

牛肉中ステロイドホルモン測定を試料調製

橋本常生*, 神保勝彦*, 宮崎奉之**

Sample Preparation for Determination of Steroid Hormones in Beef by Radioimmunoassay

Tsuneo HASHIMOTO*, Katsuhiko JIMBO* and Tomoyuki MIYAZAKI**

Keywords: 牛肉beef, ステロイドホルモンsteroid hormones, エストラジオール-17 β estradiol-17 β , プロゲステロン progesterone, テストステロン testosterone, ラジオイムノアッセイ radioimmunoassay(RIA), 固相抽出カートリッジ solid phase extraction cartridge, 内分泌かく乱化学物質 endocrine disrupting chemicals

緒言

エストラジオール-17 β (EST), プロゲステロン(PRO), テストステロン(TES)などのステロイドホルモン(以下ホルモンと記す)は牛などの家畜の肥育促進剤として米国や豪州等で使用されている。これらのホルモンは女性ホルモン及び男性ホルモンとして生体中に天然に存在することから, FAO/WHOや日本では食肉に対して残留基準等は定められてなく, 通常の使用法であれば食品衛生上問題はないと考えられている。

近年, これらのホルモンは内分泌かく乱作用との関連で注目されており, また1999年のFAO/WHO合同食品添加物専門会議(JECFA)¹⁾ではpptレベルの低濃度で再評価され, ADIが設定された。

しかし, 現在実態調査に採用されている高速液体クロマトグラフィー(HPLC)^{2,3)}やガスクロマトグラフ/質量分析(GC/MS)^{4,5)}の分析では, pptレベル濃度の検出が困難である。一方, 高感度の分析法としてラジオイムノアッセイ(RIA)があるが, これらは臨床分析を対象としたものであり, 食肉に応用した例は少ない。そこで, 今回牛肉中のEST, PRO及びTESを対象とし, RIA測定のための簡便で迅速な試料調製法を検討した。

実験方法

1. 試料

市販の輸入牛肉を用いた。

2. 試薬類

標準品: EST, TES及びPROは和光純薬(生化学用)を使用した。

ゼロ濃度標準血清: EST用, TES用及びPRO用(Diagnostic Products Corporation社製)を使用した。

牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液: RIA用牛血清アル

ブミン(和光純薬)が0.5%となるよう0.1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 7.0)で溶解し使用した。

有機溶媒: アセトニトリル, メタノール, *n*-ヘキサン, イソプロパノール, シクロヘキサンはHPLC用を用いた。

固相抽出カートリッジ: Waters社製のSep-Pak[®] Vac C18(1 g/6 cc, 以下C18と略す)及びVarian社製のBond Elut[®] DEA(500 mg/3 cc, 以下DEAと略す)を使用した。

3. 装置

ホモジナイザー: Ultra-Tarrax T25(Janke kunkel Ika[®]-Labortechnik)。遠心分離機: LX-130((株)トミー精工)。固相抽出マニホールド(ジーエルサイエンス社製)

4. RIA測定

RIAは株式会社エスアールエル(SRL)社に測定を依頼した。

RIA使用キット: DPCエストラジオールキット, プロゲステロンキット及びトータルテストステロンキット(Diagnostic Products Corporation製)

5. 試料調製法

1) 抽出

試料(ミンチした牛肉)5.0 gを遠心管にとりアセトニトリル/メタノール(4:1)60 mLを加えてホモジナイズした後, 約3000 rpmで10分間遠心分離した。上清液を*n*-ヘキサン30 mLを用いて脱脂後, 下層を分取しイソプロパノールを20 mL加え, 35℃以下で減圧濃縮し, さらに窒素気流下で溶媒を完全に除いた。残留物にアセトニトリル/水(2:8)5 mLを加え十分に溶解させた。

2) 精製

(1)C18による精製 あらかじめアセトニトリル10 mL及びアセトニトリル/水(2:8)10 mLでコンディショニングしたC18カートリッジに上記の抽出残留物を負荷し, さらに, アセトニトリル/水(2:8)(3 mL及び2 mL)でカートリッジに負荷した。次に同混液10 mLで洗浄し, 減圧吸引(約5分間)

* 東京都立衛生研究所生活科学部乳肉衛生研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都立衛生研究所生活科学部

によりカートリッジを乾燥後、アセトニトリル10 mLで溶出した。この溶出液を約40 で窒素気流下で濃縮乾固した。(2)DEAによる分画 DEAカートリッジはあらかじめイソプロパノール/シクロヘキサン(5:95)10 mL及びシクロヘキサン10 mLでコンディショニングし、上記の濃縮残留物をシクロヘキサン約2 mLで負荷した。カートリッジをシクロヘキサン10 mLで洗浄後、イソプロパノール/シクロヘキサン(1:99)10mLでPRO及びTESを溶出し、続いてイソプロパノール/シクロヘキサン(5:95)11 mLでESTを溶出した。各分画液は約40 , 窒素気流下で濃縮乾固した。EST分画はEST用ゼロ濃度血清0.5 mLで、PRO・TES分画はPROまたはTES用ゼロ濃度血清1.0 mLで十分に溶解した。

