尿中代謝産物排泄量から推定した 日本人妊婦のビスフェノール A 摂取量

藤 巻 可 弓^{*1}, 荒 川 千夏子^{*1}, 吉 永 淳^{*1}, 渡 辺 知 保^{*2},
芹 澤 滋 子^{*3}, 今 井 秀 樹^{*3}, 白 石 寛 明^{*3}, 水 本 賀 文^{*4}

^{*1}東京大学大学院新領域創成科学研究科

^{*2}東京大学大学院医学系研究科

^{*3}国立環境研究所, ^{*4}自衛隊中央病院

Estimation of Intake Level of Bisphenol A in Japanese Pregnant Women Based on Measurement of Urinary Excretion Level of the Metabolite

Kayumi FUJIMAKI^{*1}, Chikako ARAKAWA^{*2}, Jun YOSHINAGA^{*2}, Chiho WATANABE^{*2},
Shigeko SERIZAWA^{*3}, Hideki IMAI^{*3}, Hiroaki SHIRAISHI^{*3} and Yoshifumi MIZUMOTO^{*4}

^{*1}*Institute of Environmental Studies, University of Tokyo, Tokyo*

^{*2}*Department of Human Ecology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo*

^{*3}*National Institute for Environmental Studies, Ibaraki*

^{*4}*Self-Defense Force Central Hospital, Tokyo*

Abstract **Objective:** The daily bisphenol A (BPA) intake level of Japanese pregnant women was surveyed based on the measurement of the urinary excretion level of a BPA metabolite.

Methods: Spot urine samples were collected from 56 pregnant women who visited the gynecology division of a hospital for a routine health check between June and October 2003. The urinary concentrations of the BPA metabolite and creatinine were measured by GC/MS/MS and spectrophotometry, respectively. Daily BPA intake was assumed to be equal to daily excretion.

Results: The daily intake of BPA among Japanese pregnant women was estimated to be in the range of <0.3 to 7.9 µg/day (median <2.0 µg/day), being consistent with the levels in previous studies for non-pregnant Japanese women. This level was far below the current Acceptable Daily Intake (0.01 mg/kg/day) which was set by the European Commission. The maximum estimated intake per body weight (0.16 µg/kg/day) reached 1/10 of the Lowest Adverse Effect Level of BPA for pregnant mice for a reproductive effect on the offspring (2 µg/kg/day).

Conclusion: It is desirable to lessen BPA intake from a precautionary viewpoint, particularly in pregnant women.

Key words: bisphenol A (ビスフェノール A), Japanese pregnant women (日本人妊婦),
spot urine (スポット尿), GC/MS/MS (ガスクロマトグラフィー・タンデム質量分析法)
daily intake (一日摂取量)

1. 緒 言

妊娠期のビスフェノール A (以下 BPA) 曝露が出生した仔の生殖機能や行動に影響を与えたという動物実験の

結果が得られている。vom Saal et al. (1) は, 成長したマウスの無毒性量 (NOAEL, 5 mg/kg/day (2)) と比較して, 極めて低用量 (2 µg/kg/day) の BPA を妊娠期の母親マウスに投与することで, オスの仔マウスの副睾丸のサイズが減少し, また 20 µg/kg/day の投与で精子産生力が低下したことを報告した。Kawai et al. (3) は低用量の BPA (2, 20 µg/kg/day) を妊娠期の母親マウスに投与することで, いずれの用量においてもオスの仔マウスの攻撃的な行動が一過性ではあるが増加し, 相対精巣重量を低下させ,

受付 2004 年 7 月 15 日, 受理 2004 年 8 月 20 日

Reprint requests to: Jun YOSHINAGA

Institute of Environmental Studies, University of Tokyo; 7-3-1 Hongo,
Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

