

内閣府食品安全委員会
平成15年度食品安全確保総合調査

食品のリスク管理の実施状況に関する調査報告書

(市販牛乳及び脱脂粉乳中における牛の性ホルモンの含有量実態調査調査分)

平成16年3月

財団法人 日本食品分析センター

目 次

1	調査の目的	1
2	調査の実施場所	1
3	調査の内容	1
4	調査方法	
4.1	検体	2
4.2	試験方法	6
5	調査結果	17
5.1	牛乳	17
5.2	脱脂粉乳	25
5.3	抱合体等の含有量検討調査	30
6	検討事項	
6.1	エライザー法（エストロゲン）	33
6.1.1	検量線	33
6.1.2	各性ホルモンの感度	33
6.1.3	添加回収試験	34
6.1.4	再現性	34
6.2	エライザー法（プロゲステロン）	35
6.2.1	検量線	35
6.2.2	その他のホルモンの感度	35
6.2.3	添加回収試験	36
6.2.4	再現性	36
6.3	精密分析	37
6.3.1	検量線	37
6.3.2	検出限界の確認	39
6.3.3	添加回収試験	40
6.3.4	再現性	41
6.3.5	クロマトグラム	41
7	まとめ	50

食品のリスク管理の実施状況に関する調査

(市販牛乳及び脱脂粉乳中における牛の性ホルモンの含有量実態調査)

1. 調査の目的

国内に流通している牛乳及び脱脂粉乳中に含有される牛の性ホルモン(17 β 及び17 α -エストラジオール, エストロン, エストリオール並びにプロゲステロン)の含有量を調査する。

2. 試験実施場所

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
東京都多摩市永山6丁目11番10号

3. 調査の内容

3.1 市販牛乳中の牛の性ホルモンの含有量調査

牛乳100検体について、検体中の17 β 及び17 α -エストラジオール, エストロン, エストリオール並びにプロゲステロン含有量の測定を、エライザー法(スクリーニング試験)により実施した。なお、エライザー法による測定については17 β 及び17 α -エストラジオール, エストロン, エストリオールの合計量を測定するキット(エストロゲン(E1/E2/E3)ELISAキット[日本エンバイロケミカルズ株式会社])及びプロゲステロンを単独で測定するキット(Progesterone EIA Kit[Cayman Chemical Company])を用いた。さらにそのうちの任意に選択した30検体について、各性ホルモンを個別に測定する機器分析による精密分析を実施した。

3.2 脱脂粉乳中の牛の性ホルモンの含有量調査

脱脂粉乳26検体について、検体中の17 β 及び17 α -エストラジオール, エストロン, エストリオール並びにプロゲステロン含有量を、エライザー法(スクリーニング試験)及び機器分析により測定した。

3.3 抱合体等の含有量検討調査

精密分析を実施した牛乳について、エストロンの硫酸抱合体及び17 β 及び17 α -エストラジオールのグルクロン酸抱合体の含有量を測定した。

4. 調査方法

4.1 検体

4.1.1 牛乳

日本全国の小売店から計100検体を購入した。

表-4.1.1a～cに検体の一覧を示した。

表-4.1.1a 検体の一覧（牛乳）

検体番号	殺菌方法	消費期限	購入場所
1	130 2秒間	2004.3.21	東京(立川)
2	120 2秒間	2004.3.16	東京(立川)
3	130 2秒間	2004.3.17	東京(立川)
4	130 2秒間	2004.3.17	東京(立川)
5	125 2秒間	2004.3.17	東京(立川)
6	130 2秒間	2004.3.17	東京(立川)
7	130 2秒間	2004.3.17	東京(立川)
8	130 2秒間	2004.3.18	東京(立川)
9	120 2秒間	2004.3.20	東京(立川)
10	130 2秒間	2004.3.23	東京(立川)
11	130 2秒間	2004.3.20	東京(立川)
12	130 2秒間	2004.3.21	東京(立川)
13	130 2秒間	2004.3.20	東京(立川)
14	75 15秒間	2004.3.20	東京(立川)
15	74 15秒間	2004.3.18	東京(立川)
16	66 30分間	2004.3.19	東京(立川)
17	66 30分間	2004.3.19	東京(立川)
18	65 30分間	2004.3.18	東京(立川)
19	63 30分間	2004.3.18	東京(立川)
20	63 30分間	2004.3.17	東京(立川)
21	130 2秒間	2004.3.17	東京(新宿)
22	130 2秒間	2004.3.21	東京(新宿)
23	130 2秒間	2004.3.21	東京(新宿)
24	130 2秒間	2004.3.20	東京(新宿)
25	130 2秒間	2004.3.21	東京(新宿)
26	130 2秒間	2004.3.24	東京(新宿)
27	65 30分間	2004.3.18	東京(新宿)
28	65 30分間	2004.3.17	東京(新宿)
29	65 30分間	2004.3.19	東京(新宿)
30	125 2秒間	2004.3.20	東京(新宿)

表-4.1.1b 検体の一覧（牛乳）

検体番号	殺菌方法	消費期限	購入場所
31	130 2秒間	2004.3.26	名古屋
32	130 2秒間	2004.3.20	名古屋
33	130 2秒間	2004.3.29	名古屋
34	130 2秒間	2004.3.25	名古屋
35	120 2秒間	2004.3.21	名古屋
36	130 2秒間	2004.3.23	名古屋
37	130 2秒間	2004.3.20	名古屋
38	130 2秒間	2004.3.20	名古屋
39	130 2秒間	2004.3.23	名古屋
40	130 2秒間	2004.3.20	名古屋
41	65 30分間	2004.3.19	名古屋
42	65 30分間	2004.3.18	名古屋
43	65 30分間	2004.3.17	名古屋
44	65 30分間	2004.3.18	名古屋
45	65 30分間	2004.3.18	名古屋
46	65 30分間	2004.3.19	大阪
47	65 30分間	2004.3.18	大阪
48	130 2秒間	2004.3.20	大阪
49	65 30分間	2004.3.19	大阪
50	130 2秒間	2004.3.20	大阪
51	130 2秒間	2004.3.22	大阪
52	130 2秒間	2004.3.22	大阪
53	65 30分間	2004.3.20	大阪
54	65 30分間	2004.3.19	大阪
55	130 2秒間	2004.3.21	大阪
56	130 2秒間	2004.3.23	大阪
57	130 2秒間	2004.3.28	大阪
58	130 2秒間	2004.3.20	大阪
59	130 2秒間	2004.3.24	大阪
60	130 2秒間	2004.3.23	大阪
61	130 2秒間	2004.3.28	大阪
62	130 2秒間	2004.3.23	大阪
63	130 2秒間	2004.3.23	大阪
64	130 2秒間	2004.3.27	大阪
65	135 2秒間	2004.3.24	大阪

表-4.1.1c 検体の一覧（牛乳）

検体番号	殺菌方法	消費期限	購入場所
66	130 2秒間	2004.3.27	大阪
67	130 2秒間	2004.3.25	大阪
68	130 2秒間	2004.3.22	大阪
69	130 2秒間	2004.3.28	大阪
70	130 2秒間	2004.3.25	大阪
71	130 2秒間	2004.3.23	大阪
72	65 30分間	2004.3.21	大阪
73	63 30分間	2004.3.20	大阪
74	65 30分間	2004.3.20	大阪
75	65 30分間	2004.3.22	大阪
76	130 2秒間	2004.3.22	仙台
77	130 2秒間	2004.3.24	仙台
78	130 2秒間	2004.3.22	仙台
79	120 2秒間	2004.3.23	仙台
80	120 2秒間	2004.3.24	仙台
81	130 2秒間	2004.3.23	仙台
82	130 2秒間	2004.3.26	仙台
83	63 30分間	2004.3.21	仙台
84	65 30分間	2004.3.21	仙台
85	72 15秒間	2004.3.21	仙台
86	130 2秒間	2004.3.28	千歳
87	120 2秒間	2004.3.28	千歳
88	120 2秒間	2004.3.26	千歳
89	130 2秒間	2004.3.26	千歳
90	130 2秒間	2004.3.30	千歳
91	130 2秒間	2004.3.25	千歳
92	130 2秒間	2004.3.27	千歳
93	120 2秒間	2004.3.30	千歳
94	120 2秒間	2004.3.26	千歳
95	130 2秒間	2004.3.27	千歳
96	85 30分間	2004.3.25	千歳
97	75 15分間	2004.3.26	千歳
98	72 15秒間	2004.3.23	千歳
99	80 20分間	2004.3.23	千歳
100	65 30分間	2004.3.26	千歳

4.1.2 脱脂粉乳

脱脂粉乳を使用している工場を中心に，26検体を収集した。

表4.1.2に検体の一覧を示した。

表-4.1.2 検体の一覧（脱脂粉乳）

検体番号	商品名	原産国
1	国産 1	日本
2	国産 2	日本
3	国産 3	日本
4	国産 4	日本
5	国産 5	日本
6	国産 6	日本
7	国産 7	日本
8	国産 8	日本
9	国産 9	日本
10	国産 10	日本
11	国産 11	日本
12	国産 12	日本
13	国産 13	日本
14	国産 14	日本
15	国産 15	日本
16	輸入 1	ニュージーランド
17	輸入 2	ニュージーランド
18	輸入 3	アメリカ
19	輸入 4	アメリカ
20	輸入 5	オーストラリア
21	輸入 6	オーストラリア
22	輸入 7	ドイツ
23	輸入 8	ドイツ
24	輸入 9	チェコ
25	輸入 10	カナダ
26	輸入 11	カナダ

4.2 試験方法

4.2.1 エライザー法

4.2.1.1 器具及び装置

遠心分離管(50 ml容)

分液漏斗(150 ml容)

ナス形フラスコ(100 ml容, 25 ml容)

パスツールピペット

駒込ピペット

メスシリンダー

ガラス漏斗

ガラス試験管

振とう機

減圧濃縮器

恒温器

マイクロプレートリーダー

マイクロピペット(1000 µl容, 200 µl容, 100 µl容, 20 µl容)

マイクロプレート用洗浄器

4.2.1.2 試薬

エストロゲン(E1/E2/E3)ELISAキット

[日本エンバイロケミカルズ株式会社 Lot No.T02WN02]

Progesterone EIA Kit [Cayman Chemical Company Lot No.99632]

アセトン, メタノール, アセトニトリル及びジクロロメタン

(残留農薬試験用(以下PR用))

アセトニトリル(高速液体クロマトグラフ用(以下HPLC用))

水: 純水製造装置(逆浸透膜, イオン交換樹脂, 活性炭及び精密ろ過膜)にて
製造した水

ジクロロメタン及びメタノールの混液(9:1)

水及びメタノールの混液(1:1及び9:1)

17-エストラジオール標準品[和光純薬工業株式会社]

17-エストラジオール標準品[Riedel-de-haen]

エストリオール標準品[和光純薬工業株式会社]

エストロン標準品[和光純薬工業株式会社]

プロゲステロン標準品[和光純薬工業株式会社]

ジエチルアミノプロピルカートリッジカラム(BOND ELUT DEA) (500 mg)[Varian]

4.2.1.3 操作

4.2.1.3.1 牛乳

- 1) エストロゲン (17 β 及び 17 α -エストラジオール, エストロン, エストリオール)

試料10 gを50 mlの遠心分離管に採取し, アセトニトリル30 mlを加えて20分間振とう抽出を行った。2500 r/minで5分間遠心分離後, 上澄み液を綿栓ろ過し, 水30 ml及びジクロロメタン30 mlを加え, 手でゆるやかに振とうした。ジクロロメタン層を分取し, ロータリーエバポレーターを用いて40 $^{\circ}$ C以下で減圧乾固した。残留物をジクロロメタン3 mlに溶解させた後, ジクロロメタン10 mlにて予備洗浄を行ったジエチルアミノプロピルカートリッジカラムに負荷した。ジクロロメタン6 mlで洗浄後, ジクロロメタン及びメタノールの混液(9:1) 8 mlで溶出させた。溶出液を減圧乾固し, 残留物を水及びメタノールの混液 (1:1) 0.25 mlに溶解し, エライザー測定用試験溶液とした。

- 2) プロゲステロン

試料10 gを50 mlの遠心分離管に採取し, アセトニトリル30 mlを加えて20分間振とう抽出を行った。2500 r/minで5分間遠心分離後, 上澄み液を綿栓ろ過し, 水30 ml及びジクロロメタン30 mlを加え, 手でゆるやかに振とうした。ジクロロメタン層を分取し, ロータリーエバポレーターを用いて40 $^{\circ}$ C以下で減圧乾固した。残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 1 mlに溶解し, エライザー測定用試験溶液とした。

4.2.1.3.2 脱脂粉乳

- 1) エストロゲン

試料5 gを50 mlの遠心分離管に採取し, 水10 mlを加え混合した。アセトニトリル30 mlを加えて20分間振とう抽出を行った。2500 r/minで5分間遠心分離後, 上澄み液を綿栓ろ過し, 水30 ml及びジクロロメタン30 mlを加え, 手でゆるやかに振とうした。ジクロロメタン層を分取し, ロータリーエバポレーターを用いて40 $^{\circ}$ C以下で減圧乾固した。残留物をジクロロメタン3 mlに溶解させた後, ジクロロメタン10 mlにて予備洗浄を行ったジエチルアミノプロピルカートリッジカラムに負荷した。ジクロロメタン6 mlで洗浄後, ジクロロメタン及びメタノールの混液(9:1) 15 mlで溶出させた。溶出液を減圧乾固し, 残留物を水及びメタノールの混液 (1:1) 0.25 mlに溶解し, エライザー測定用試験溶液とした。

- 2) プロゲステロン

試料5 gを50 mlの遠心分離管に採取し, 水10 mlを加え混合した。アセトニトリ

ル30 mlを加えて20分間振とう抽出を行った。2500 r/minで5分間遠心分離後，上澄み液を綿栓ろ過し，水30 ml及びジクロロメタン30 mlを加え，手でゆるやかに振とうした。ジクロロメタン層を分取し，ロータリーエバポレーターを用いて40℃以下で減圧乾固した。残留物を水及びメタノールの混液（1：1）1 mlに溶解し，エライザー測定用試験溶液とした。

4.2.1.4 エライザー測定

1) エストロゲン

エライザー測定用試験溶液 50 μ l に水 150 μ l を加え，よく混合し，エストロゲン測定用試験溶液とした。キット付属のマイクロプレートに標準溶液，試験溶液各 100 μ l を所定のウェルに加えた。さらに，各ウェルに抗原酵素複合体溶液を 100 μ l ずつ加え良く混合した。これらのウェルはキット付属のプレートフィルムでシールを施した後，22℃の恒温器中で 60 分間反応させた。反応後，ウェル中の未反応物を含む溶液を除いた後，マイクロプレート用洗浄器を用いて洗浄用緩衝液 300 μ l によりウェルを 5 回洗浄した。洗浄が終了したプレートをペーパータオル上で反転させ，軽くたたきつけながら残存する洗浄液を完全に除去した。各ウェルには発色基質溶液 100 μ l を加え，22℃の恒温器中で 30 分間反応させた後，反応停止液 100 μ l を各ウェルに加えて酵素反応を止めた後，速やかにマイクロプレートリーダーに設置し，450 nm での吸光度を測定した。