結果及び考察

1. 試料調製法

著者らはHPLCでの分析法を開発し市販牛肉の調査を行ってきた³⁾。今回はRIAで低濃度を測定するための試料調製法をこれまでに我々が開発した手法を基礎として検討した。

1) 抽出方法

試料組織のタンパク変性をさせ、ホルモンを抽出させる目的でアセトニトリル/メタノール(4:1)を抽出溶媒に用いたが、試料によっては脂肪を多く含む場合があったため、*n*-ヘキサンで脱脂を行った。次に抽出液を減圧濃縮するとき生ずる突沸を防ぐため、イソプロパノールを添加し35 以下で濃縮を行ったところ、突沸が防止され操作性が向上した。

2) 精製法

これまででは、ケトステロイド(PRO, TES等)類とエストロゲン(EST等)類をDEAで分画後、Sephadex LH20カラムクロマトグラフィーで精製していたが、操作が煩雑で時間を要し、ベンゼンを使用するなど問題があった。そこで今回は簡便に操作ができる固相抽出カートリッジで精製後、DEAで分画する操作法を検討した。

(1) 固相抽出等による精製

精製操作で汎用される逆相系固相抽出カートリッジのC18^{6,7)}、Sep-Pak® Vac tC18(1 g/6 cc, 以下tC18と略す)⁸⁾、Oasis™HLB(200 mg/6 cc, 以下HLBと略す)⁹⁾及び多孔性ケイソウ土が充填されたExtrelut®-3(以下Extrelutと略す)での精製を検討した。

逆相系のカートリッジにアセトニトリル/水(2:8)10 mLでホルモンを負荷し、同混液10 mLで洗浄後アセトニトリル10 mLで溶出したところ、いずれも良好な回収が得られた。しかし実際の試料を負荷したところHLB及びtC18では試料が固相で目詰まりを起こし、負荷や洗浄に時間を要し操作性に問題が見られた。C18では負荷または洗浄時に多少減圧吸引を必要とする場合があったが、短時間で処理でき操作性は良好であった。C18における標準品の回収率はESTで95.4%, TESで99.1%, PROで99.1%であった。

Extrelutについては、水系試料から脂溶性化合物を抽出する方法を検討した。すなわちアセトニトリル/水(2:8)でホ

ルモンをExtrelutに負荷し酢酸エチルで溶出した。このときの回収率はESTで89.7%, TESで91.6%, PROで94.6%と良好であった。しかし、実際の試料では脂溶性の残留物が多く溶出され、C18より精製効果が劣ることから、精製にはC18を用いることとした。

(2) DEAによる分画

シクロヘキサン及びイソプロパノール/シクロヘキサン混液を用いホルモンの溶出を検討した、ホルモンをシクロヘキサンで負荷し、さらにシクロヘキサンで15 mL以上溶出したがいずれのホルモンも溶出しなかった。次にイソプロパノール/シクロヘキサン(1:99)で溶出したところ2 mLでPROが、3~8 mLでTESが溶出し、ESTは20 mL以上でも溶出されなかった。さらにイソプロパノール/シクロヘキサン(5:95)を流したところ11 mLでESTの溶出が完了した。以上の結果から、シクロヘキサン約2 mLでカラムに負荷し、シクロヘキサン10 mLで洗浄後イソプロパノール/シクロヘキサン(1:99)10 mLでPROとTESを溶出、イソプロパノール/シクロヘキサン(5:95)11 mLでESTを溶出させた。このときの回収率はESTが94.9%, TESが93.6%, PROが97.1%と良好な結果が得られた。

3) RIA測定用溶解溶液

今回用いたRIAキットは主に臨床試料を対象に開発されたものであり、血清または血漿から直接測定する方法である。牛肉の抽出精製残留物は血清や血漿の組成とは異なり、また、試料調製後の溶解溶液などの種類等によりRIA測定値に差がでる可能性がある。そのため試料調製後の残留物を溶解する溶液を検討した。

牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液^{10,11)}及びRIAキット付属のゼロ濃度標準血清にホルモン標準品を添加(EST: 20~1,800 pg/mL, TES: 200~16,000 pg/mL, PRO: 0.1~40 ng/mL)して、RIA測定値を比較した。牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液を用いて調製したEST標準液の20 pg/mL及び50 pg/mL溶液のRIA測定値がいずれも検出限界(10 pg/mL)以下となり、低濃度でのESTの検出が不可能であった。一方、ゼロ濃度標準血清を用いた場合はそれぞれ15.9 ± 2.8 pg/mL及び39.5 ± 6.1 pg/mL(n=5)と添加濃度より多少低く測定される傾向がみられたが、検出することが可能であった。またPRO, TESについてもゼロ濃度標準血清を用いた場合の方が、より添加濃度に近い値を得ることができたため、試料調製後の溶解溶液には各ホルモンのゼロ濃度標準血清を用いる方がより誤差の少ない測定結果が得られると考えられる。またTES及びPROのゼロ濃度標準血清は同じ組成であり、試料調製でのTES・PRO分画は同一の標準血清で溶解しTES及びPROを測定することができた。

2. 検出限界

RIAの検出限界はESTは10 pg/mL, TESは50 pg/mL, PROは0.2 ng/mLであり、本試料調製による牛肉中の検出限界は1 ppt(EST), 10 ppt(TES), 0.04 ppb(PRO)であった。

3. 添加回収実験

牛肉試料にホルモンを添加し、本法で試料調製後、RIA

表1. RIAによるホルモンの添加回収

化合物	添加濃度	RIA測定値 (平均±標準偏差)	回収率 (%)
エストラジオ - ル-17β	0	2.9±0.4	-
	5	7.4±0.8	90.0
	50 (ppt)	35.2±6.1	64.6
テストステロン	0	10未満	-
	40	35.4±6.8	63.5~88.5
	200 (ppt)	159.4±16.5	74.7~79.7
プロゲステロン	0	0.38±0.06	-
	0.4	0.71±0.13	82.5
	4.0 (ppb)	3.76±0.20	84.5

n=5

で測定しその結果を表1に示した。また無添加(ブランク)試料の測定値を各添加試料の測定値より差し引いて回収率を求めたところEST5 ppt添加で90.0%、50 ppt添加で64.8%であった。ESTの添加濃度による回収率の差は、添加濃度の5 pptとブランク濃度の2.9 pptが近い値であり、ブランク濃度を差し引いて回収率を求めたため、測定誤差が大きく影響したものと考えられる。TESでは、ブランクの濃度が検出限界(10 ppt)以下で、0~10 pptで計算したため、回収率は40 pptで63.5~88.5%、200 pptで74.7~79.7%の範囲を示した。PROでは0.4及び4 ppb添加で80%以上の回収が得られた。

ま と め

牛肉中のEST, TES及びPROをRIAで測定するための試料調製法を検討した。試料をアセトニトリル/メタノール(4:1)で抽出し、*n*-ヘキサンで脱脂後、固相抽出(Sep Pak® Vac C18及びBond Elut® DEA)カートリッジで精製して試料調製を行った。牛肉にEST(5及び50 ppt), TES(40及び200 ppt), PRO(0.4及び4 ppb)を添加し、本法で調製した試料をRIAで測定したときの回収率は60~90%の範囲であった。牛肉での検出限界はエストラジオール-17βで1 ppt, テストステロンで10 ppt, プロゲステロンで0.04 ppbと高感度な分析が可能である。牛生体中のホルモンは雌雄, 性周期, 年齢, 肥育用ホルモン剤使用の有無などの要因で変動すると考えられ、牛肉中のホルモン濃度の変動範囲や変動要因を解析する上で本法は有効な分析法である。

(本研究は平成10年度厚生科学研究補助金(生活安全総合研究事業)「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」の一部である。)

文 献

- 1) 厚生省医薬局食品保健部監視安全課：畜水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年度厚生科学研究費補助金厚生科学特別研究事業の事業実績報告書
- 2) 厚生省生活衛生局監修：食品衛生検査指針 理化学編, p452-459, 1991.
- 3) 宮崎奉之, 笹本剛生, 橋本常生 他：食衛誌, 36(6), 786-753, 1995.
- 4) Hartmann, S., Steinhart, H.: *J. Chromatogr. B*, 704 (1-2), 105-117, 1997.
- 5) Hartmann, S., Lacorn, M., Steinhart, H.: *Food Chemistry*, 62(1), 7-20, 1998.
- 6) Tsujioka, T., Ito, S., Ohga, A.: *Res. Vet. Sci.*, 52, 105-109, 1992.
- 7) 貫山道子, 谷 孝之, 中岡正吉：第34回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p54-55, 1997.
- 8) 長南隆夫, 西村一彦, 平間祐志：日本食品衛生学会第75回学術講演会要旨集, p52, 1998.
- 9) 堀江正一, 吉田栄充, 斉藤貢一 他：食衛誌, 39(6), 383-389, 1998.
- 10) 橋本常生, 宮崎奉之, 伊藤 武 他：食衛誌, 34(3), 211-215, 1993.
- 11) Klingler, W., Postel, G., Haupt, O. *et al.* : *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 311, 352-353, 1982.