TEL & FAX: +81(3)5841-8859

生殖器の発達を阻害したことを報告した。

一方、BPA は、ポリカーボネート樹脂やエポキシ樹脂の原材料として使われ、これらの樹脂が食品包装材、缶詰やレトルト食品内張りなどとして多用されてきたことから、人において比較的大量の経口曝露が起こる可能性が示唆されている。たとえば河村ら (4) は、GC/MS 法を用いて缶コーヒー 1 本あたり最大で 40 μg の BPA が含まれていることを報告した。こうした報告によって社会的な関心が高まり、現在ではこのような缶は使用されていないが、当時このような缶コーヒーを 1 日 1 本飲むことで、約 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を摂取していたことになる。また、尾崎ら (5) は、GC/MS 法を用いて再生紙でつくられた食品包装材に BPA が最大で 26 $\mu\text{g}/\text{g}$ 含まれていたことを報告している。このように個別の食品への溶出量や食品と接触する容器等の含有量の測定はこれまでに多く行われているが、BPA の総摂取量に関する報告はごく最近になるまでほとんどなかった。

ヒトへの投与実験から、摂取された BPA の代謝経路が明らかにされつつある。経口投与量のほぼ 100% が消化管で吸収された後、肝臓でグルクロン酸抱合を受けて、極めて短い半減期 (6 時間以内) でほぼ全量が尿中に排泄されることがわかっている (6)。よって尿中 BPA 代謝産物 (グルクロン酸抱合体、以下単に尿中 BPA という) 排泄量は一日摂取量のよい指標となると考えられ、尿中 BPA を分析してヒトの曝露レベルを報告している例が増えてきた。Arakawa et al. (7) は、GC/MS/MS 法を用いて 36 人の男子学生の 24 時間尿を分析して BPA の一日摂取量を <0.21–14 $\mu\text{g}/\text{day}$ (中央値 1.2 $\mu\text{g}/\text{day}$) と報告した。Tsukioka et al. (8) は GC/MS 法を用いて男性 11 名、女性 11 名のボランティアの 24 時間尿中 BPA 排泄量から一日曝露量を 0.48–4.5 $\mu\text{g}/\text{day}$ (平均 1.68 $\mu\text{g}/\text{day}$) と報告した。

また、今中 (9) は GC/MS 法を用いて病院給食を分析し、BPA 摂取量を 0.19–3.7 $\mu\text{g}/\text{day}$ (平均 1.2 $\mu\text{g}/\text{day}$) と報告した。以上から、日本人の平均的な BPA 摂取量は 1–2 $\mu\text{g}/\text{day}$ で、最大でその 10 倍程度まで達すると推測される。この最大摂取レベルは vom Saal et al. (1) が報告した胎児期曝露の生殖影響の LOAEL の 1/5–1/10 となる。しかしこれまで妊婦を対象とした BPA 摂取量に関する報告はない。そこで本研究は、特に感受性が高いと考えられる胎児への BPA 曝露レベルを評価するために、日本人妊婦のスبット尿中 BPA 分析に基づいて、BPA 摂取量を推定することを目的とした。

2. 方 法

2.1 被験者

2003 年 6–10 月の期間中、都内某病院の産婦人科を定期検診で受診し、担当医師から本調査の目的、方法等の説明を受け、尿提供の同意の得られた 21 歳から 43 歳 (平均年齢 31 歳) の 56 名の妊娠 1–9 ヶ月の妊婦を対象とした。なお、本調査の実施にあたっては、当該病院の倫理

審査委員会で承認を得た。

2.2 サンプル

尿提供を口頭で同意した対象者について、一般尿検査用に採取されたスبット尿の残りをサンプルとした。受診時検査用に採取され、検査が終わった尿を病院の検査部において 50 ml ポリプロピレン製ボトル (アズワン製) に分注し、一時冷凍保存した。その後、保存サンプルを解凍し、尿中 BPA 濃度測定用・尿中クレアチニン濃度測定用に 15 ml ポリプロピレン製スピッツ (イワキ製) に分注し、測定まで再度冷凍保存した。採尿器具として用いたポリプロピレン製ボトル、ポリプロピレン製スピッツはいずれも中性洗剤で洗浄後、水道水、超純水の順ですすぎ、乾燥させ、メタノールで洗浄したものを使用した。

