域ではグラジエント溶出ではベースラインが安定しないことから、アイソクラチックの分析に限られ分析時間が長くなった。HPLC-ECDの分析条件を表1に、標準溶液及びマウス血清のクロマトグラム例を図2に示す。

定量分析にはグラジエントが可能でより特異性の高いLC/MS/MSによる分析法を検討した。ESI ネガティブモードを用い、カラムに Inertsil ODS-3 (2.1×150mm)、移動相に 5 µM 酢酸アンモニウム含有メタノール(メタノール濃度 45~95%のグラジエント溶出)により測定した。移動相の酢酸アンモニウム濃度は、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0.5µM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5µMを用いることとした。開発した分析条件を表2及び表3に示す。絶対面積法により検量線を作成したところ、0.5 ng/mL 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3に検量線例を示す。検出限界(S/N=3)は物質により若干異なるが、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(表4)。血清及び乳汁に20ng/mL濃度添加したときの回収率は、6物質とも70%以上と良好な結果であった(表5)。

LC/MS/MSでは簡略な前処理操作でも妨害ピークはほとんどなく、高感度でかつ検量線は広い直線域を有しており、体内動態の測定に有用であった。LC/MS/MSによるマウス乳汁クロマトグラム例を図4に示す。

C-3 コントロール群及び操作ブランクの検出値

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。しかし、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。そこで、BPAについては投与したものを確実に測定するためにd16体を用いることとした。

C-4 投与実験

1) 単独皮下投与の投与後2時間目搾乳群 (n=5~8)

BPAの100mg/kg (n=5)では、血清中総量が18,000ng/mL(遊離体1,400)、乳汁中総量が4,000ng/mL(遊離体2,000)であった。遊離体の総量に対する割合は、血清6.9%、乳汁49%であった。

BPA、Genistein及びResveratrolの10mg/kg (n=5~8)では、乳汁中総量及び遊離体濃度は各々590ng/mL(遊離体520)、

96 ng/mL (遊離体 65)、1,400ng/mL (遊離体 1,100) であり、Genistein の検出値は他の 2 物質に比べて低かった (図 5)。3 物質とも遊離体の総量に対する割合は血清 (10.7~19.1%) より乳汁 (65.1~88.7%) で高い傾向が見られ (図 6)、遊離体の乳汁/血清比は、BPA 2.06、Genistein 2.07、Resveratrol 5.46、そして総量の乳汁/血清比は、BPA 0.34、Genistein 0.48、Resveratrol 0.75 であった (図 13-(a))。また、Genistein の検出値は他の 2 物質に比べて全体に 10 分の 1 低く、Resveratrol の乳汁中遊離体及び抱合体濃度は BPA に比べて約 2 倍と高い傾向が見られた。

さらに、BPA の 100mg/kg 投与群では 10mg/kg 投与群に比べて遊離体割合が小さいことから、代謝酵素誘導の可能性が考えられた。

2) 3 種混合皮下投与の投与後 2 時間目搾乳群 (n=7)

BPA、Genistein 及び Resveratrol の血清中総量及び遊離体濃度は各々 1,700 ng/mL (遊離体 180)、460 ng/mL (遊離体 110)、1,900 ng/mL (遊離体 200)、そして乳汁中総量及び遊離体濃度は各々 630 ng/mL (遊離体 360)、220 ng/mL (遊離体 150)、700 ng/mL (遊離体 370) であり (図 7)、遊離体の総量に対する割合は血清で 10.6~24.7%、そして乳汁で 50.7~68.7% であった (図 8)。単独投与と比較すると、BPA の検出値は同程度であったが、Genistein では単独投与に比べて遊離体、総量とも血清及び乳汁中で 2 倍程度高く検出された。反対に Resveratrol では血清中の各濃度及び乳汁中の抱合体は同程度であったが、乳汁中の遊離体の濃度が約 1/3 と低くなるなど、若干の値変化が見られ、混合投与における代謝酵素誘導等の相互作用の可能性が