2) プロゲステロン

エライザー測定用試験溶液 20 μ l にキット付属の EIA Buffer 980 μ l を加え，よく混合した。さらにこの希釈液 20 μ l に EIA Buffer 780 μ l 加えよく混合し，プロゲステロン測定用試験溶液とした。キット付属のマイクロプレートに標準溶液，試験溶液各 50 μ l を所定のウェルに加えた。

ここで 50 μ l の Progesterone AChE Tracer (progesterone \cdot acetylcholinesterase 複合体)溶液を TA(Total activity)及び Blank 測定用ウェル以外のウェルに加え，さらに Progesterone Antiserum 溶液 50 μ l を Blank，TA 及び NSB(Non-Specific Binding) 測定用ウェル以外のすべてのウェルに加えてよく混合した。これらのウェルはキット付属のプレートフィルムでシールを施した後，22℃の恒温器中で 60 分間反応させた。反応後，ウェル中の未反応物を含む溶液を除いた後，マイクロプレート用洗浄器を用いて洗浄用緩衝液 300 μ l によりウェルを 5 回洗浄した。洗浄が終了したプレートをペーパータオル上で反転させ，軽くたたきつけながら残存する洗浄液を完全に除去した。Progesterone AChE Tracer 溶液 5 μ l を TA

ウェルに加えた後，全ウェルに発色試薬である Ellman's Reagent 200 μ l を加え，22 の恒温器中で 90 分間反応させた後，速やかにマイクロプレートリーダーに設置し，412 nm での吸光度を測定した。

4.2.1.5 標準溶液の調製及び検量線の作成

各キット付属の標準原液(エストロゲン，プロゲステロンともに100 ng/ml)を用いて，標準溶液を調製した。エストロゲン標準原液は水及びメタノールの混液(9：1)を用いて0.05 ng/ml～3.0 ng/ml，プロゲステロン標準原液はキット付属のEIA Bufferを用いて0.0078 ng/ml～1.0 ng/mlにそれぞれ希釈して，標準溶液とした。

各標準溶液を本操作に従って測定し，その濃度と吸光度から4パラメータによるロジスティック曲線の検量線を作成した。

4.2.1.6 濃度の算出

マイクロプレートリーダー付属のソフトを利用して自動解析を行い，4.2.1.5で作成した検量線から試験溶液中の各ホルモン濃度を求め，次式により，検体中の各ホルモン濃度を算出した。

検体中の各ホルモン濃度 (ng/g)

$$= \text{試験溶液中の各ホルモン濃度 (ng/ml)} \times \text{希釈率} \times \text{最終液量 (ml)} / \text{検体採取量 (g)}$$

4.2.1.7 検出限界

エライザー測定におけるそれぞれのキットについて以下の式に当てはまるような標準溶液濃度を最小検出濃度とした。なお，エストロゲン測定キットではキット付属の17 β -エストラジオールを標準品として使用した。

標準溶液 0 ng/mlの吸光度値 >

$$\text{標準溶液測定吸光度値の標準偏差} \times 10 + \text{標準溶液測定吸光度値の平均値}$$

その結果，エストロゲン測定キットにおける最小検出濃度は0.05 ng/ml，プロゲステロン測定キットでは0.03 ng/mlとなった。よって検体における検出限界は次式により算出され，0.005 ng/g(エストロゲン)及び0.003 ng/g(プロゲステロン)となった。

$$\text{エストロゲン} \quad 0.05 \text{ ng/ml} \times 4 \times 0.25 / 10 \text{ g} = 0.005 \text{ ng/g}$$

$$\text{プロゲステロン} \quad 0.03 \text{ ng/ml} \times 4 \times 0.25 / 10 \text{ g} = 0.003 \text{ ng/g}$$

4.2.2 精密分析(機器分析)

4.2.2.1 器具及び装置

遠沈管(100 ml容, 200 ml容)

分液漏斗(300 ml容)

ナス形フラスコ(200 ml容)

パスツールピペット

メスシリンダー

ガラス漏斗

振とう機

減圧濃縮器

ゲル浸透クロマトグラフ

試験管

インキュベーター

4.2.2.2 試薬

アセトン, メタノール, アセトニトリル, ジクロロメタン,

酢酸エチル及びヘキサン(以上 残留農薬試験用(以下PR用))

メタノール(高速液体クロマトグラフ用(以下HPLC用))

-グルクロニダーゼ(9,800単位)溶液(生化学分析用)

スルファターゼ(3,500単位)

水: 純水製造装置(逆浸透膜, イオン交換樹脂, 活性炭及び精密ろ過膜)にて製造した水

シクロヘキサン, 塩化ナトリウム, 酢酸, 酢酸ナトリウム(以上 特級)

ジクロロメタン及びメタノール(PR用)の混液(9:1)

ヘキサン及びジクロロメタンの混液(1:1)

ジクロロメタン及びアセトンの混液(95:5)

シクロヘキサン及び酢酸エチルの混液(8:2)

水及びメタノール(HPLC用)の混液(1:1)

0.5 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5): 酢酸ナトリウム41 gを水1 Lに溶解し, 酢酸12 mlを加えpH 5に調整した。

0.1 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液: 0.5 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5) 50 mlに水200 mlを加えて調製した。

スルファターゼ(62.5単位/100 µl): スルファターゼ(3,500単位)5 mlに0.1 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液を23 ml加えて調製した。

-グルクロニダーゼ(700単位/100 µl): -グルクロニダーゼ(9,800単位)溶液2 mlに0.1 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液を26 ml加えて調製した。

標準物質：17 β -エストラジオール標準品[Riedel-de Haan]
17 α -エストラジオール標準品[Riedel-de Haan]
エストリオール標準品[和光純薬工業株式会社]
エストロン標準品[和光純薬工業株式会社]
プロゲステロン標準品[和光純薬工業株式会社]
-エストラジオール17 β -(-D-glucuronide) [SIGMA ALDRICH]
エストロン3-サルフェートナトリウム[SIGMA ALDRICH]

サロゲート物質：17 β -エストラジオール-¹³C₄標準品[林純薬工業株式会社]
エストリオール-¹³C₄標準品[林純薬工業株式会社]
エストロン-¹³C₄標準品[林純薬工業株式会社]
プロゲステロン-d₉標準品[CDN]

フロリジルカートリッジカラム：Sep-pak plus Florisil (910 mg) [Waters]
ジエチルアミノプロピルカートリッジカラム (BOND ELUT DEA)
(500 mg) [Varian]

4.2.2.3 操作

4.2.2.3.1 牛乳

試料 20 g を 100 ml の遠沈管に採取し，サロゲート物質(エストロゲン：各 5 ng，プロゲステロン：250 ng)を添加し混合した。アセトニトリル 50 ml を加えて 20 分間振とう抽出を行った。2,500 r/min で 5 分間遠心分離後，上澄み液を綿栓ろ過し，水 150 ml 及びヘキサン 50 ml を加え，手で緩やかに振とうした。水層を分取し，塩化ナトリウム 15 g 及びジクロロメタン 60 ml を加え 5 分間振とうした。有機溶媒層を分取し，水層にはジクロロメタン 30 ml を加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返した。有機溶媒層を合わせ，無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過した。ロータリーエバポレーターを用いて 40℃以下で約 0.5 ml まで減圧濃縮した後，窒素ガスを緩やかに吹き付けて乾固した。ジエチルアミノプロピルカートリッジカラムにジクロロメタン 4 ml を流し予備洗浄を行った後，残留物をジクロロメタン 2 ml に溶解後負荷し，ジクロロメタン 6 ml で溶出した(プロゲステロン画分)。次いでジクロロメタン及びメタノールの混液(9:1)4 ml で溶出した(エストロゲン画分)。エストロゲン画分溶出液に窒素ガスを通じて乾固し，残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 1 ml に溶解した後，ヘキサン 1 ml を加え振とうし洗浄を行った。遠心分離(2,500 r/min, 5 分間)後，水層を分取し，これをエストロゲン用試験溶液とした。また，プロゲステロン画分溶出液

に窒素ガスを通じて乾固し，残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 5 ml に溶解した後，ヘキサン 2 ml を加え振とうし洗浄を行った。遠心分離 (2,500 r/min, 5 分間) 後，水層を分取し，これをプロゲステロン用試験溶液とした。各々の試験溶液を液体クロマトグラフ-質量分析計に注入し，定量を行った。

4.2.2.3.2 脱脂粉乳

試料 20 g を 200 ml の遠沈管に採取し，水 15 ml 及びサロゲート物質(エストロゲン：各 5 ng，プロゲステロン：250 ng)を添加し混合した。アセトニトリル 50 ml を加えて 2 分間ホモジナイズ抽出を行った。2,500 r/min で 5 分間遠心分離後，上澄み液に水 150 ml 及びヘキサン 50 ml を加え，手で緩やかに振とうした。水層を分取し，塩化ナトリウム 15 g 及びジクロロメタン 60 ml を加え 5 分間振とうした。全有機溶媒層を分取し，水層にはジクロロメタン 30 ml を加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返した。全有機溶媒層を合わせ，無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過した。ロータリーエバポレーターを用いて 40 以下で約 0.5 ml まで減圧濃縮した後，窒素ガスを緩やかに吹き付けて乾固した。残留物をシクロヘキサン及び酢酸エチルの混液(8:2) 10 ml に溶解し，フィルターろ過した。ろ過液 5 ml をゲル浸透クロマトグラフに注入し，分取した画分をロータリーエバポレーターを用いて約 0.5 ml まで濃縮した後，窒素ガスを緩やかに吹き付けて乾固した。ゲル浸透クロマトグラフ操作条件を下記に示した。

<ゲル浸透クロマトグラフ操作条件>

機 種：送液ポンプ；PU614[ジーエルサイエンス株式会社]
オートサンプラー；MIDAS[ジーエルサイエンス株式会社]
フラクションコレクター；FC693[ジーエルサイエンス株式会社]
カラム：Shodex CLN pak EV-2000AC[昭和電工株式会社] 20 mm×30 cm
Shodex CLN pak EV-G[昭和電工株式会社] 20 mm×10 cm
(ガードカラム)
カラム温度：室温
移動相：シクロヘキサン及び酢酸エチルの混液(8:2)
流量：5 ml/min
注入量：5 ml
分取画分：70 ml～130 ml

ジエチルアミノプロピルカートリッジカラムにジクロロメタン 4 ml を流し予備洗浄を行った後，残留物をジクロロメタン 2 ml に溶解後負荷し，ジクロロメタン 6 ml で溶出した（プロゲステロン画分）。次いでジクロロメタン及びメタノールの混液(9:1)4 ml で溶出した（エストロゲン画分）。エストロゲン画分溶出液に窒素ガスを通じて乾固し，残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 0.5 ml に溶解し，これをエストロゲン用試験溶液とした。また，プロゲステロン画分溶出液に窒素ガスを通じて乾固し，残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 2.5 ml に溶解し，これをプロゲステロン用試験溶液とした。各々の試験溶液を液体クロマトグラフ-質量分析計に注入し，定量を行った。

4.2.2.3.3 牛乳のエストラジオール-グルクロン酸抱合体

試料 20 g を 100 ml の遠沈管に採取し，0.5 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) 5 ml 及びサロゲート物質(17 β -エストラジオール-¹³C₄ : 5 ng)を添加し混合した。 β -グルクロニダーゼ(700 単位/100 μ l)を 600 μ l 加え(4,200 単位)，37 $^{\circ}$ C で 15 時間インキュベートした。この液にアセトニトリル 50 ml を加えて 20 分間振とう抽出を行った。2,500 r/min で 5 分間遠心分離後，上澄み液を綿栓ろ過し水 150 ml 及びヘキサン 50 ml を加え，手で緩やかに振とうした。水層を分取し，塩化ナトリウム 15 g 及びジクロロメタン 60 ml を加え 5 分間振とうした。有機溶媒層を分取し，水層にはジクロロメタン 30 ml を加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返した。全有機溶媒層を合わせ，無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過した。ロータリーエバポレーターを用いて 40 $^{\circ}$ C 以下で約 0.5 ml まで減圧濃縮した後，窒素ガスを緩やかに吹き付けて乾固した。残留物をシクロヘキサン及び酢酸エチルの混液(8:2) 10 ml に溶解し，フィルターろ過した。ろ過液 5 ml をゲル浸透クロマトグラフに注入し，分取した画分をロータリーエバポレーターを用いて約 0.5 ml まで濃縮した後，窒素ガスを緩やかに吹き付けて乾固した。

フロリジルカートリッジカラムにヘキサン及びジクロロメタンの混液(1:1)5 ml を流し予備洗浄を行った後，残留物をヘキサン及びジクロロメタンの混液(1:1)2 ml に溶解後負荷し，溶出液を捨てた。ヘキサン及びジクロロメタンの混液(1:1)8 ml で洗浄後，ジクロロメタン及びアセトンの混液(95:5)12 ml で溶出した。この溶出液に窒素ガスを通じて乾固し，残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 0.5 ml に溶解して試験溶液とした。この試験溶液を液体クロマトグラフ-質量分析計に注入し，定量を行った。

4.2.2.3.4 牛乳のエストロン-硫酸抱合体

試料 20 g を 100 ml の遠沈管に採取し，0.5 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) 5 ml 及びサロゲート物質(エストロン-¹³C₄: 5 ng)を添加し混合した。スルファターゼ(62.5 単位/100 µl)を 1,000 µl 加え(625 単位)，37 °C で 1 時間インキュベートした。この液にアセトニトリル 50 ml を加えて 20 分間振とう抽出を行った。2,500 r/min で 5 分間遠心分離後，上澄み液を綿栓ろ過し水 150 ml 及びヘキサン 50 ml を加え，手で緩やかに振とうした。水層を分取し，塩化ナトリウム 15 g 及びジクロロメタン 60 ml を加え 5 分間振とうした。有機溶媒層を分取し，水層にはジクロロメタン 30 ml を加え同様の振とう及び分取の操作を繰り返した。全有機溶媒層を合わせ，無水硫酸ナトリウムを用いて脱水ろ過した。ロータリーエバポレーターを用いて 40 °C 以下で約 0.5 ml まで減圧濃縮した後，窒素ガスを緩やかに吹き付けて乾固した。残留物をシクロヘキサン及び酢酸エチルの混液(8:2) 10 ml に溶解し，フィルターろ過した。ろ過液 5 ml をゲル浸透クロマトグラフに注入し，分取した画分をロータリーエバポレーターを用いて約 0.5 ml まで濃縮した後，窒素ガスを緩やかに吹き付けて乾固した。

フロリジルカートリッジカラムにヘキサン及びジクロロメタンの混液(1:1)5 ml を流し予備洗浄を行った後，残留物をヘキサン及びジクロロメタンの混液(1:1)2 ml に溶解後負荷し溶出液を捨てた。ヘキサン及びジクロロメタンの混液(1:1)8 ml で洗浄後，ジクロロメタン及びアセトニトリルの混液(95:5)12 ml で溶出した。この溶出液に窒素ガスを通じて乾固し，残留物を水及びメタノールの混液(1:1) 0.5 ml に溶解して試験溶液とした。この試験溶液を液体クロマトグラフ-質量分析計に注入し，定量を行った。

4.2.2.4 液体クロマトグラフ-質量分析計操作条件

操作条件-1(エストロゲン用)

機種： LC 部；1100 Series[Agilent Technologies, Inc.]