2.3 分析操作

2.3.1 採尿用器具からの溶出試験

一般検査用に病院で使用されている採尿カップ、尿試験紙、および本調査で BPA 測定用の採尿に使用したポリプロピレン製ボトル、ポリプロピレン製スピッツからの BPA 汚染を調べた。容器類はそれぞれランダムに 3 検体を選び、採尿カップ、ポリプロピレン製ボトルには 25 ml の、ポリプロピレン製スピッツには 5 ml の 20% アセトンを入れ約 1 時間室温に放置した。3 つのガラス製ビーカーにそれぞれ 25 ml の 20% アセトンを取り、尿試験紙を 2–3 秒浸し、すぐに引き上げた。試験後の 20% アセトン中 BPA 溶出量は ELISA 法 (高感度 BPA ELISA キット、日本エンバイロケミカルズ社) によって定量した。操作手順はキットのマニュアルに従い、Bio Rad 社製プレートリーダー Benchmark を使用して定量した。なお本法による BPA の検出下限 (ブランクの 3 σ) は 0.04 ng/ml であった。

2.3.2 尿中 BPA 濃度測定 (7, 10)

遠沈管に尿試料 1 ml をとり、 β -グルクロニダーゼ (100,000 units/ml, Helix Pomatia 由来, 和光純薬社製) 30 μl を添加し、35–37°C で 120 分間反応させ、BPA のグルクロン酸抱合体を加水分解し、フリーの BPA とした。その後、サロゲート物質として重水素でラベルした BPA (BPA-d16) (Cambridge Isotope Laboratories 製) を 10 ng、ジクロロメタン 2 ml を添加・混合した後、1500 rpm で 20 分間遠心分離した。ジクロロメタン層のみを採取し、窒素を吹き付けて乾固させた。乾固した残渣にヘキサン 2 ml を加えて溶解し、あらかじめアセトン 10 ml、ヘキサン 10 ml の順で 2 巡コンディショニングしておいた固相抽出カラム (Isolute NH2SPE カラム (6 ml) (International sorbent technology 社製)) に通した。ジクロロメタン:ヘキサン混合溶液 (1:1) 8 ml、ジクロロメタン:酢酸エチル混合溶液 (1:1) 8 ml をカラムに通して洗浄後、アセトン 8 ml で BPA を溶離させ、窒素を吹き付けて乾固させた。乾固した残渣にアセトン 100 μl 、ビストリフルオロアセト

Table 1 Conditions of GC/MS/MS for urinary BPA analysis

Column	HP-5MS 30×0.25 min i.d. df=0.25 µm	
Column Temperature	60°C (2 min)→10°C/min→260°C	
Injector Temperature	250°C	
Carrier gas	Helium 1.2 ml/min	
Injection	3 µl/Injection, pulsed splitless mode	
Interface Temperature	260°C	
Ion source Temperature	200°C	
Ion measured for quantitation		
Retention Time (min)	BPA	20.38
	BPA-d16	20.31
Monitoring ion	BPA	m/z 357→m/z 191, 267, 341
	BPA-d16	m/z 368→m/z 197, 277, 348

アミド (BSTFA) (和光純薬社製) 100 µl を添加して誘導体化した後、ガスクロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (GC/MS/MS, Thermo Quest 製 Polaris Trace GC) を用いて測定を行った。測定条件を Table 1 に示した。

以上の BPA 測定は、原則として操作ブランク 3、精度管理用尿サンプル (あらかじめ濃度測定済 (8.0 ng/ml) のストック尿 1、尿サンプル 8 からなる 12 検体を 1 バッチとして行なった。操作ブランクの測定値の標準偏差の 3 倍を検出下限として、バッチ毎の下限値を求めた。なお、内部標準として添加した d 体の回収率は 74~121% の範囲にあり、平均値は 93% であった。