考えられた。一方、遊離体及び総量の乳汁/血清比については、単独投与のものと同程度であった (図 13-(b))。

3) 混合経口投与の投与後 2 時間目搾乳群 (n=6)

BPA、Genistein 及び Resveratrol の血清中総量及び遊離体濃度は各々 270 ng/mL (遊離体 8.4)、180 ng/mL (遊離体 7.9)、310 ng/mL (遊離体 3.4) であり、乳汁中総量及び遊離体濃度は各々 110 ng/mL (遊離体 21)、170 ng/mL (遊離体 10)、120 ng/mL (遊離体 45) と皮下投与と同様に遊離体濃度は血清中より乳汁中で高い傾向を示した (図 9)。遊離体の総量に対する割合も血清中で 1.1~4.7%、乳汁中で 7.3~38.5% と、血清に比べて乳汁中では遊離体の割合が高かった (図 10)。混合皮下投与と比較すると、遊離体濃度は 1/8 以下の低い値で、遊離体の割合も血清中で 1.1~4.7%、乳汁中で 7.3~38.5% と、皮下投与に比べて抱合体の割合が大きかった。また、Genistein においては抱合体濃度が血清中では皮下投与時の 1/2 であったが、乳汁中では皮下投与時より高濃度で、BPA 及び Resveratrol に比べても有意に高く検出された。

4) 単独皮下投与の投与後 7 時間目搾乳群 (n=5~7)

BPA、Genistein 及び Resveratrol の血清中総量及び遊離体濃度は各々 850 ng/mL (遊離体 9.6)、390ng/mL (遊離体 85)、320 ng/mL (遊離体 32) であり、乳汁中総量及び遊離体濃度は各々 580 ng/mL (遊離体 38)、190 ng/mL (遊離体 120)、190 ng/mL (遊離体 43) であった (図 11)。投与後 2 時間目の搾乳群での検出値と比較すると、BPA 及び Resveratrol では遊離体濃度が減

少しだが Genistein ではむしろ高くなり、乳汁中の遊離体の総量に対する割合も BPA 及び Resveratrol に比べて大きく、有意な差が見られた (図 12)。Genistein では 2 時間目の値が低いことから他の 2 物質に比べて吸収が緩慢であることが示唆された。

D. 考察

D-1. HPLC-ECD 及び LC/MS/MS 分析条件の検討

今回測定対象とした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 (*J.Chromatogr. B*, 749, 17-23, 2000)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。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-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。

げっし目動物乳中には 10%近い蛋白質が含まれており、カートリッジの目詰まりなどにより目的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 (M.Sato et al., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1800-1805, 1997)。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(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) 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 0.02 ng/mL 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、約 0.004 ng/mL まで汚染を減らすことが出来た。

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、4.6×250mm のカラムを用いた。β- グルクロニダーゼ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。多成分一斉の定量には困難があったが、定性的な分析には有効であった。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 における BPA の分析では移動相中に酢酸を添加した報告（堀江ら、平成 14 年度厚生労働科学研究報告書）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、濃度が低い程感度が高くなり、0.5μM 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 5μM を用いることとした。グラジエント溶出条件では、メタノール濃度 95% 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. 投与実験

BPA の経口投与の場合、遊離体の血中濃度は、腹腔内及び皮下投与に比べて 1 桁から 2 桁低く（Pottenger L.H. et al., *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 1.5μg/mL の濃度の ¹⁴C-BPA が乳汁中に検出されたとの報告（Snyder R.W. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168, 225-234, 2000）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 年度厚生科学研究報告書）がある。

今回我々のデータも皮下投与と経口投与を比較すると、経口投与においては皮下投与に比べて遊離体濃度は 3 物質とも 1/8 以下、総量濃度も Genistein 以外は約 1/5 の低い値であった。遊離体の割合も血清中で 1.1~4.7%、乳汁中で 7.3~38.5% と、皮下投与の血清中 10.6~24.7%、乳汁中 50.7~68.7% に比べて低く、腸管での吸収率が低く、且つ肝臓における初回通過効果の大きいことが示唆された。また、Genistein においては抱合体濃度が血清中では皮下投与時の 1/2 であったが、乳汁中では皮下投与時より高濃度で、BPA 及び Resveratrol に比べても有意に高く検出されたことから、大豆イソフラボンは通常、マウスの餌の主要成分であり日常大量に暴露されていることから、マウスでの吸収・代謝機能が発達していることが考えられた。一方、Resveratrol は、今回個体差が大きく見られたが、イソフラボンと異なり摂取の機会の少ないことが関与している可能性も考えられるものの、その理由については今後の検討課題である。