MS 部；API-4000[Applied Biosystems]

カラム：Mightysil RP-18 GP[関東化学株式会社]

2.0 mm × 150 mm, 5 µm

カラム温度：40

移動相：A 液 水

B 液 アセトニトリル

B(%) 20 % (10分) 90 % (5分保持)

流量：0.2 ml/min

ポストカラム送液：0.05 % アンモニア含有メタノール 20 µl/min

注 入 量 : 10 μ l

イオン化法 : ESI 負イオンモード

イオン化温度 : 600

イオン化電圧 : -4200 V

ネブライザーガス : 窒素 (50 psi)

コリジョンガス : 窒素

コリジョンエネルギー (CE) : 表-4.2.2.4.1 に示した。

設定質量数 : 表-4.2.2.4.1 に示した。

表-4.2.2.4.1 各物質のコリジョンエネルギー及び設定質量数

測定対象物質	定量 (Q1/Q3)	確認 (Q1/Q3)	定量CE (V)	確認CE (V)
17 -イストラジ オール	271.0/145.1	271.0/143.0	-52	-82
17 -イストラジ オール	271.0/145.1	271.0/143.0	-52	-82
イストロン	269.0/143.0	269.0/145.1	-72	-48
イストリオール	287.2/171.2	287.2/145.0	-50	-56
17 -イストラジ オール- ¹³ C ₄	275.0/149.0	-	-60	-
イストロン- ¹³ C ₄	273.0/149.0	-	-48	-
イストリオール- ¹³ C ₄	291.2/175.1	-	-52	-

- : 設定値なし

操作条件-2(プロゲステロン用)

機 種 : 1100Series MSD[Agilent Technologies, Inc.]

カ ラ ム : Zorbax Eclipse XDB-C18 [Agilent Technologies, Inc.]

2.1 mm \times 150 mm , 5 μ m

カラム温度 : 40

移 動 相 : 0.01 % 酢酸及びアセトニトリルの混液 (45:55)

流 量 : 0.2 ml/min

注 入 量 : 5 μ l

イオン化法 : ESI 正イオンモード

フラグメンター電圧 : 160 V

ネブライザーガス : 窒素 60 psi

乾燥ガス : 窒素 10 L/min , 350

V-cap : 4000 V

設定質量数 : m/z 315 (プロゲステロン)

m/z 324 (プロゲステロン-d₉)

4.2.2.5 内標準溶液の調製

各エストロゲンサロゲート物質5 mgを精密に量り，アセトンまたはメタノール(PR用)に溶解して50 mlとし，エストロゲンサロゲート物質標準原液とした(100 mg/L)。プロゲステロン-d₉ 10 mgを精密に量り，メタノール(PR用)に溶解して100 mlとし，プロゲステロンサロゲート物質標準原液とした(100 mg/L)。各標準原液を水及びメタノール(HPLC用)の混液(1:1)を用いて適宜混合・希釈し，各サロゲート物質の濃度が5 ng/ml (エストロゲン用)，250 ng/ml (プロゲステロン用)となるように調製し，試料添加用に用いた。

4.2.2.6 標準溶液の調製及び検量線の作成

各標準品約10 mgを精密に量り，アセトンまたはメタノール(PR用)に溶解して100 mlとし，これを標準原液とした(100 mg/L)。各エストロゲン標準原液を水及びメタノール(HPLC用)の混液(1:1)を用いて適宜混合・希釈し，各エストロゲンサロゲート物質を5 ng/mlで含む0.05 ng/ml ~ 5 ng/mlのエストロゲン用標準溶液を調製した。

プロゲステロン標準原液を水及びメタノール(HPLC用)の混液(1:1)を用いて適宜希釈し，プロゲステロンサロゲート物質を50 ng/mlで含む1 ng/ml ~ 100 ng/mlのプロゲステロン用標準溶液を調製した。

各標準溶液を高速液体クロマトグラフ-質量分析計に注入し，各ホルモンの重量(pg)とサロゲート物質のピーク面積に対する各性ホルモンのピーク面積の比から検量線の作成を行った。

4.2.2.7 濃度の算出

試験溶液10 μl(エストロゲン用)及び5 μl(プロゲステロン用)を高速液体クロマトグラフ-質量分析計に注入し，サロゲート物質のピーク面積に対する各性ホルモンのピーク面積の比から6.3.6.で作成した検量線より試験溶液中の各ホルモン重量を求め，次式により試料中の各ホルモン濃度を算出した。

$$\text{試料中の各ホルモンの濃度 (ng/g)} = \text{試料溶液中のホルモン重量 (pg)} \times \frac{\text{最終液量 (ml)}}{\text{注入量 (μl)}} \times \frac{1}{\text{試料採取量 (g)} \times \text{縮分率}}$$

4.2.2.8 検出限界

各ホルモン溶液の最小検出量を1 pg(エストロゲン)，10 pg(プロゲステロン)とすると，検出限界は次式により算出され0.005 ng/g (エストロゲン)，0.5 ng/g(プロゲステロン)となった。

1) 牛乳

17 -エストラジオール	$1 \text{ pg} \times 1 \text{ ml} / 10 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / 20 \text{ g} = 0.005 \text{ ng/g}$
17 -エストラジオール	$1 \text{ pg} \times 1 \text{ ml} / 10 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / 20 \text{ g} = 0.005 \text{ ng/g}$
エストロン	$1 \text{ pg} \times 1 \text{ ml} / 10 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / 20 \text{ g} = 0.005 \text{ ng/g}$
エストリオール	$1 \text{ pg} \times 1 \text{ ml} / 10 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / 20 \text{ g} = 0.005 \text{ ng/g}$
プロゲステロン	$10 \text{ pg} \times 5 \text{ ml} / 5 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / 20 \text{ g} = 0.5 \text{ ng/g}$

2) 牛乳以外

17 -エストラジオール	$1 \text{ pg} \times 0.5 \text{ ml} / 10 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / (20 \text{ g} \times 5 \text{ ml} / 10 \text{ ml}) = 0.005 \text{ ng/g}$
17 -エストラジオール	$1 \text{ pg} \times 0.5 \text{ ml} / 10 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / (20 \text{ g} \times 5 \text{ ml} / 10 \text{ ml}) = 0.005 \text{ ng/g}$
エストロン	$1 \text{ pg} \times 0.5 \text{ ml} / 10 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / (20 \text{ g} \times 5 \text{ ml} / 10 \text{ ml}) = 0.005 \text{ ng/g}$
エストリオール	$1 \text{ pg} \times 0.5 \text{ ml} / 10 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / (20 \text{ g} \times 5 \text{ ml} / 10 \text{ ml}) = 0.005 \text{ ng/g}$
プロゲステロン	$10 \text{ pg} \times 2.5 \text{ ml} / 5 \text{ } \mu\text{l} \times 1 / (20 \text{ g} \times 5 \text{ ml} / 10 \text{ ml}) = 0.5 \text{ ng/g}$

5. 調査結果

5.1 牛乳

エライザー法における結果を表-5.1.1a~dに示した。

全検体からエストロゲン及びプロゲステロンが検出され，エストロゲンは0.005 ~ 0.023 ng/gを示し，全平均は0.012 ng/gであった。一方，プロゲステロンは7.3 ~ 29 ng/gを示し，全平均は17 ng/gであった。

殺菌方法別に見ると，超高温殺菌（UHT）処理の検体中にはエストロゲンは0.005 ~ 0.018 ng/gの範囲で含有され，平均は0.013 ng/gであった。また，プロゲステロンは9.2 ~ 29 ng/gの範囲で含有され，平均は18 ng/gであった。一方，低温殺菌（100 以下の殺菌処理を含む）処理の検体中のエストロゲンは0.006 ~ 0.023 ng/gの範囲で含有され，全平均は0.012 ng/g，プロゲステロンは7.3 ~ 29 ng/gの範囲で含有され，平均は16 ng/gであった。

表-5.1.1a エライザー法による測定結果

検体番号	エストロゲン* (ng/g)	プロゲステロン (ng/g)
1	0.010	12
2	0.010	20
3	0.011	17
4	0.017	22
5	0.011	12
6	0.017	23
7	0.013	14
8	0.013	26
9	0.014	20
10	0.014	18
11	0.013	14
12	0.012	15
13	0.017	29
14	0.008	13
15	0.014	16
16	0.010	18
17	0.014	19
18	0.009	14
19	0.012	18
20	0.010	18
21	0.018	24
22	0.018	13
23	0.012	25
24	0.013	16
25	0.015	19
26	0.013	18
27	0.013	21
28	0.007	10
29	0.010	13
30	0.009	18

* エストロゲン：17-及び17β-エストラジオール，エストロン，エストリオールの合計量をエストロゲンとした。なお，本キットにおいては17β-エストラジオールを標準品として算出した値であり，それぞれの性ホルモンの本キットにおける感度は，17β-エストラジオール1に対して17β-エストラジオールが0.18，エストロンが0.87，エストリオールが0.55である。

表-5.1.1b エライザー法による測定結果

検体番号	エストロゲン* (ng/g)	プロゲステロン (ng/g)
31	0.016	12
32	0.009	24
33	0.015	12
34	0.009	23
35	0.018	18
36	0.008	12
37	0.016	14
38	0.012	17
39	0.013	16
40	0.011	14
41	0.016	16
42	0.012	18
43	0.010	13
44	0.009	16
45	0.023	29
46	0.006	15
47	0.009	13
48	0.011	20
49	0.014	23
50	0.009	9.2
51	0.009	22
52	0.010	16
53	0.011	14
54	0.011	14
55	0.010	13
56	0.018	20
57	0.010	21
58	0.007	14
59	0.010	20
60	0.015	24

* エストロゲン：17 及び17 -エストラジオール，エストロン，エストリオールの合計量をエストロゲンとした。なお，本キットにおいては17 -エストラジオールを標準品として算出した値であり，それぞれの性ホルモンの本キットにおける感度は，17 -エストラジオール1に対して17 -エストラジオールが0.18，エストロンが0.87，エストリオールが0.55である。

表-5.1.1c エライザー法による測定結果

検体番号	エストロゲン* (ng/g)	プロゲステロン (ng/g)
61	0.007	13
62	0.012	15
63	0.005	18
64	0.014	17
65	0.012	15
66	0.012	13
67	0.009	13
68	0.011	12
69	0.009	15
70	0.014	14
71	0.012	19
72	0.011	19
73	0.015	18
74	0.019	16
75	0.013	17
76	0.013	17
77	0.014	16
78	0.015	16
79	0.017	27
80	0.016	20
81	0.013	20
82	0.016	23
83	0.009	19
84	0.009	19
85	0.012	18
86	0.014	25
87	0.015	18
88	0.016	23
89	0.014	24
90	0.015	23

* エストロゲン：17 及び17 -エストラジオール，エストロン，エストリオールの合計量をエストロゲンとした。なお，本キットにおいては17 -エストラジオールを標準品として算出した値であり，それぞれの性ホルモンの本キットにおける感度は，17 -エストラジオール1に対して17 -エストラジオールが0.18，エストロンが0.87，エストリオールが0.55である。

表-5.1.1d エライザー法による測定結果

検体番号	エストロゲン* (ng/g)	プロゲステロン (ng/g)
91	0.013	22
92	0.016	11
93	0.011	11
94	0.007	16
95	0.008	17
96	0.014	18
97	0.011	13
98	0.012	12
99	0.009	19
100	0.010	7.3
平均値	0.012	17

* エストロゲン：17 β -エストラジオール，エストロン，エストリオールの合計量をエストロゲンとした。なお，本キットにおいては17 β -エストラジオールを標準品として算出した値であり，それぞれの性ホルモンの本キットにおける感度は，17 β -エストラジオール1に対して17 β -エストラジオールが0.18，エストロンが0.87，エストリオールが0.55である。

また，精密分析の結果を表-5.1.2及び表-5.1.3に示した。

この結果から，牛乳中ではエストロン及びプロゲステロンのみが全検体から検出された。

エストロンの含有量は，0.006～0.021 ng/gの範囲を示し，全平均は0.014 ng/gであり，エライザー法と同様の結果が得られた。

なお，表-5.1.2には参考として，精密分析の各性ホルモン測定値をエライザーの感度で補正して合計した補正值とエライザー法による測定値を示し，表-5.1.3には比較のためエライザー法による測定値を示した。

さらに，図-5.1.1にエストロゲンの精密分析(補正值)とエライザー法による測定値の比較を示した。

また，図-5.1.2にプロゲステロンの精密分析(実測値)とエライザー法による測定値の比較を示した。

この結果から，エストロゲンについて精密分析とエライザー法との測定値とは，相関係数0.66と弱い正の相関を示した。

一方，プロゲステロンについては，試料中の濃度レベルがほぼ同じであったため，精密分析とエライザー法の測定値との相関は無かった。

表-5.1.2 精密分析による測定結果（エストロゲン）

検体 番号	測定値 (ng/g)					補正值 (ng/g)	エライザ [®] -法 による 測定値 (ng/g)
	17 - エストラジオール	17 - エストラジオール	エストロン	エストリオール	合計量		
5	<0.005	<0.005	0.009	<0.005	0.009	0.008	0.011
7	<0.005	<0.005	0.016	<0.005	0.016	0.014	0.013
11	<0.005	<0.005	0.017	<0.005	0.017	0.015	0.013
12	<0.005	<0.005	0.016	<0.005	0.016	0.014	0.012
15	<0.005	<0.005	0.016	<0.005	0.016	0.014	0.014
16	<0.005	<0.005	0.015	<0.005	0.015	0.013	0.010
17	<0.005	<0.005	0.017	<0.005	0.017	0.015	0.014
18	<0.005	<0.005	0.006	<0.005	0.006	0.005	0.009
22	<0.005	<0.005	0.021	<0.005	0.021	0.018	0.018
26	<0.005	<0.005	0.014	<0.005	0.014	0.012	0.013
28	<0.005	<0.005	0.008	<0.005	0.008	0.007	0.007
29	<0.005	<0.005	0.014	<0.005	0.014	0.012	0.010
31	<0.005	<0.005	0.018	<0.005	0.018	0.016	0.016
33	<0.005	<0.005	0.016	<0.005	0.016	0.014	0.015
36	<0.005	<0.005	0.013	<0.005	0.013	0.011	0.008
37	<0.005	<0.005	0.020	<0.005	0.020	0.017	0.016
40	<0.005	<0.005	0.011	<0.005	0.011	0.010	0.011
44	<0.005	<0.005	0.009	<0.005	0.009	0.008	0.009
46	<0.005	<0.005	0.008	<0.005	0.008	0.007	0.006
47	<0.005	<0.005	0.007	<0.005	0.007	0.006	0.009
50	<0.005	<0.005	0.009	<0.005	0.009	0.008	0.009
58	<0.005	<0.005	0.014	<0.005	0.014	0.012	0.007
61	<0.005	<0.005	0.013	<0.005	0.013	0.011	0.007
70	<0.005	<0.005	0.012	<0.005	0.012	0.010	0.014
72	<0.005	<0.005	0.010	<0.005	0.010	0.009	0.011
79	<0.005	<0.005	0.016	<0.005	0.016	0.014	0.017
83	<0.005	<0.005	0.015	<0.005	0.015	0.013	0.009
84	<0.005	<0.005	0.014	<0.005	0.014	0.012	0.009
99	<0.005	<0.005	0.016	<0.005	0.016	0.014	0.009
100	<0.005	<0.005	0.018	<0.005	0.018	0.016	0.010