なお BPA 測定の前処理に使用した遠沈管、ビーカーなどのガラス器具は、中性洗剤で洗浄後、水道水、超純水の順ですすぎ、乾燥させ、200°C のオーブンで 4 時間乾燥させたものを使用した。メスフラスコやメスシリンダーのような加熱できないものは、2.2 のサンプル採取用容器と同様の方法で洗浄、乾燥後、メタノールで洗浄したものを使用した。また、アセトン、ヘキサン、酢酸エチル、ジクロロメタン (残留農薬試験用試薬) は和光純薬社製を使用した。

スポット尿中 BPA 濃度は別途 Jaffe 法で測定した尿中クレアチニン濃度で補正した。クレアチニン濃度測定は和光純薬社製のクレアチニン-テストワコーキットと、吸光分光光度計として日本分光社製 CV-500 を使用して行った。

3. 結 果

3.1 採尿用器具からの溶出

尿試験紙からは ~1 ng の BPA が検出されたが、その他の採尿器具からは検出されなかった (Table 2)。平均的な採尿量を 20 ml と仮定すると、Arakawa et al. (7) の GC/MS/MS による尿中 BPA 濃度測定値 (中央値 1.2 ng/ml) から、サンプリングした尿中の BPA の量は 20 ng 程度と想定される。尿試験紙からの BPA 溶出を最大見積もり 1 ng と仮定すると、サンプリングした尿に対して 5% 程度の BPA 汚染であり、許容できる汚染レベルであると判断し

Table 2 Leaching of BPA from the urine sampling apparatuses

Urine sampling apparatuses	
Urine test cup	<1 ng
Stick paper for urinalysis	~1 ng
Bottle made of polypropylene	<1 ng
Test tube made of polypropylene	<0.2 ng

た。

3.2 尿分析の測定精度

3.2.1 GC/MS/MS 法による尿中 BPA 濃度測定における再現性

本研究で用いた尿中 BPA 濃度測定の再現性を異なる 3 バッチで前処理・測定した精度管理用尿サンプルの結果から評価した (Fig. 1)。なおバッチ毎の測定回数はバッチ 1, 2 は n=1、バッチ 3 は n=3 であった。再現性は相対標準偏差 (RSD, %) で表すと 9.6% であり、図中各ポイントについているエラーバーは本研究と全く同じ分

Fig. 1 Reproducibility of BPA measurement. Bar attached to the marks denotes the repeatability of measurement, as reported by Arakawa et al. (7) using the same analytical procedure used in the present study. Number of within-batch repetition of measurements was n=1 for batches 1 and 2, and n=3 for batch 3.

析法で Arakawa et al. (7) が求めた併行精度から算出した測定誤差 (9.0%) である。これを考慮すると、バッチ毎の測定値の変動は有意ではなかった。

3.2.2 尿中BPA濃度

尿中濃度に換算した検出下限は測定バッチによって 0.1~1.1 ng/ml と異なっていた。全尿データ (n=56) を一括して解析するために最も高い検出下限値 (1.1 ng/ml) で統一して処理することとした。尿中BPA濃度は <1.1~5.4 ng/ml (中央値 <1.1 ng/ml) (n=56) であった。このうち、尿中BPA濃度が 1.1 ng/ml 以上で検出されたものは17サンプルであった。これを、尿中クレアチニン濃度を用いてクレアチニン 1g の排泄量あたりに換算したところ、0.4~6.6 µg/g cre (中央値 1.7 µg/g cre) (n=17) であった。一方、BPA が検出されなかった39サンプルについては、尿中BPA濃度を検出下限 1.1 ng/ml と仮定し、尿中クレアチニン濃度を用いて換算したところ、0.3~7.4 µg/g cre (中央値 0.76 µg/g cre) (n=39) となった。