以上の結果より、BPA、Genistein 及び Resveratrol に関しては、グルクロン酸抱合による代謝は早いものの、体内を循環している代謝物の濃度は経口投与の場合には特に遊離体に比べて非常に高いことが明らかになった。腸内細菌等による抱合体の分解と遊離体の再吸収があることも言われており、体内作用には抱合体の影

響も考えられるが、新生児や乳児における生体影響についての研究報告は見られないことから、今後さらに検討する必要があると思われる。

今回は、10mg/kgの投与で検討したが、日本人の総イソフラボンの摂取量は27.75mg/day(外海ら、平成10年度厚生科学研究報告書)、35mg/day程度(織田ら、平成11~13年度厚生科学研究総合研究報告書)と報告されており、最近、イソフラボンを高濃度に含む食品やサプリメントが市場に氾濫している状況から、今回の投与量に近い摂取も考えられる。しかし、BPAについては、成人の暴露量は1µg/kg/dayを超えない(Hirose A. et al., *Jpn. J. Food Chem.*, 10, 1-12, 2003)と報告されていることから、今回の投与量の1/10,000であり、抱合体を含めた検出量から考えても、母体が暴露したBPAの乳汁移行による内分泌かく乱の可能性はないと考えられる。しかし、植物エストロゲンであるGenisteinやResveratrolにおいても、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や、個体差が大きく見られたことは、代謝の未発達な新生児や乳児への影響を考えるとさらなる検討が必要と思われる。

E. 結論

1) HPLC-ECD及びLC/MS/MSを用いた生体試料(血清、乳汁)中のBPAと植物エストロゲン(Genistein、Daidzein Glycitein及びResveratrol)の高感度一斉分析法を開発した。いずれの方法においても高感度で、5物質の検出限界は1ng/mL以下で、検量線は広い直線域を有していた。

2) 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ところ、HPLC-ECDでは、妨害ピークが見

られたが、LC/MS/MSでは選択性が高いため妨害ピークはほとんど見られず、体内動態の測定に有用であると考えられた。

3) 単独皮下投与の投与後2時間目搾乳群ではBPA、Genistein及びResveratrolの乳汁中総量及び遊離体濃度の平均値は各々590ng/mL(遊離体520)、96ng/mL(遊離体65)、1,400ng/mL(遊離体1,100)であり、Genisteinの検出値は他の2成分に比べて低かった。3物質とも遊離体の総量に対する割合は血清より乳汁で高い傾向が見られた。また7時間目搾乳群においては、2時間目搾乳群に比べて、BPA及びResveratrolでは遊離体濃度が減少したがGenisteinではむしろ高くなり、他の2物質に比べて吸収が緩慢であることが示唆された。

4) 3種混合皮下投与においては、若干の値変動が見られ、相互作用が考えられたものの単独投与と同程度の検出値であった。

5) 3種混合経口投与においては、乳汁中総量及び遊離体濃度は各々110ng/mL(遊離体21)、170ng/mL(遊離体10)、120ng/mL(遊離体45)であり、混合皮下投与と比較すると、遊離体濃度は1/8以下の低い値で、皮下投与に比べて抱合体の割合が大きく、腸管からの吸収率が低く且つ肝臓における初回通過効果が大いことが示唆された。また、Genisteinにおいて乳汁中の抱合体が他の2物質より高く、マウスでは経口摂取における吸収・代謝機能が発達していることが考えられた。

6) BPA、Genistein及びResveratrolにおいては、グルクロン酸抱合による代謝は早いものの、体内を循環している代謝物の濃度は遊離体に比べて非常に高いことが明らかになった。腸内細菌等による抱