注) 補正值：エライザ法の測定値と比較するため、測定値に各性ホルモンのエライザ法感度を乗じた値。すなわち、

$$\text{補正值(ng/g)} = 17\text{-エストラジオールの測定値} \times 0.18 + 17\text{-エストラジオールの測定値} \times 1 \\ + \text{エストロンの測定値} \times 0.87 + \text{エストリオールの測定値} \times 0.55$$

表-5.1.3 精密分析による測定結果（プロゲステロン）

検体番号	測定値 (ng/g)	
	精密分析	エライザー法
5	12	12
7	14	14
11	14	14
12	14	15
15	12	16
16	12	18
17	12	19
18	11	14
22	12	13
26	12	18
28	9.4	10
29	14	13
31	13	12
33	13	12
36	12	12
37	14	14
40	12	14
44	12	16
46	12	15
47	11	13
50	12	9.2
58	12	14
61	13	13
70	14	14
72	12	19
79	13	27
83	12	19
84	11	19
99	12	19
100	10	7.3

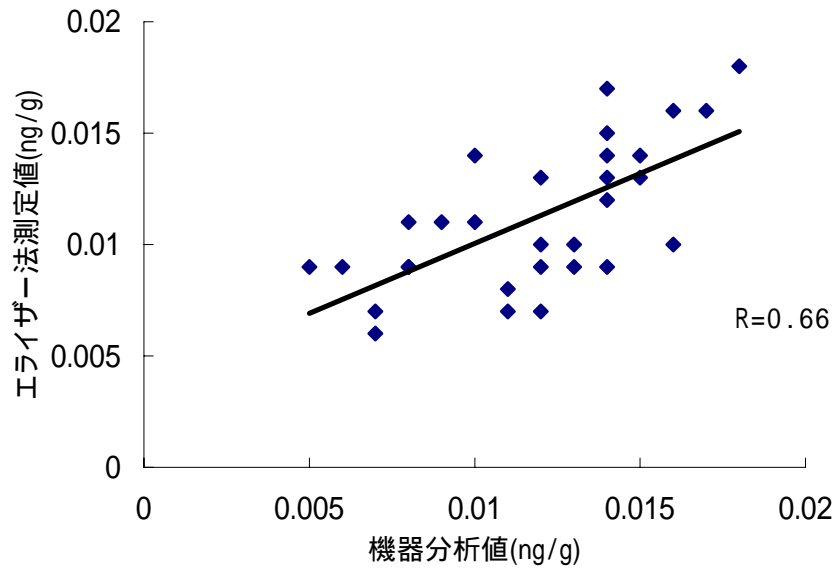


図-5.1.1.1 精密分析とエライザー法によるエストロゲン測定値の比較(牛乳)

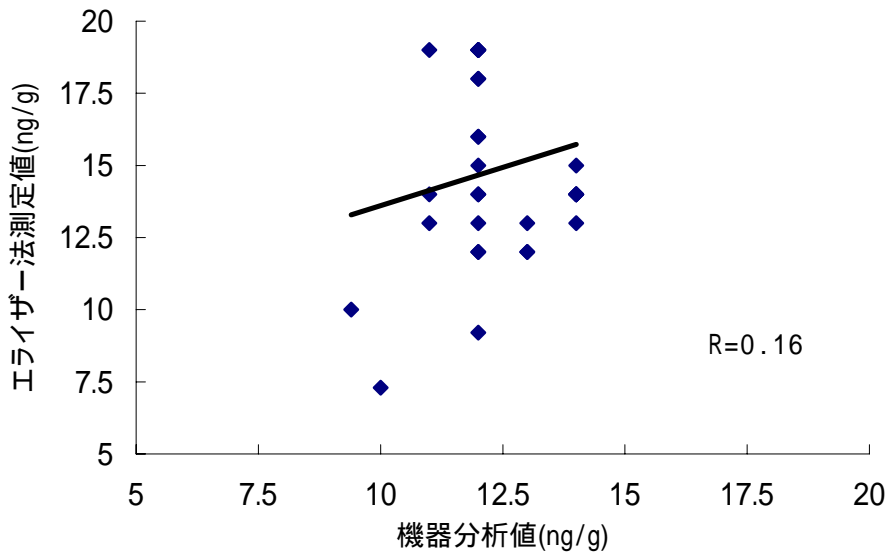


図-5.1.1.2 精密分析とエライザー法によるプロゲステロン測定値の比較(牛乳)

5.2 脱脂粉乳

エライザー法による測定結果を表-5.2.1に、また、精密分析による結果を表-5.2.2及び表-5.2.3に示した。なお、表-5.2.3には比較のためエライザー法による測定値を示した。

エストロゲンについては牛乳と同様に、精密分析で得られた各測定値をエライザー法の感度で補正して求めた補正值を示した(表-5.2.2)。

この結果、脱脂粉乳中にはエストロゲンが0.013~0.049 ng/gの範囲で存在しており、全平均は0.038 ng/gであった。一方、プロゲステロンは8.5~32 ng/gの範囲で含有されており、全平均は18 ng/gであった。

また、国産と外国産を比較すると、国産の検体中のエストロゲンは0.034~0.049 ng/gの範囲を示し、平均は0.041 ng/g、プロゲステロンは12~18 ng/gの範囲を示し、平均15 ng/gであった。外国産の検体中のエストロゲンは0.013~0.040 ng/gの範囲であり全平均は0.033 ng/g、プロゲステロンは8.5~32 ng/gの範囲であり、全平均は21 ng/gであった。

参考として、図-5.2.1エストロゲンの精密分析(補正值)とエライザー法による測定値の比較を示した。

また、図-5.2.2にプロゲステロンについて、精密分析(実測値)とエライザー法による測定値の比較を示した。

この結果から、エストロゲンについて精密分析とエライザー法との測定値とは、相関係数0.85と良い相関を示した。

一方、プロゲステロンについては、牛乳に比べると、精密分析とエライザー法の測定値の相関係数は0.58とやや相関性を示した。

表-5.2.1 エライザー法による測定結果

検体番号	エストロゲン* (ng/g)	プロゲステロン (ng/g)
1	0.035	16
2	0.039	17
3	0.039	16
4	0.040	14
5	0.043	18
6	0.044	17
7	0.049	14
8	0.040	13
9	0.040	14
10	0.034	18
11	0.040	15
12	0.041	16
13	0.043	14
14	0.045	15
15	0.041	12
16	0.018	8.5
17	0.013	23
18	0.038	21
19	0.038	21
20	0.040	22
21	0.040	32
22	0.039	19
23	0.038	14
24	0.036	25
25	0.031	18
26	0.034	25

* エストロゲン：17 β -エストラジオール，エストロン，エストリオールの合計量をエストロゲンとした。なお，本キットにおいては17 β -エストラジオールを標準品として算出した値であり，それぞれの性ホルモンの本キットにおける感度は，17 β -エストラジオールに対して17 β -エストラジオールが0.18，エストロンが0.87，エストリオールが0.55である。

表-5.2.2 精密分析による測定結果（エストロゲン）

検体 番号	測定値 (ng/g)					補正值 (ng/g)	エライザ [*] -法 による 測定値 (ng/g)
	17 - エストラジオール	17 - エストラジオール	エストロン	エストリオール	合計量		
1	<0.005	<0.005	0.026	<0.005	0.026	0.023	0.035
2	<0.005	<0.005	0.028	<0.005	0.028	0.024	0.039
3	<0.005	<0.005	0.027	<0.005	0.027	0.023	0.039
4	<0.005	<0.005	0.029	<0.005	0.029	0.025	0.040
5	<0.005	<0.005	0.033	<0.005	0.033	0.029	0.043
6	<0.005	<0.005	0.036	<0.005	0.036	0.031	0.044
7	<0.005	<0.005	0.052	<0.005	0.052	0.045	0.049
8	<0.005	<0.005	0.031	<0.005	0.031	0.027	0.040
9	<0.005	<0.005	0.041	<0.005	0.041	0.036	0.040
10	<0.005	<0.005	0.032	<0.005	0.032	0.028	0.034
11	<0.005	<0.005	0.036	<0.005	0.036	0.031	0.040
12	<0.005	<0.005	0.037	<0.005	0.037	0.032	0.041
13	<0.005	<0.005	0.042	<0.005	0.042	0.037	0.043
14	<0.005	<0.005	0.047	<0.005	0.047	0.041	0.045
15	<0.005	<0.005	0.045	<0.005	0.045	0.039	0.041
16	<0.005	<0.005	0.006	<0.005	0.006	0.005	0.018
17	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	-	0.013
18	<0.005	<0.005	0.032	<0.005	0.032	0.028	0.038
19	<0.005	<0.005	0.031	<0.005	0.031	0.027	0.038
20	<0.005	<0.005	0.036	<0.005	0.036	0.031	0.040
21	<0.005	<0.005	0.036	<0.005	0.036	0.031	0.040
22	0.005	<0.005	0.042	<0.005	0.047	0.037	0.039
23	<0.005	<0.005	0.038	<0.005	0.038	0.033	0.038
24	<0.005	<0.005	0.034	<0.005	0.034	0.030	0.036
25	<0.005	<0.005	0.036	<0.005	0.036	0.031	0.031
26	<0.005	<0.005	0.041	<0.005	0.041	0.036	0.034

注) 補正值：エライザ法の測定値と比較するため、測定値に各性ホルモンのエライザ法感度を乗じた値。すなわち、

$$\text{補正值(ng/g)} = 17\text{-エストラジオールの測定値} \times 0.18 + 17\text{-エストラジオールの測定値} \times 1 + \text{エストロンの測定値} \times 0.87 + \text{エストリオールの測定値} \times 0.55$$

表-5.2.3 精密分析による測定結果（プロゲステロン）

検体番号	測定値 (ng/g)	
	精密分析	エライザー法
1	11	16
2	11	17
3	12	16
4	11	14
5	12	18
6	12	17
7	12	14
8	12	13
9	12	14
10	12	18
11	13	15
12	11	16
13	12	14
14	12	15
15	12	12
16	4.2	8.5
17	22	23
18	10	21
19	11	21
20	17	22
21	17	32
22	13	19
23	14	14
24	13	25
25	12	18
26	12	25

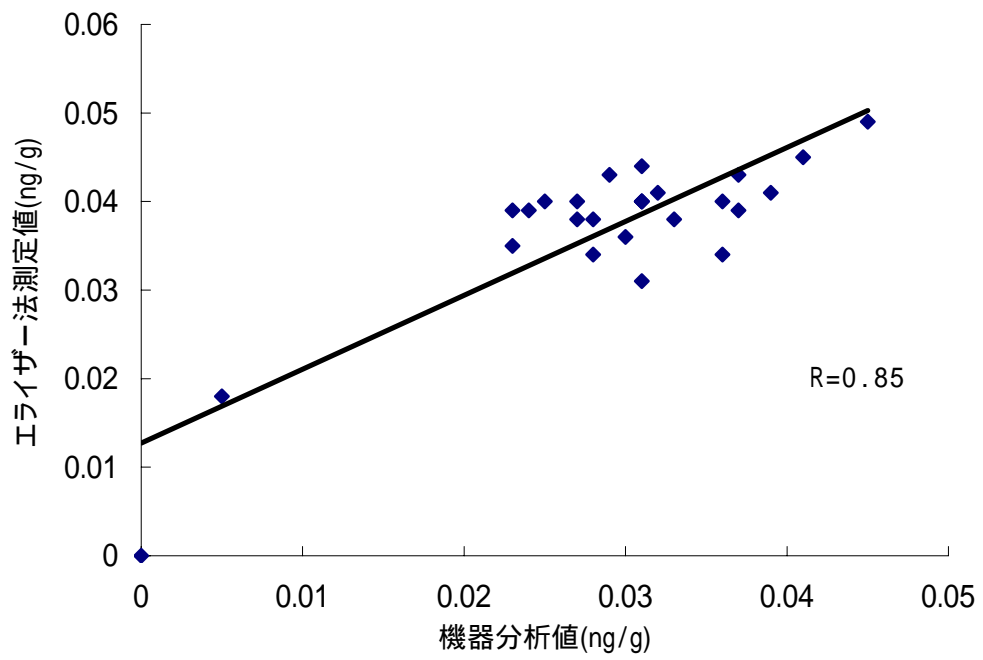


図-5.2.1 精密分析とエライザー法によるエストロゲン測定値の比較(粉乳)

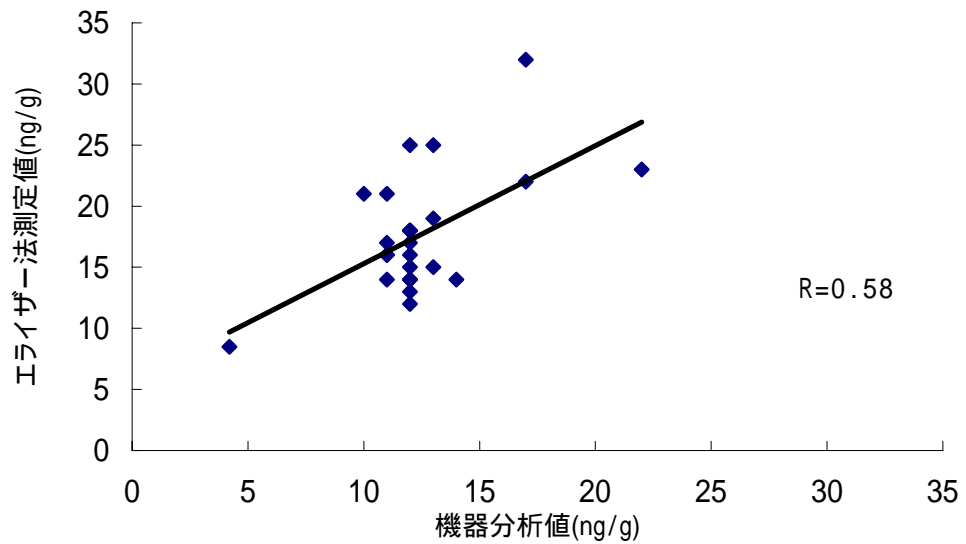


図-5.2.2 精密分析とエライザー法によるプロゲステロン測定値の比較(粉乳)