3.2.3 尿中BPA濃度から推定した一日BPA摂取量

Ouchi et al. (11) の報告に基づいて、一日BPA摂取量は、3.2.2で算出した尿中BPA濃度 (µg/g cre) に日本人女性のクレアチニン一日排泄量代表値 1.2g を掛けることで推定した。尿中BPAが検出された17名の対象者の一日BPA摂取量は 0.5~7.9 µg/day (中央値 2.1 µg/day) と推定された。また、尿中BPAが検出されなかった39名の尿中濃度を最大濃度である検出下限値 1.1 ng/ml と仮定し、最大見積もりを行なったところ 0.3~8.9 µg/day (中央値 0.9 µg/day) と推定された。Fig. 2 (a) (b) に尿中BPA濃度から推定したBPA摂取量の分布をヒストグラムで示した。

全体としてみると摂取量は <0.3~7.9 µg/day (中央値 <2.0 µg/day) と推定される。

Fig. 3 には本研究で推定したBPA一日摂取量分布と Arakawa et al. (7) が測定した男子学生 (n=36) の分布とを比較した。BPA が検出されなかった妊婦の尿中BPA濃度は最大の検出下限値 1.1 ng/ml であると仮定して算出したため、実際にはさらに低い摂取量分布になる。

4. 考 察

尿中排泄量に基づいて一日摂取量を推定するにあたって、BPA は半減期も短く、摂取されたBPAのほとんどが尿中に排泄されることから、24時間尿をサンプルとすることが最良であると考えられる。しかし、24時間尿とすることは、対象者の負担を考えると多くの場合困難である。また、Arakawa et al. (7) の報告によると、23歳から40歳の男女5名から5日間24時間尿をサンプリングしてBPA濃度を測定した結果、BPAが検出された3名の一日排泄量の個人内 (日間) 変動は91%となり、同じ人であっても、日によってBPA摂取量が大きく異なった。よって、24時間尿を分析しても個人の日常的なBPA摂取量の代表値を推定することは困難であると結論されて

Fig. 2 Histogram of the daily excretion of urinary BPA (mg/day).

(a) Histogram for 17 subjects with detectable BPA concentrations.

(b) Estimated histogram for 39 non-detected subjects based on the assumption that the concentrations of the non-detected subjects was at the detection limit (1.1 ng/ml).

いる。しかし、サンプリングを無作為に行い、サンプル数を多くすることで、スポット尿を使用しても集団レベルの一日摂取量の代表値を推定することが可能と考えられ、本研究ではスポット尿による妊婦のBPA摂取量の推定を行った。既往の研究で報告されているスポット尿中BPA濃度をもとに一日排泄尿量を2L、クレアチニン排泄量を1.2gと仮定して日本人の一日BPA摂取量を推定すると、例えば、Brock et al. (12) の測定値に基づいて推定される摂取量の範囲は 0.2~1.0 µg/day, Imai et al. (13) の測定値に基づいて推定される摂取量は 0.12~4.6 µg/day, Hanaoka et al. (14) の測定値によって推定される摂取量の中央値は 1.2 µg/day である。これらと比較すると、本研究から推定した妊婦56名の一日摂取量である、<0.3~7.9 µg/day (中央値 <2.0 µg/day) はほぼ同じレベルであり、本研究を含めた既往の文献から、現代日本人のBPA一日摂取量の代表値は 1~2 µg/day であり、妊婦でも他の集団と大きな差はないと結論できる。

しかしながら本研究の結果をヒストグラムにして示した Fig. 3 (a) と、男子学生の24時間尿を用い、本研究とまったく同じ分析法を使用してBPA摂取量を調べた Arakawa et al. (7) の結果の Fig. 3 (b) とを比較すると、妊婦の摂取量はBPA不検出者の摂取量を最大に見積もっても、Fig. 3 (b) の男子学生の摂取量分布より低値側に分布

Fig. 3 Comparison of urinary excretion of BPA.
(a) Present study including BPA-detected subjects (shaded bar) and estimated values for non-detectable subjects (open bar) (for the estimation method, see text).
(b) Thirty-six male university students cited from Arakawa et al. (7).