合体の分解と遊離体の再吸収があることも言われていることから、新生児や乳児における体内作用には抱合体の影響も考えられ、今後さらに検討する必要があると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

LC/MS/MSによるマウス血清、乳汁のビスフェノール A 及び植物エストロゲンの一斉分析法の開発：大前壽子、北田善三、茶山和敏、螺良愛郎、今井俊介、環境ホルモン学会第 7 回研究発表会、2004 年 12 月 14-15 日。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

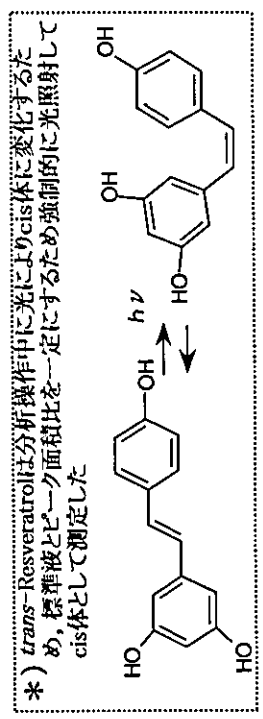
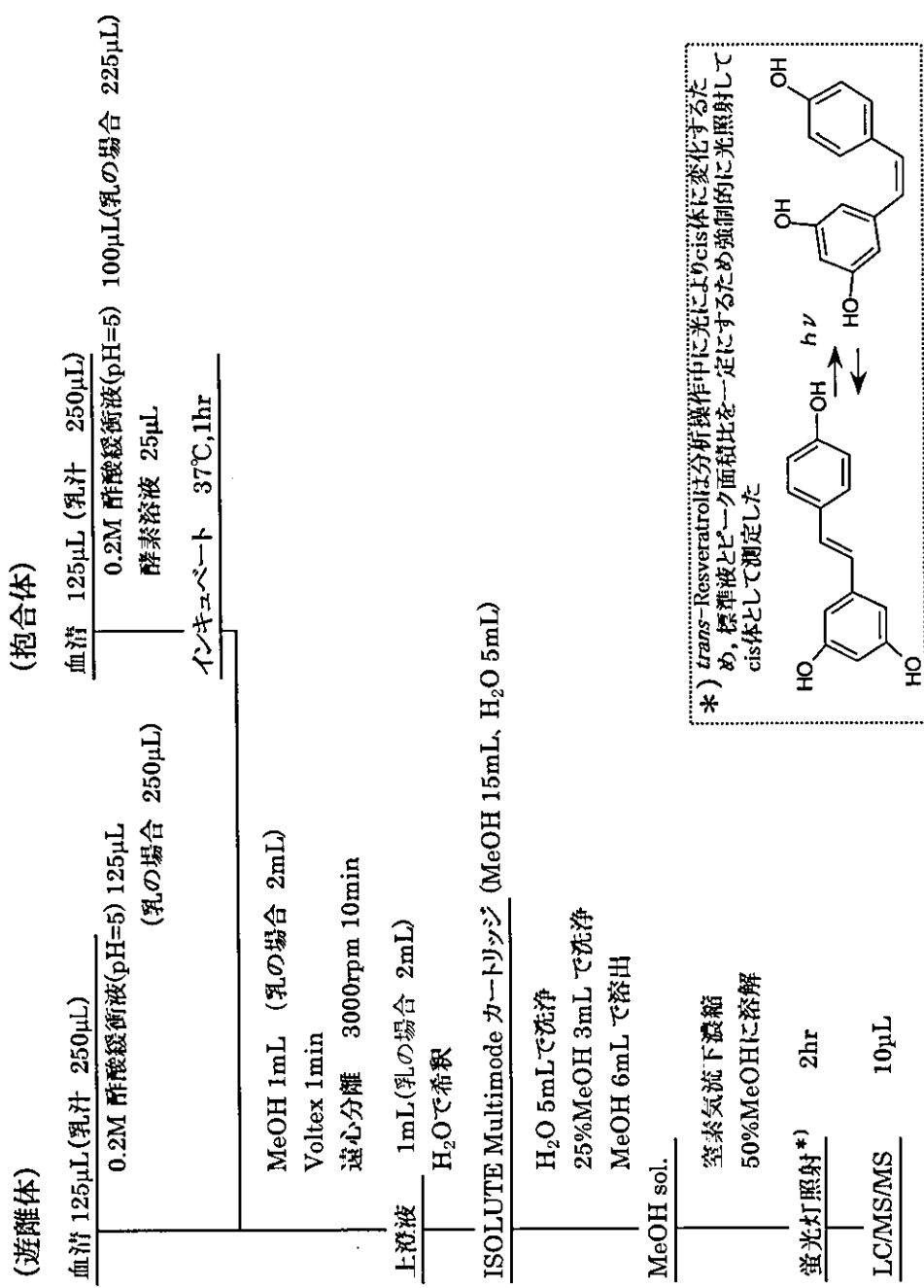