5.3 抱合体等の含有量検討調査

精密分析を実施した牛乳について，エストロン硫酸抱合体及び17 β -，17 α -エストラジオールグルクロン酸抱合体の含有量測定を行った。結果を表-5.3.1~5.3.3に示した。

この分析では，エストロン硫酸抱合体についてはスルファターゼ処理後の，また17 β -，17 α -エストラジオールグルクロン酸抱合体については，グルクロニダーゼ処理を行った後のそれぞれの物質量が測定されている。このため，測定値は抱合体由来の性ホルモンと遊離の性ホルモンの合計量を示していることから，表中には両者の差を抱合体由来の性ホルモンとして示した。

表-5.3.1 エストロンの測定結果

検体番号	エストロンの含有量 (ng/g)		
	スルファターゼ処理の測定値(A)	5.1の精密分析の測定値(B)	抱合体由来(A-B)
5	0.072	0.009	0.063
7	0.13	0.016	0.11
11	0.13	0.017	0.11
12	0.097	0.016	0.081
15	0.11	0.016	0.094
16	0.12	0.015	0.11
17	0.13	0.017	0.11
18	0.044	0.006	0.038
22	0.14	0.021	0.12
26	0.11	0.014	0.096
28	0.061	0.008	0.053
29	0.10	0.014	0.086
31	0.14	0.018	0.12
33	0.12	0.016	0.10
36	0.084	0.013	0.071
37	0.16	0.020	0.14
40	0.064	0.011	0.053
44	0.070	0.009	0.061
46	0.063	0.008	0.055
47	0.071	0.007	0.064
50	0.064	0.009	0.055
58	0.10	0.014	0.086
61	0.11	0.013	0.097
70	0.074	0.012	0.062
72	0.086	0.010	0.076
79	0.13	0.016	0.11
83	0.099	0.015	0.084
84	0.094	0.014	0.080
99	0.11	0.016	0.094
100	0.16	0.018	0.14

表-5.3.2 17 -エストラジオールの測定結果

検体番号	17 -エストラジオールの含有量 (ng/g)		
	グルクロニダーゼ処理の測定値(A)	5.1.の精密分析の測定値(B)	抱合体由来(A-B)
5	0.009	<0.005	0.009
7	0.016	<0.005	0.016
11	0.014	<0.005	0.014
12	0.010	<0.005	0.010
15	0.010	<0.005	0.010
16	0.016	<0.005	0.016
17	0.016	<0.005	0.016
18	<0.005	<0.005	-
22	0.019	<0.005	0.019
26	0.014	<0.005	0.014
28	0.006	<0.005	0.006
29	<0.005	<0.005	-
31	0.016	<0.005	0.016
33	0.013	<0.005	0.013
36	0.013	<0.005	0.013
37	0.018	<0.005	0.018
40	0.008	<0.005	0.008
44	0.009	<0.005	0.009
46	0.007	<0.005	0.007
47	0.008	<0.005	0.008
50	0.008	<0.005	0.008
58	0.011	<0.005	0.011
61	0.013	<0.005	0.013
70	0.009	<0.005	0.009
72	0.007	<0.005	0.007
79	0.015	<0.005	0.015
83	0.014	<0.005	0.014
84	<0.005	<0.005	-
99	0.013	<0.005	0.013
100	0.020	<0.005	0.020

- : (A)及び(B)のいずれも検出限界以下のため、差し引きの値は算出せず

表-5.3.3 17 -エストラジオールの測定結果

検体番号	17 -エストラジオールの含有量 (ng/g)		
	グルクロニダーゼ処理の測定値(A)	5.1.の精密分析の測定値(B)	抱合体由来(A-B)
5	<0.005	<0.005	-
7	<0.005	<0.005	-
11	<0.005	<0.005	-
12	<0.005	<0.005	-
15	<0.005	<0.005	-
16	<0.005	<0.005	-
17	<0.005	<0.005	-
18	<0.005	<0.005	-
22	<0.005	<0.005	-
26	<0.005	<0.005	-
28	<0.005	<0.005	-
29	<0.005	<0.005	-
31	<0.005	<0.005	-
33	<0.005	<0.005	-
36	<0.005	<0.005	-
37	<0.005	<0.005	-
40	<0.005	<0.005	-
44	<0.005	<0.005	-
46	<0.005	<0.005	-
47	<0.005	<0.005	-
50	<0.005	<0.005	-
58	<0.005	<0.005	-
61	<0.005	<0.005	-
70	<0.005	<0.005	-
72	<0.005	<0.005	-
79	<0.005	<0.005	-
83	<0.005	<0.005	-
84	<0.005	<0.005	-
99	<0.005	<0.005	-
100	<0.005	<0.005	-

- : (A)及び(B)のいずれも検出限界以下のため、差し引きの値は算出せず

6 検討事項等

6.1 エライザー法 (エストロゲン)

6.1.1 検量線

キット付属の標準原液を0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0及び3.0 ng/ml標準溶液となるように順次希釈し, 各標準溶液100 µlをウェルに入れて本操作に従って測定し, その濃度と吸光度から検量線の作成を行った。その結果, 0.05~3.0 ng/mlの範囲で良好な検量線が得られた。標準溶液の検量線の一例を図-6.1.1.1に示した。

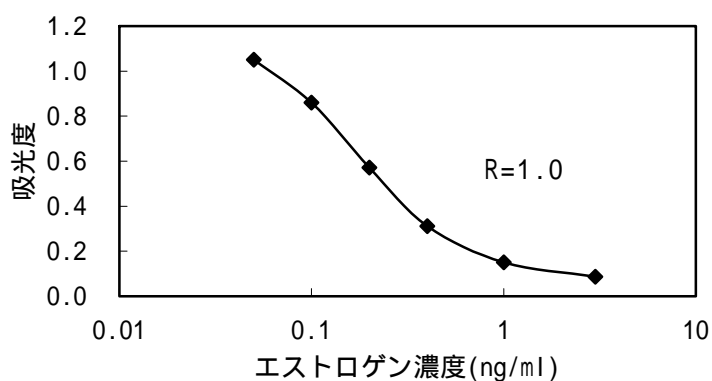


図-6.1.1.1 エライザー法によるエストロゲンの検量線

6.1.2 各性ホルモンの感度

測定に使用したエストロゲン (E1/E2/E3) ELISA キット [日本エンバイロケミカルズ株式会社 Lot No.T02WN02] を用いて各性ホルモンの感度の確認を行った。すなわち, 各性ホルモンの 1.0 ng/ml 及び 0.5 ng/ml 標準溶液をキットにて測定した。

その結果を表-6.1.2 に示した。エストロゲン測定キットに表示されている感度とほぼ同様の結果が得られた。一方, プロゲステロンは本キットとは反応しないことが確認された。

表-6.1.2 各性ホルモンの感度の確認

物質名	標準溶液濃度 (ng/ml)	測定値 (ng/ml)	理論値* (ng/ml)	標準溶液濃度 (ng/ml)	測定値 (ng/ml)	理論値* (ng/ml)
17 -エストラジオール	1.0	0.17	-	0.5	0.093	-
17 -エストラジオール		0.87	1.0		0.42	0.5
エストロン		0.83	0.87		0.43	0.44
エストリオール		0.47	0.55		0.32	0.28
プロゲステロン		<0.05	0		<0.05	0

* : 測定キットに表示されている感度より算出した値

- : 測定キットに感度の記載なし

6.1.3 添加回収試験

試料（牛乳，脱脂粉乳）に17 β -エストラジオール：0.5 ng/g，17 α -エストラジオール：0.05 ng/g，エストロン：0.1 ng/g，エストリオール：0.1 ng/g を添加し，添加回収試験を実施した。なお，エストロゲン測定キットにおける17 β -エストラジオール以外の性ホルモンの感度が同一ではないことから，それぞれの性ホルモン標準溶液より作成した検量線から濃度を算出し，無添加試料中の性ホルモン濃度を差し引きした値により回収率を求めた。

その結果を表-6.1.3.1及び6.1.3.2に示した。

添加回収率及び相対標準偏差の平均は，各々，17 β -エストラジオールは69～75 %（平均73 %），4.1 %，17 α -エストラジオールは62～82 %（平均72 %），4.6 %，エストロンは45～73 %（平均59 %），4.6 %，エストリオールは55～82 %（平均72 %），9.8 %であった。

表-6.1.3.1 添加回収試験の結果(牛乳)

物質名	回収率 (%)				相対標準偏差 (%)
	1回目	2回目	3回目	平均	
17 β -エストラジオール	75	69	73	72	4.2
17 α -エストラジオール	77	77	82	79	3.7
エストロン	49	50	45	48	5.5
エストリオール	81	74	82	79	5.5

表-6.1.3.2 添加回収試験の結果(脱脂粉乳)

物質名	回収率 (%)				相対標準偏差 (%)
	1回目	2回目	3回目	平均	
17 β -エストラジオール	75	70	75	73	3.9
17 α -エストラジオール	64	69	62	65	5.5
エストロン	68	70	73	70	3.6
エストリオール	55	72	68	65	14

6.1.4 再現性

試料（牛乳，脱脂粉乳）について6回の繰り返し分析を実施し，その結果を表-6.1.4.1及び表-6.1.4.2に示した。

相対標準偏差の平均は10.6 %と再現性の良い結果が得られた。

表-6.1.4.1 再現性試験の結果（牛乳）

試料濃度 (ng/ml)							相対標準偏差 (%)
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均	
0.010	0.011	0.009	0.010	0.011	0.013	0.011	13

表-6.1.4.2 再現性試験の結果（脱脂粉乳）

試料濃度 (ng/ml)							相対標準偏差 (%)
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均	
0.044	0.036	0.038	0.042	0.044	0.043	0.041	8.2

6.2 エライザー法（プロゲステロン）

6.2.1 検量線

キット付属の標準原液を0.0078, 0.016, 0.031, 0.063, 0.13, 0.25, 0.50及び1.0 ng/ml標準溶液となるように順次希釈し, 各標準溶液100 µlをウェルに入れ, 本操作に従って測定して, その濃度と吸光度から検量線の作成を行った。その結果, 0.031 ~ 1.0 ng/mlの範囲で良好な検量線が得られた。標準溶液の検量線の一例を図-6.2.1.1に示した。

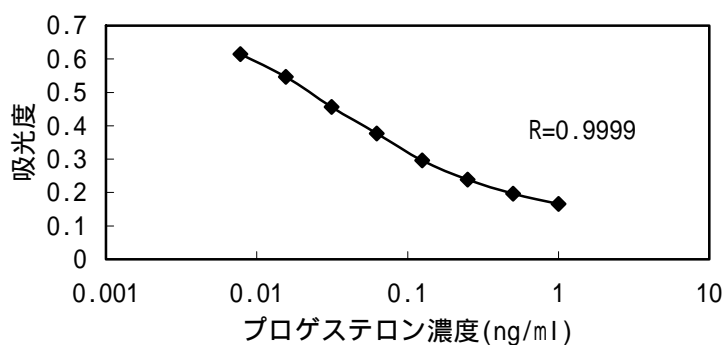


図-6.2.1.1 エライザー法によるプロゲステロンの検量線

6.2.2 その他のホルモンの感度

測定に使用した Progesterone EIA Kit [Cayman Chemical Company Lot No.99632]を用いて17-エストラジオール以外の性ホルモンについて感度の確認を行った。各性ホルモンの0.5 ng/ml及び0.1 ng/ml標準溶液をキットにて測定をした。

その結果を表-6.2.2に示した。本結果から, エストロゲンは本キットとは反応しないことが確認された。

表-6.2.2 各性ホルモンの感度の確認

物質名	標準溶液濃度 (ng/ml)	測定値 (ng/ml)	標準溶液濃度 (ng/ml)	測定値 (ng/ml)
17 -エストラジオール	0.5	<0.03	0.1	<0.03
17 -エストラジオール		<0.03		<0.03
エストロン		<0.03		<0.03
エストリオール		<0.03		<0.03
プロゲステロン		0.53		0.13

6.2.3 添加回収試験

試料（牛乳，脱脂粉乳）に20 ng/g を添加し，添加回収試験を実施した。その結果を表-6.2.3.1及び6.2.3.2に示した。

添加回収率は93～118 %（平均105 %），相対標準偏差の平均は9.7 %と良好であった。なお，添加回収率は無添加試料の性ホルモン濃度を差し引きした値により求めた。

表-6.2.3.1 添加回収試験の結果(牛乳)

物質名	回収率 (%)				相対標準偏差 (%)
	1回目	2回目	3回目	平均	
プロゲステロン	98	118	117	111	10

表-6.2.3.2 添加回収試験の結果(脱脂粉乳)

物質名	回収率 (%)				相対標準偏差 (%)
	1回目	2回目	3回目	平均	
プロゲステロン	95	110	93	99	9.4

6.2.4 再現性

試料（牛乳，脱脂粉乳）について6回の繰り返し分析を実施し，その結果を表-6.2.4.1及び表-6.2.4.2に示した。

表-6.2.4 再現性試験の結果（牛乳）

試料濃度 (ng/g)							相対標準偏差 (%)
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均	
12	11	16	14	15	15	14	14

表-6.2.4.2 再現性試験の結果（脱脂粉乳）

試料濃度 (ng/g)							相対標準偏差 (%)
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均	
17	12	16	14	15	12	14	14

6.3 精密分析(機器分析)

6.3.1 検量線

各性ホルモン0.05 ng/ml ~ 10 ng/ml標準溶液を高速液体クロマトグラフ-質量分析計に注入し、重量と内部標準物質に対する面積比から検量線の作成を行った。その結果、0.05 ng/ml ~ 10 ng/mlの範囲で良好な直線性が認められた。