していることがわかる。すなわち、より詳細に分布を観察すると、今回の妊婦のBPA一日摂取量はArakawa et al. (7) の報告した男子学生の摂取量よりやや低いといえる。このような違いは、おそらく食生活の違いに由来するものと推測されるが、本研究では対象者の食生活調査を行っていないため、これについては今後の課題である。

欧州のScientific Committee on Food (SCF) によるBPA一日許容摂取量 (ADI) は、ラット三世代生殖・発生毒性試験結果から得られた一般毒性の無毒性量 (NOAEL) 5 mg/kg/day に安全率 1/500 を掛けて求められた 0.01 mg/kg/day である (2)。本研究で推定した日本人妊婦の一日摂取量は <0.3–7.9 µg/day (中央値 <2.0 µg/day) となり、体重を 50 kg と仮定して算出すると、最大摂取量 0.16 µg/kg/day でも SCF が設定した BPA の ADI の約 1/60 の値である。

一方、2.0 µg/kg/day という低用量での生殖影響に関する vom Saal et al. (1) の実験結果は再現性が得られていないことが指摘され、SCF の ADI 算定に採用されなかった経緯がある。しかし、仮に実験動物の生殖影響の母親の摂取量に関する LOAEL が 2.0 µg/kg/day であるとし、SCF 同様に ADI を算出すると、0.004 µg/kg/day となる。今回の妊婦の最大摂取量 0.16 µg/kg/day はこの 40 倍となる。よって、今後こうした低用量実験の結果を注視していく必要があるとともに、予防原則に基づき我々の BPA の摂取量を低減化していくことが望ましい。そのために食生活や生活習慣等を調査し BPA 曝露源を明らかにす

ることが重要である。

5. 謝 辞

尿サンプルを提供して下さった対象者の方々、採尿にご協力下さった自衛隊病院検査部のスタッフの方々、ELISA キットをご提供いただいた日本エンバイロケミカルズ株式会社に深謝いたします。

文 献

- (1) vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Weishons WV. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1999; 14: 239–260.
- (2) Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on bisphenol A. SCF/CS/PM/3936 Final 3 May 2002, European Commission.
- (3) Kawai K, Nozaki T, Nishikata H, Aou S, Takii M, Kubo C. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 175–178.
- (4) 河村葉子, 佐野比呂美, 山田 隆. 缶コーティングから飲料へのビスフェノール A の移行. *食衛誌* 1999; 40: 158–165.
- (5) 尾崎麻子, 山口之彦, 藤田忠雄. 食品関係の紙製容器包装に含まれる環境ホルモン及びその関連物質. 第5回環境ホルモン学会 講演要旨集 2002; 126.
- (6) Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1281–1287.
- (7) Arakawa C, Fujimaki K, Yoshinaga J, Imai H, Serizawa S, Shiraishi H. Daily urinary excretion level of bisphenol A. *Environ Health Prevent Med* 2004; 9: 22–26.
- (8) Tsukioka T, Terasawa J, Sato S, Hatayama Y, Makino T, Nakazawa H. Development of analytical method for determining trace amounts of BPA in urine samples and estimation of exposure to BPA. *Kankyo Kagaku* 2004; 14: 57–63.
- (9) 今中雅章. フェノール類の食品汚染実態及び摂取量に関する調査研究—病院給食を用いたビスフェノール A 摂取量調査—. 厚生科学研究費助成金 (生活安全総合研究事業) 研究分担報告書, 2001.
- (10) 国立環境研究所特別研究報告書 (SR-46), 2002; 3–6.
- (11) Ouchi K, Watanabe S. Measurement of biphenol A in human urine using liquid chromatography with multi-channel coulometric electrochemical detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 780: 365–370.
- (12) Brock JW, Yoshimura Y, Barr JR, Maggio VL, Graiser SR, Nakazawa H, Needham LL. Measurement of bisphenol A levels in human urine. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2001; 11: 323–328.

- (13) Imai H, Morita M. Determination of bisphenol A- β -glucuronide in human urine. 第 4 回環境ホルモン学会 講演要旨集 2001; 167.
- (14) Hanaoka T, Kawamura N, Hara K, Tsugane S. Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents. *Occup Environ Med* 2002; 59: 625-628.