図1 分析のフロー図

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 (4.6mm i.d.×250mm) 5 μ m
移動相	0.025M KH ₂ PO ₄ -MeOH (52:48)
流速	0.8mL/min
カラム温度	40°C
印加電圧	850mV vs Ag/AgCl
注入量	50 μ L

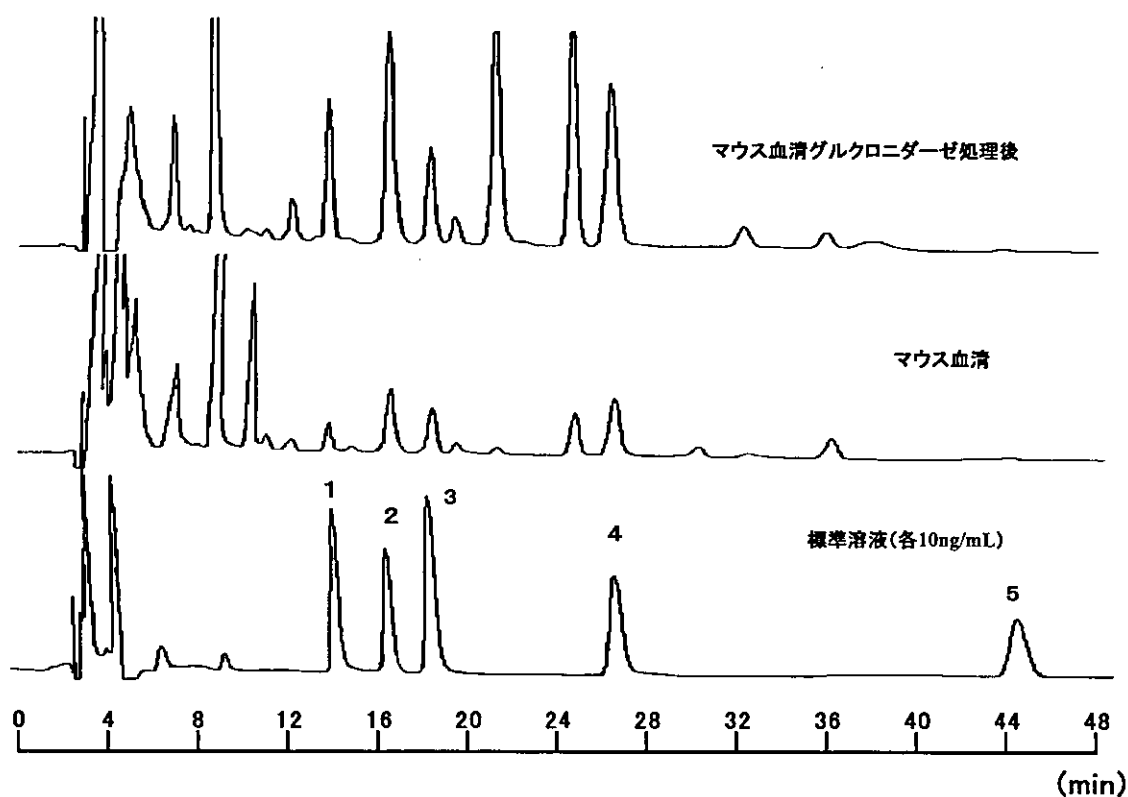


図 2 HPLC-ECD による標準溶液及び市販マウス血清のクロマトグラム

1:*cis*-Resveratrol, 2:Daidzein, 3:Glycitein, 4:Genistein, 5:BPA

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) 5µm
カラム温度	40 °C
流速	0.2mL/min
移動相	5µM CH ₃ COONH ₄ in 45-95% MeOH (グラジエント)
注入量	10µL
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