なお、標準溶液のクロマトグラム及び検量線の一例を図-6.3.1.1~図-6.3.1.5に示した。

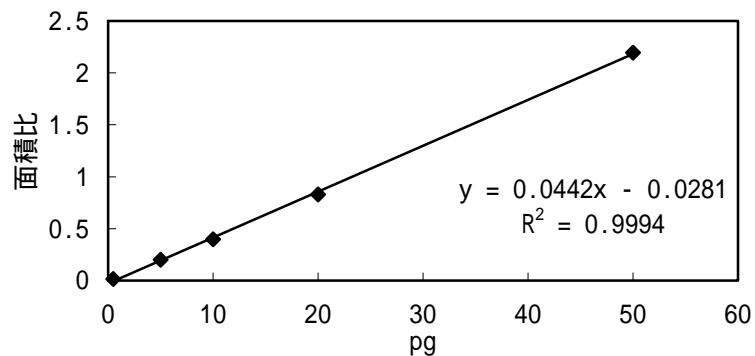


図-6.3.1.1. 17β-エストラジオールの検量線の一例

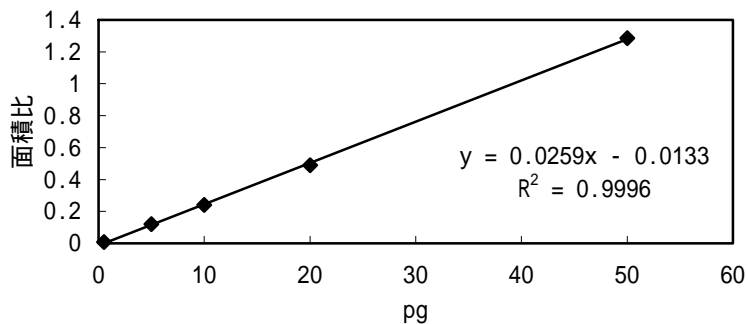


図-6.3.1.2. 17β-エストラジオールの検量線の一例

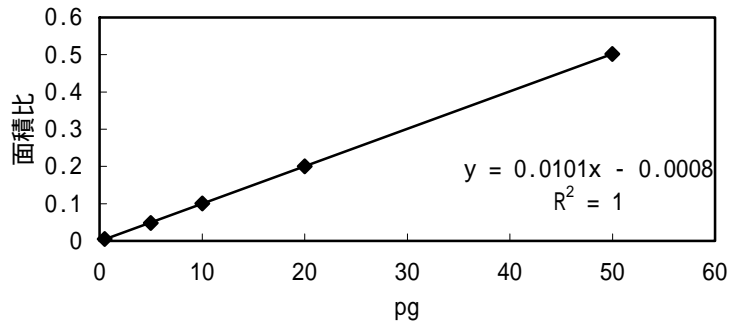


図-6.3.1.3. エストロンの検量線の一例

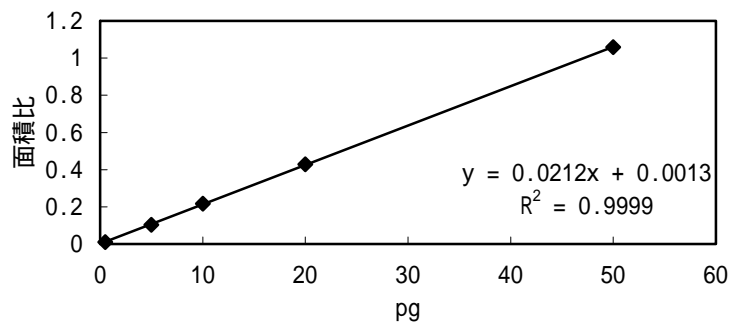


図-6.3.1.4. エストリオールの検量線の一例

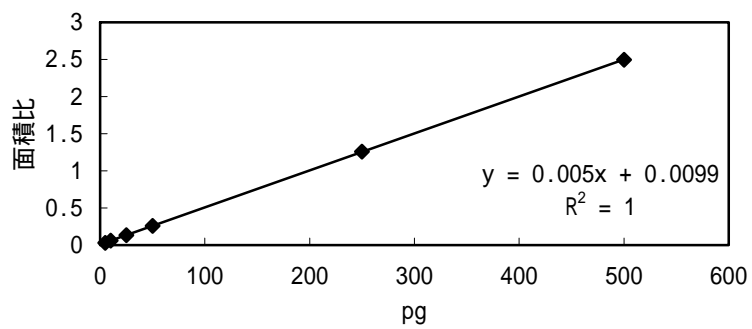


図-6.3.1.5. プロゲステロンの検量線の一例

6.3.2 検出限界の確認

試料(牛乳)に検出限界の2倍濃度(エストロゲン：0.010 ng/g，プロゲステロン：1 ng/g)を添加し，添加回収試験を実施した。その結果を表-6.3.2.1～表-6.3.2.5に示した。

表-6.3.2.1 添加回収試験の結果(17 β -エストラジオール)

測定値 (ng/g)							標準偏差 ()	3	10
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均			
0.01118	0.01047	0.01098	0.008955	0.01015	0.009972	0.01028	0.000800	0.00240	0.0080

表-6.3.2.2 添加回収試験の結果(17 β -エストラジオール)

測定値 (ng/g)							標準偏差 ()	3	10
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均			
0.01139	0.01356	0.01153	0.01223	0.01274	0.01410	0.01259	0.001080	0.00324	0.0108

表-6.3.2.3 添加回収試験の結果(エストロン)

測定値 (ng/g)							標準偏差 ()	3	10
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均			
0.02082	0.02051	0.01989	0.02199	0.02135	0.02203	0.02109	0.00008497	0.00254	0.00849

表-6.3.2.4 添加回収試験の結果(エストリオール)

測定値 (ng/g)							標準偏差 ()	3	10
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均			
0.009202	0.01019	0.01085	0.009871	0.01032	0.009222	0.009942	0.000648	0.001944	0.00648

表-6.3.2.5 添加回収試験の結果(プロゲステロン)

測定値 (ng/g)							標準偏差 ()	3	10
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均			
11.157	11.136	11.185	11.160	11.285	11.131	11.175	0.05692	0.1707	0.5692

6.3.3 添加回収試験

試料（牛乳及び脱脂粉乳）に検出限界の10倍濃度（エストロゲン：0.050 ng/g，プロゲステロン：5.0 ng/g）を添加し，添加回収試験を実施した。結果を表-6.3.3.1及び表-6.3.3.2に示した。

試料（牛乳）に グルクロン酸抱合体 [17-β-エストラジオール-3-（β-D-glucuronide）] を 0.25 ng/g (17-β-エストラジオール換算値：0.11658 ng/g) 添加し，β-グルクロニダーゼ処理した添加回収試験を実施した。結果を表-6.3.3.3に示した。

試料（牛乳）に硫酸抱合体 [エストロン3-サルフェートナトリウム] を 0.125 ng/g (エストロン換算値：0.09075 ng/g) 添加し，スルファターゼ処理した添加回収試験を実施し，その結果を表-6.3.3.4に示した。

添加回収率は，牛乳においては92～114 %（平均95～110 %），相対標準偏差5 %以下，脱脂粉乳においては72～109 %（平均79～106 %），相対標準偏差11 %以下と良好であった。また，各抱合体についての回収率良好であり，酵素が十分作用していることが確認された。

表-6.3.3.1 添加回収試験の結果(牛乳)

物質名	回収率 (%)				相対標準偏差 (%)
	1回目	2回目	3回目	平均	
17-β-エストラジオール	92	97	96	95	2.8
17-β-エストラジオール	114	110	106	110	3.6
エストロン	94	92	98	95	3.2
エストリオール	99	106	103	103	3.4
プロゲステロン	106	105	98	103	4.2

表-6.3.3.2 添加回収試験の結果(脱脂粉乳)

物質名	回収率 (%)				相対標準偏差 (%)
	1回目	2回目	3回目	平均	
17-β-エストラジオール	107	109	101	106	3.9
17-β-エストラジオール	97	90	95	94	3.8
エストロン	101	89	97	96	6.4
エストリオール	72	88	77	79	10.4
プロゲステロン	104	93	102	100	5.9

表-6.3.3.3 添加回収試験の結果(エストラジオール-グルクロン酸抱合体)

物質名	回収率 (%)				相対標準偏差 (%)
	1回目	2回目	3回目	平均	
17-β-エストラジオール	95	96	100	97	2.8

表-6.3.3.4 添加回収試験の結果(エストロン-硫酸抱合体)

物質名	回収率 (%)				相対標準偏差 (%)
	1回目	2回目	3回目	平均	
エストロン	74	79	111	88	23

6.3.4 再現性

試料(牛乳及び脱脂粉乳)について6回の繰り返し分析を実施し,その結果を表-6.3.4.1~表-6.3.4.4に示した。

牛乳,脱脂粉乳ともに相対標準偏差10%以内と再現性の良い結果が得られた。

表-6.3.4.1 再現性試験の結果(牛乳,エストロン)

分析値 (ng/g)							相対標準偏差 (%)
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均	
0.016	0.017	0.019	0.0015	0.017	0.015	0.017	8.9

表-6.3.4.2 再現性試験の結果(牛乳,プロゲステロン)

分析値 (ng/g)							相対標準偏差 (%)
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均	
12	12	12	12	12	12	12	0

表-6.3.4.3 再現性試験の結果(脱脂粉乳,プロゲステロン)

分析値 (ng/g)							相対標準偏差 (%)
1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目	平均	
11	11	11	11	12	11	11	3.7

6.3.5 クロマトグラム

6.3.5.1 標準溶液のクロマトグラム

標準溶液のクロマトグラムを図-6.3.5.1~6.3.5.4に示した。

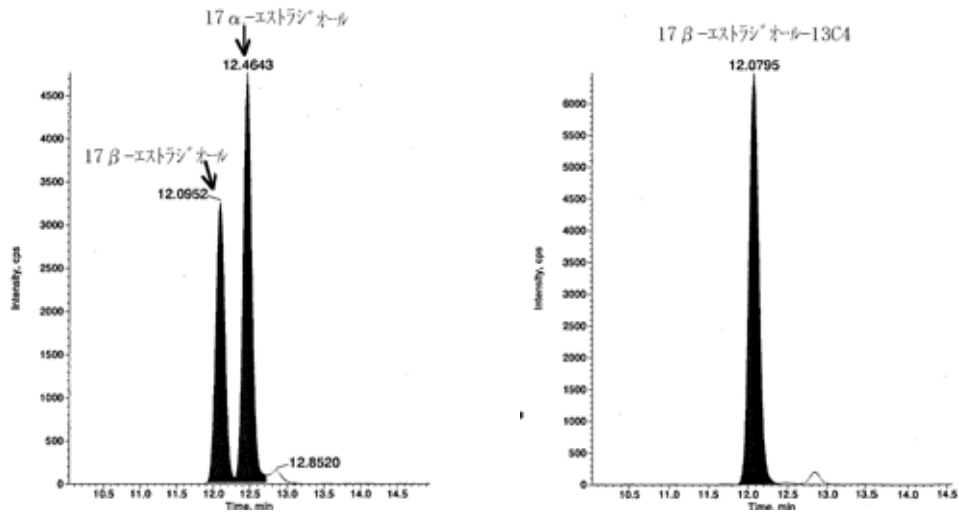


図-6.3.5.1 エストラジオールのクロマトグラム (対象物質 : 20 pg , サロゲート物質 : 50 pg)

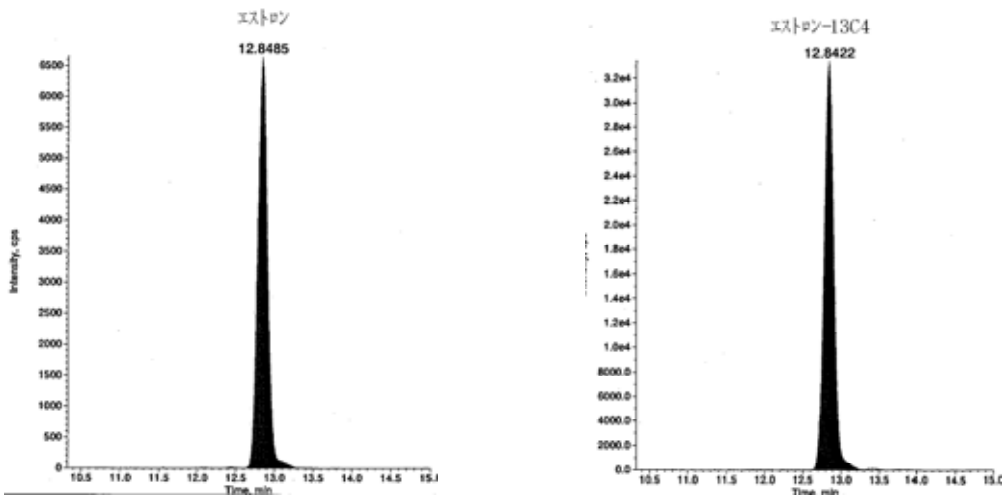


図-6.3.5.2 エストロンのクロマトグラム (対象物質 : 20 pg , サロゲート物質 : 50 pg)

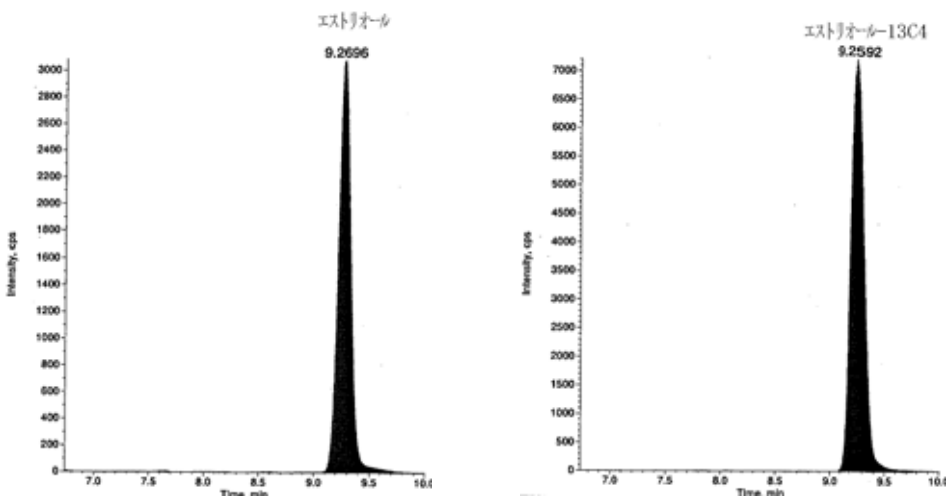


図-6.3.5.3 エストリオールのクロマトグラム (対象物質 : 20 pg , サロゲート物質 : 50 pg)

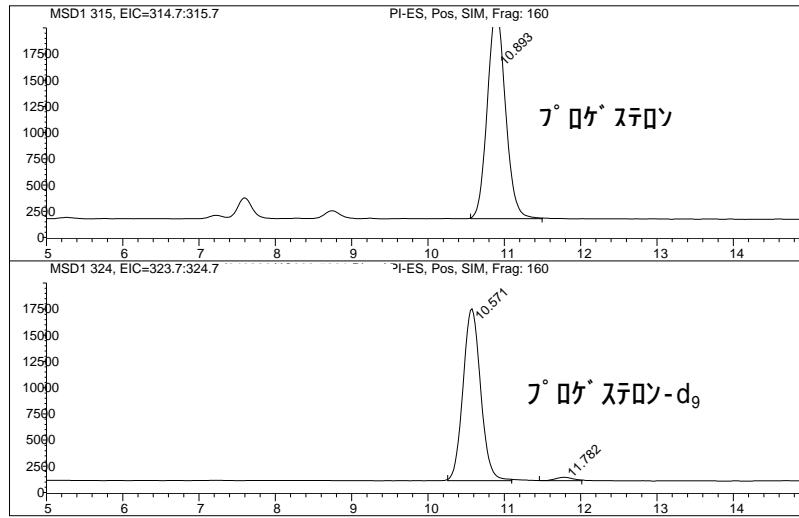


図-6.3.5.4 プロゲステロンのクロマトグラム (対象物質 : 250 pg , サロゲート物質 : 250 pg)

6.3.5.2 試料(牛乳及び脱脂粉乳)のクロマトグラム

試料(牛乳及び脱脂粉乳)のクロマトグラムを図-6.3.5.5~6.3.5.12に示した。

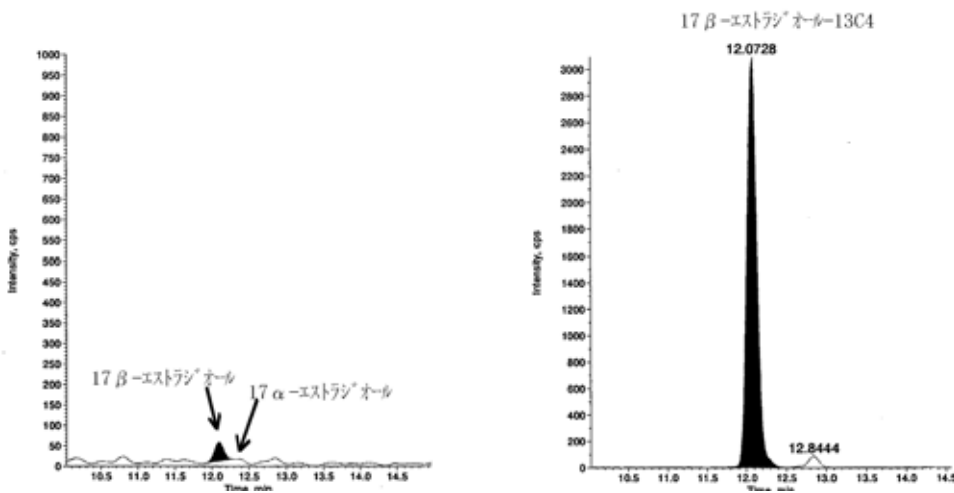


図-6.3.5.5 エストラジオールのクロマトグラム (牛乳5)