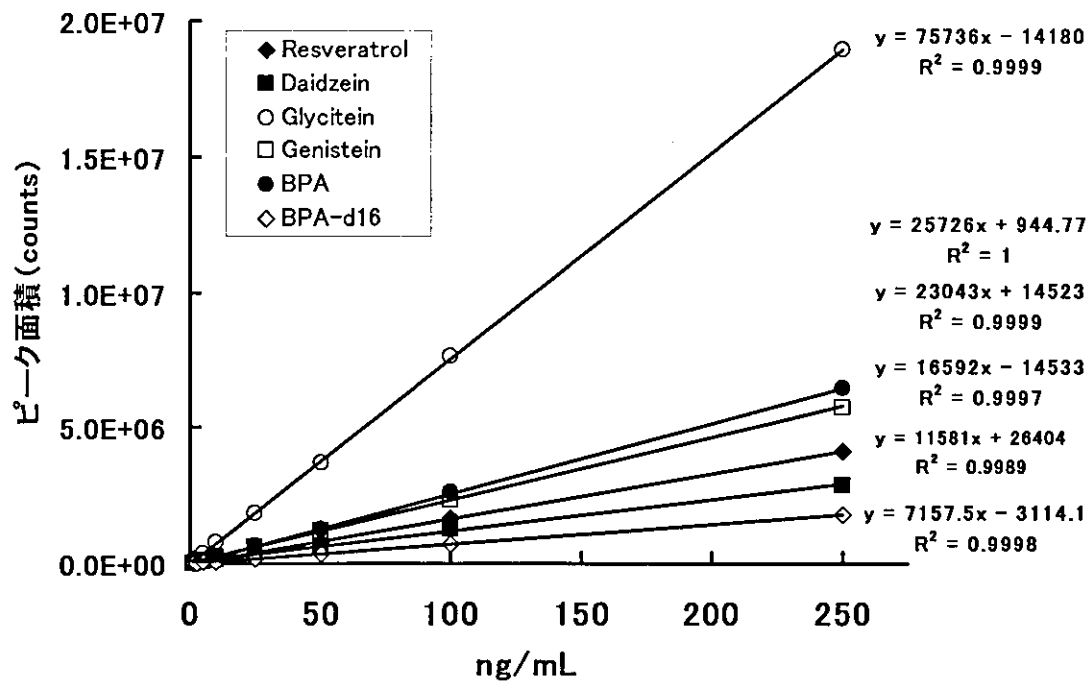


図3 LC/MS/MSによる検量線例

表4 LC/MS/MSにおける検出限界

(単位:ng/mL)

	検液	血清	乳汁
Resveratrol	0.2	0.4	0.5
Daidzein	0.1	0.2	0.25
Glycitein	0.05	0.1	0.125
Genistein	0.1	0.2	0.25
BPA	0.3	0.6	0.75
BPA-d16	1	2	2.5

血清:0.2mL、乳汁:0.5mLに定容した場合

表5 マウス血清及び乳汁における添加回収率

(n=3)

添加量:各20ng/mL	血清		乳汁	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Resveratrol	75.0 ± 4.2	(%)	84.6 ± 5.3	(%)
Daidzein	96.6 ± 9.3		106.8 ± 2.1	
Glycitein	94.9 ± 2.5		85.6 ± 0.4	
Genistein	94.9 ± 11.4		72.7 ± 10.7	
BPA	98.9 ± 9.8		107.3 ± 1.7	
BPA-d16	103.8 ± 10.9		105.4 ± 9.3	