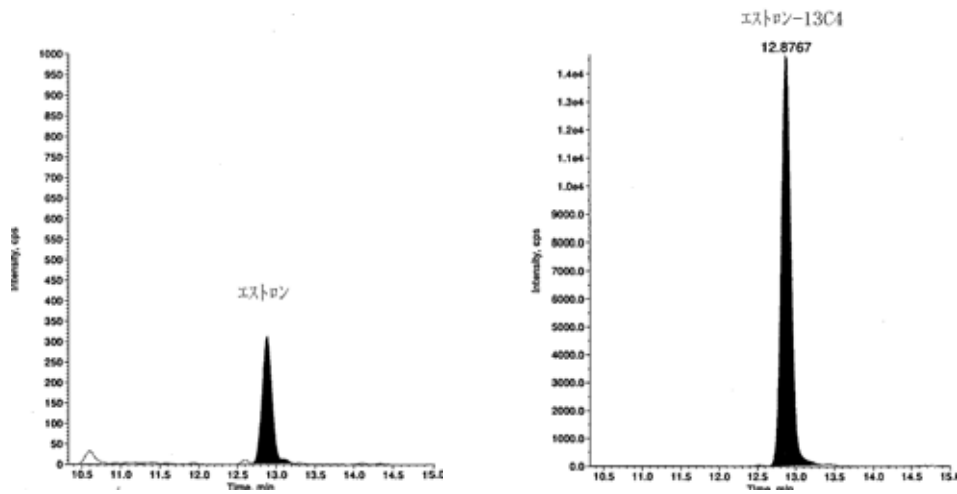


図-6.3.5.6 エストロンのクロマトグラム（牛乳5）

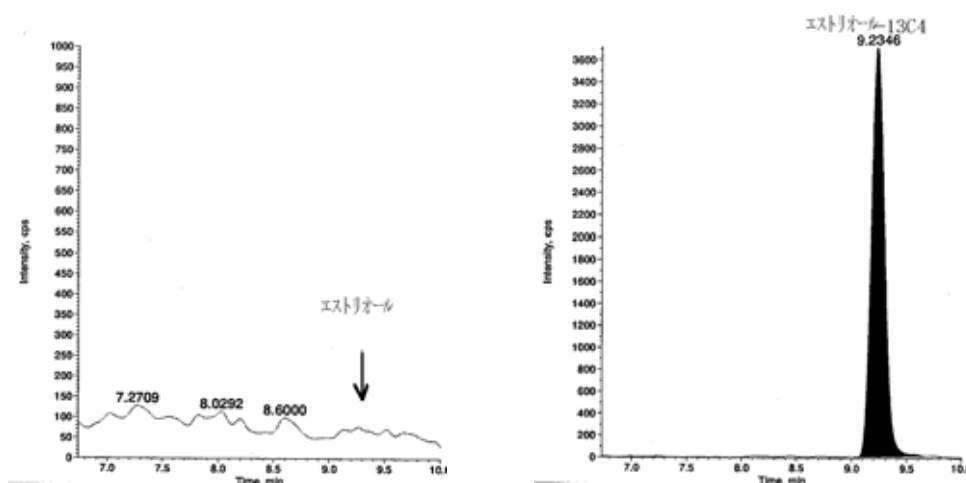


図-6.3.5.7 エストジオールのクロマトグラム（牛乳5）

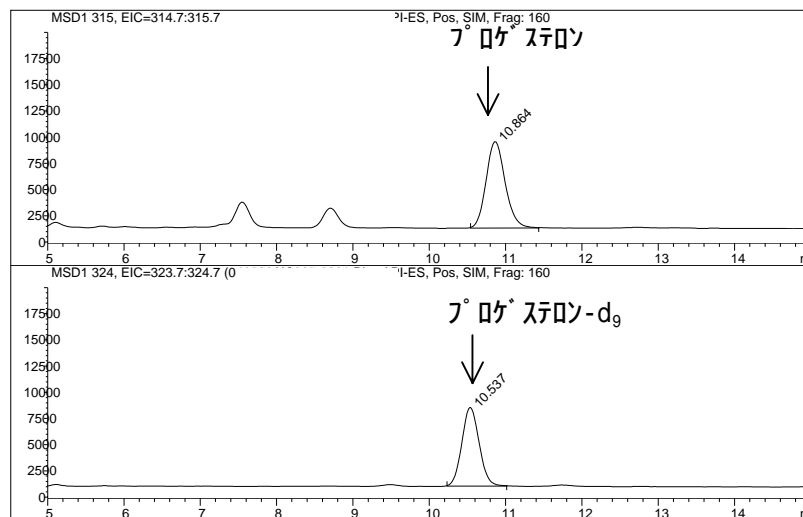


図-6.3.5.8 プロゲステロンのクロマトグラム（牛乳5）

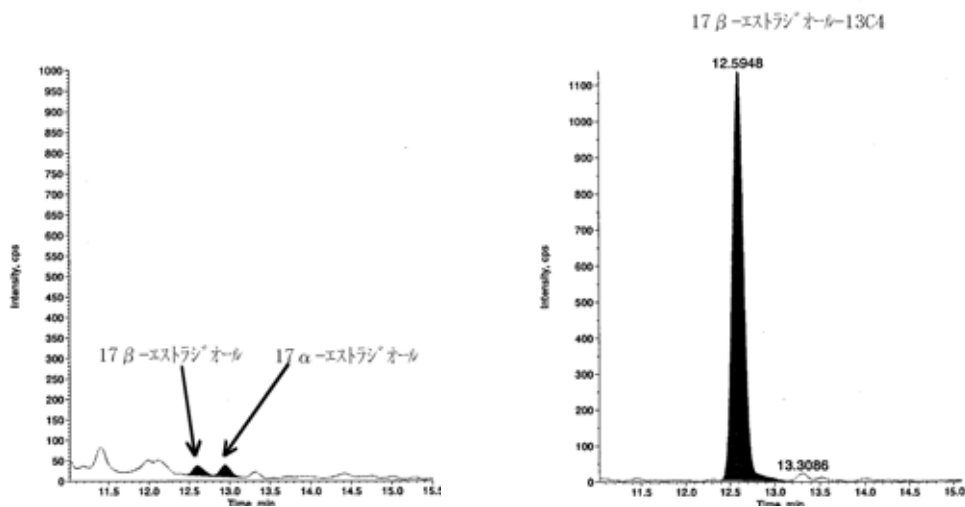


図-6.3.5.9 エストラジオールのクロマトグラム（脱脂粉乳国産1）

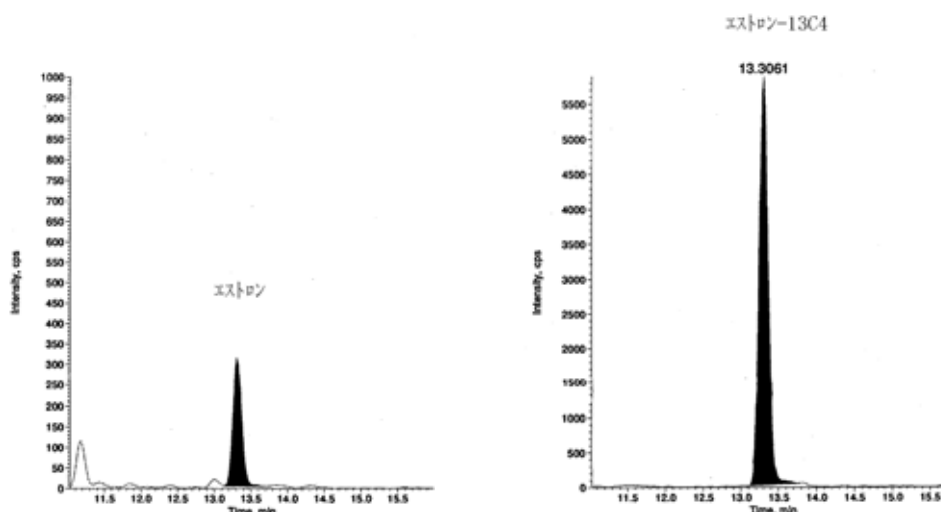


図-6.3.5.10 エストロンのクロマトグラム（脱脂粉乳国産1）

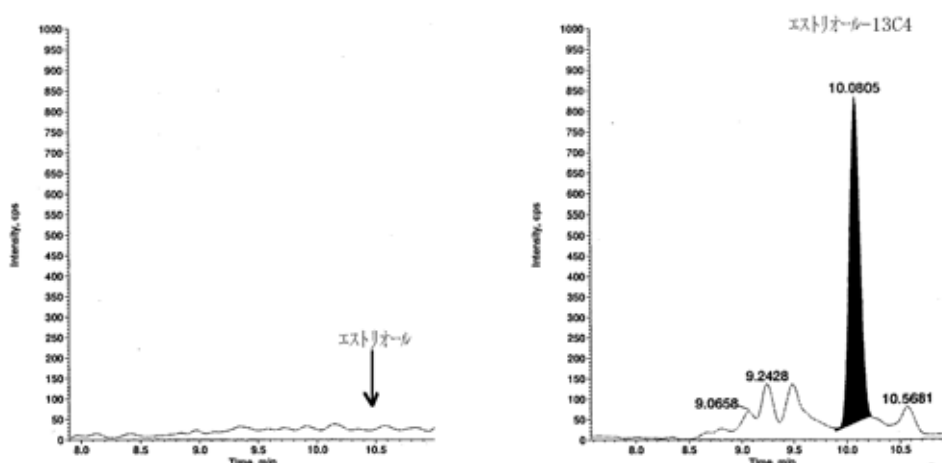


図-6.3.5.11 エストジオールのクロマトグラム（脱脂粉乳国産1）

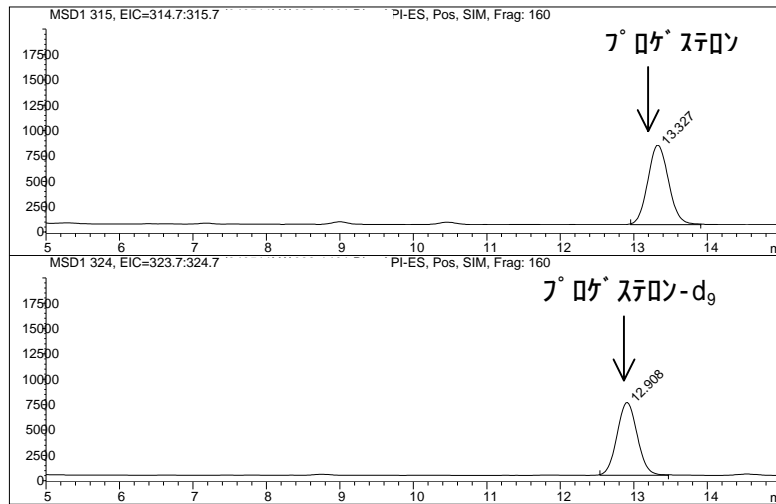


図-6.3.5.12 プロゲステロンのクロマトグラム（脱脂粉乳国産1）

6.3.5.3 添加試料(牛乳及び脱脂粉乳)のクロマトグラム

添加試料の(牛乳及び脱脂粉乳)のクロマトグラムを図-6.3.5.13～6.3.5.20に示した。

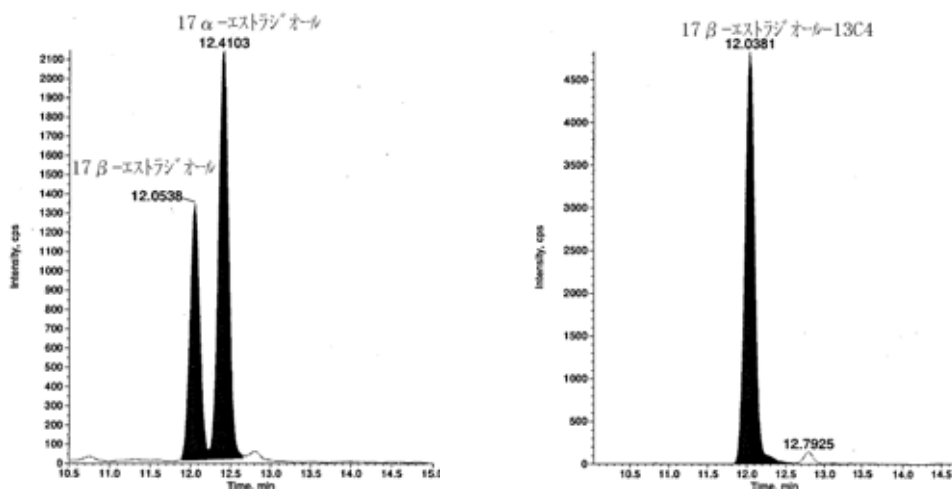


図-6.3.5.13 エストラジオールのクロマトグラム（牛乳）

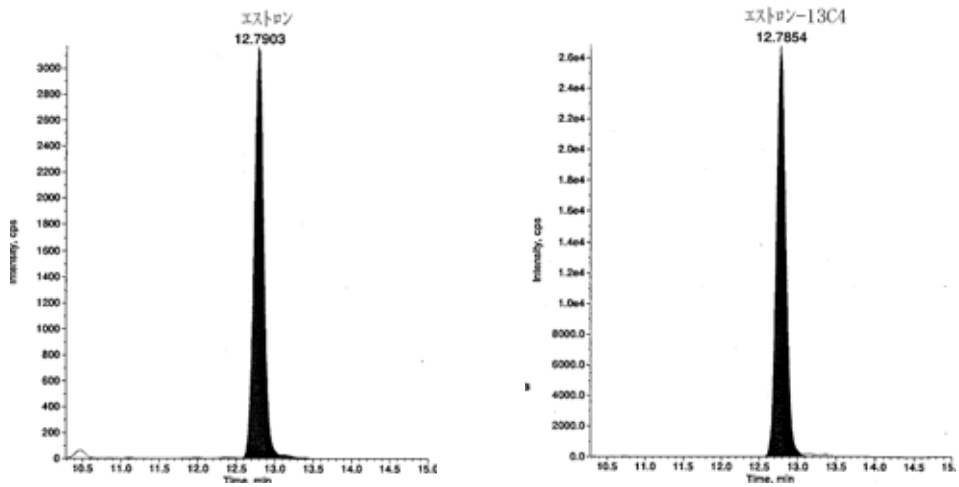


図-6.3.5.14 エストロンのクロマトグラム（牛乳）

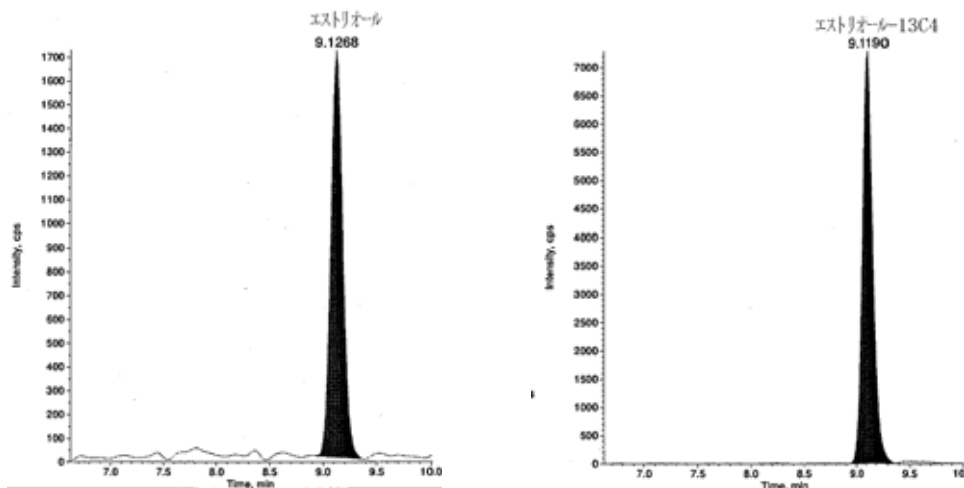


図-6.3.5.15 エストリオールのクロマトグラム（牛乳）

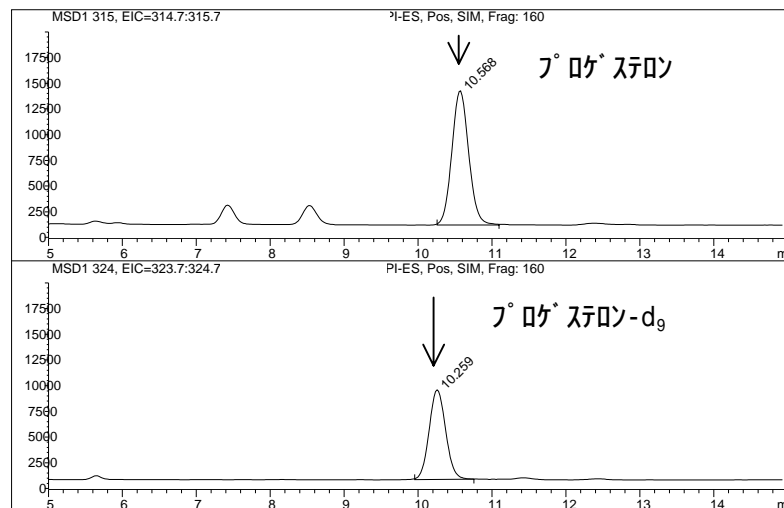


図-6.3.5.16 プロゲステロンのクロマトグラム（牛乳）

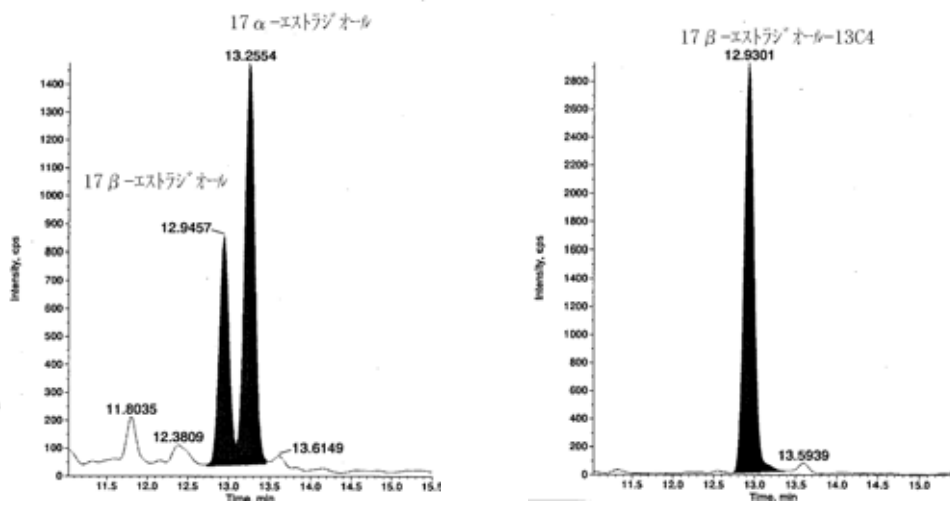


図-6.3.5.17 エストラジオールのクロマトグラム (脱脂粉乳)

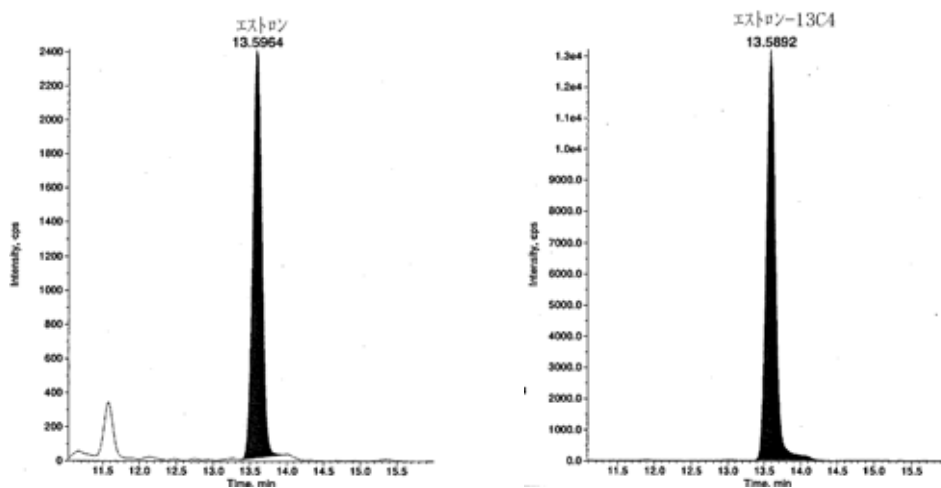


図-6.3.5.18 エストロンのクロマトグラム (脱脂粉乳)

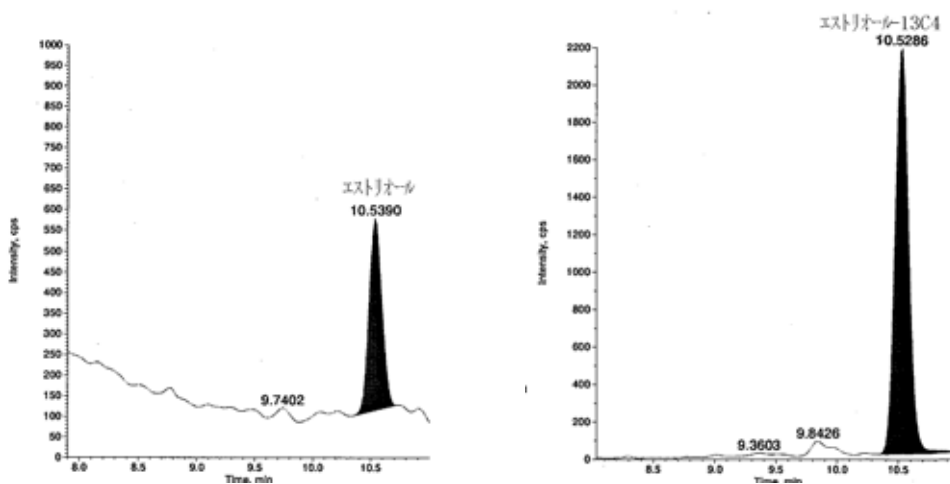


図-6.3.5.19 エストリオールのクロマトグラム (脱脂粉乳)

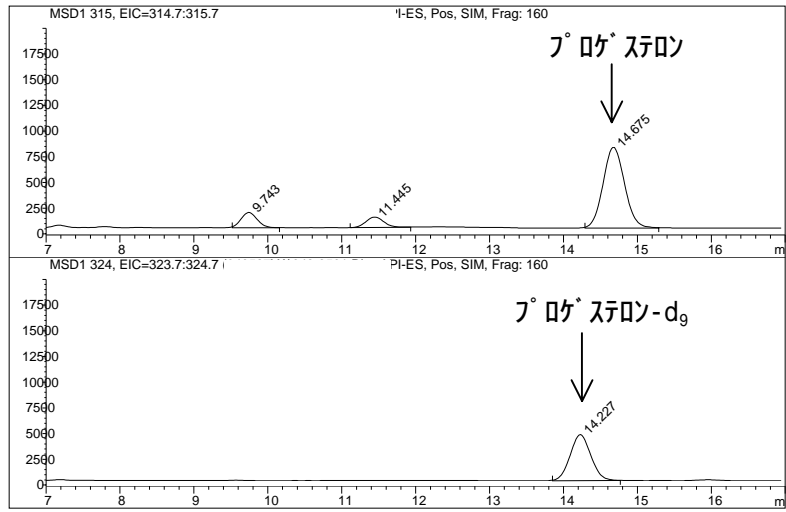


図-6.3.5.20 プロゲステロンのクロマトグラム (脱脂粉乳)

7 まとめ

- 1) 国内に流通している牛乳及び脱脂粉乳中に含有される牛の性ホルモン(17 β 及び17 α -エストラジオール, エストロン, エストリオール並びにプロゲステロン)の含有量についてエライザー法(スクリーニング試験)及び精密分析(機器分析)により調査した。

最初に, 牛乳100検体について, 検体中の17 β 及び17 α -エストラジオール, エストロン, エストリオール並びにプロゲステロン含有量の測定を, エライザー法により実施した。

次にそのうちの任意に選択した30検体について, 各ホルモンを個別に測定する機器分析による精密分析を実施した。

脱脂粉乳は, 国産品15検体及び輸入品11検体について, エライザー法及び精密分析を実施した。

- 2) 精密分析によるエストロゲン(17 β 及び17 α -エストラジオール, エストロン, エストリオール)の測定結果から, 牛乳及び脱脂粉乳中ではエストロンのみがほぼ全検体から検出された。牛乳におけるエストロン含有量は, 0.006~0.021 ng/gの範囲にあり, 全平均は0.014 ng/gであった。また, エライザー法では, 範囲は0.005~0.023 ng/g, 全平均は0.012 ng/gであった。

本試験で用いたエライザーキットは反応性は異なるものの, 17 β 及び17 α -エストラジオール, エストロン, エストリオールのいずれにも反応し, エストロンの感度は17 α -エストラジオール 1に対して0.87である。従って, 検体中にエストロンのみが存在している場合はエライザー法による測定値は精密分析よりも低めに出るはずである。

本調査において, 精密分析による牛乳中のエストロン含有量は, エライザー法より若干高めの値を示した。この値をエライザー法の感度で補正を行うと, 範囲は0.005~0.018 ng/g, 全平均は0.012 ng/gとなり, 精密分析とエライザー法との差がほとんどなくなった。

- 3) 脱脂粉乳中のエストロゲン含有量は, 精密分析では0~0.052 ng/gの範囲を示し, 全平均は0.034 ng/gであった。一方, エライザー法では0.013~0.049 ng/gの範囲を示し, 全平均は0.038 ng/gとなり, エライザー法の結果がわずかに高めに出る傾向があった。

- 4) 精密分析を実施した牛乳について, エストロン硫酸抱合体及び17 β - , 17 α -エストラジオールグルクロン酸抱合体の含有量測定を行った。

すなわち, エストロン硫酸抱合体についてはスルファターゼ処理後の, また17 β - , 17 α -エストラジオールグルクロン酸抱合体については, グルクロニダーゼ処理を行った後に, 各物質を測定した。

その結果, 硫酸抱合体となっているエストロンの含有量は, 0.062~0.14 ng/gの範囲を示し, 全平均値は0.088 ng/gとなり, 遊離のエストロン含有量に比べ約6.5倍含有されていることが分かった。

また, 17 α -エストラジオールの遊離体は検出せず(検出限界:0.005 ng/g)であったのに対し, グルクロン酸抱合体となっている17 β -エストラジオールの含有量は, 0~0.019 ng/g

の範囲を示し，全平均値で0.011 ng/g含有されていた。

また，グルクロニダーゼ処理を行った検体からは 17 β -エストラジオールは検出されなかった。

- 5) プロゲステロンについては，牛乳，脱脂粉乳ともエライザー法の測定値が精密分析の測定値よりも高い傾向にあった。また，脱脂粉乳における国産品と輸入品の含有量を比較すると，外国産の方が全般的に高い値を示した。

以 上