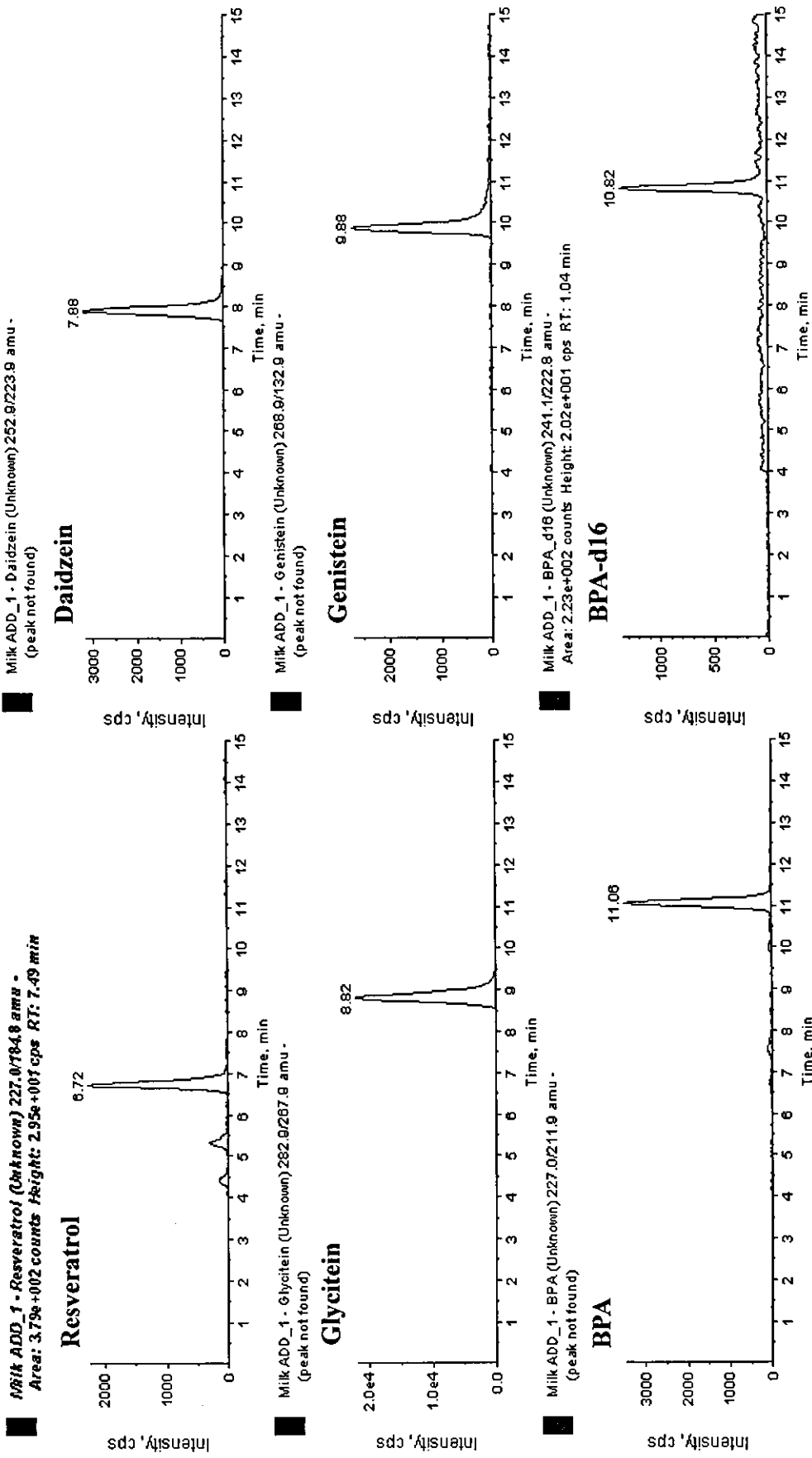


図4 LC/MS/MSによるマウス乳汁のクロマトグラム (乳汁に対して各20ng/mL濃度に添加した検体)