

分担研究報告要旨

Bisphenol A のラット及びサルにおける体内動態試験

分担研究者 大野泰雄 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター，薬理部長  
研究協力者 紅林秀雄 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター，薬理部

研究要旨

被検薬物 Bisphenol A (BPA) の標識化合物 [ring-<sup>14</sup>C(U)] を合成し、放射性純度 (99%) 及び放射能濃度 (11.5 MBq/mg) の高い化合物が得られた。この標識化合物を含む被検薬物を雌雄の F344 ラットに経口投与 (20, 100, 500 μg/kg), 或いは静脈内投与 (100, 500 μg/kg) し、経時的に採血して血漿中放射能濃度の変化を測定した。その結果、血中濃度は投与量に応じてほぼ線形に増加した。また、BPA の吸収率は 100 μg/kg ではほぼ 50% であった。また、雄の方が雌より血中濃度が高かった。なお、経口投与では腸肝循環が著明に認められ、消失半減期は 100 μg/kg 投与 2～3 日後で約 15-18 時間であった。BPA は乳汁中に排泄され、排泄濃度は投与後 8 時間で最高になり、この時の乳汁排泄濃度は血漿中濃度の約 1/4 であった。

雄サルに BPA を 100 μg/kg 静脈内投与と経口投与したときの C<sub>max</sub> および AUC に差は少なく、生物学的利用能 bioavailability はほぼ 100% であった。また、明瞭な腸肝循環は認められなかった。消失半減期 (投与後 8-48 時間) は約 15 時間であった。

A. 研究目的

プラスチックから溶出することの示されている BPA は主に *in vitro* の試験系での作用から内分泌攪乱物質としての作用を持つとされており、今までのところ、ヒトを含む動物において、*in vivo* でそのような作用は示されていないが、ヒト内分泌系への作用や神経系への作用が懸念されている。そこで本研究では、BPA が *in vivo* の動物やヒトにおいてもそのような作用を示す可能性について考察するため、BPA の生体内動

態について総合的に検討する。特に、成熟ラット、妊娠ラット及び新生児ラットにおいて定量的オートラジオグラフィーを行い内分泌器官及び中枢神経系への微細な分布についての情報を得る。また、ヒトへの外挿に資するためにサルにおける吸収及び血中動態について検討する。

B. 研究方法

B-1 ラットにおける BPA の体内動態の検討

B-1-1. 被験物質

<sup>14</sup>C で標識した [ring-<sup>14</sup>C(U)]-Bisphenol A (以下 <sup>14</sup>C-BPA) を被験物質として用いる。<sup>14</sup>C-BPA は第一化学薬品 (株) 東海研究所より購入した (純度が 97% 以上, Lot No. : CP-2244, 比放射能: 11.5 MBq/mg, 2.62 GBq/mmol, 性状: エタノール溶液 (濃度: 39.0 MBq/mL), 保存条件: 窒

[略語]

BPA, Bisphenol A; <sup>14</sup>C-BPA, [ring-<sup>14</sup>C(U)]-Bisphenol A; AUC, 血漿中濃度・時間曲線下面積; EPA (Environment Protection Agency), 米国環境保護庁; C<sub>max</sub>, 最高血漿中濃度

素ガス置換， $-80^{\circ}\text{C}$ ）。なお，標準物質として非標識のBPAはナカライテスクで購入したものをを用いた。投与溶液は所定量の標識被験物質のエタノール溶液を試験管に採取し，窒素ガスでエタノールを留去した後，1/15Mリン酸緩衝液(pH 7.4)を加え，溶解させた。

#### B-1-2. 試験系および飼育方法

試験動物は雌雄のF344ラット(10週令，雄200~270g，雌130~190g)，妊娠12，15，18日雌性および分娩後10日前後の哺育中雌性を日本チャールズ・リバーより購入した。妊娠および哺育中雌性ラットは9~10週齢で交配した妊娠日が既知の未経産の動物を購入した。プラグ確認日を妊娠0日とした。

動物は設定温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $55 \pm 10\%$ で飼育し，換気は最低15回/h r，照明は明暗サイクル12時間(6:00~18:00)でオールフレッシュ方式の外気をフィルターを通して常時補給した環境で，260W×380D×225H(mm)あるいは260W×380D×210H(mm)の飼育ケージで最大4匹で飼育した。なお，〈排泄試験〉ではステンレス製代謝ケージで個別飼育した。また，哺育中ラットはポリカーボネート製ケージで個別飼育した。

飼料は抗生物質，化学療法剤または予防薬を含まない市販のげっ歯類用飼料(MF，オリエンタル酵母工業)を使用し，自由摂取とする。水は水道水を動物実験棟では自動給水で，標識被験物質取扱施設では飲み口付きのポリ容器またはガラス容器で与えた。

#### B-1-3. 投与量および投与放射エネルギー

米国環境保護庁(EPA)勧告によるBPAの最大許容摂取量(0.05 mg/kg/day)および予備検討の結果を考慮して投与用量は経口投与では20，100，および $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ (投与液量は1 mL/kg，投与

放射エネルギーはそれぞれ0.23，1.15，及び $5.75 \text{ MBq}/\text{kg}$ )，静脈内投与では100および $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ (投与液量は1 mL/kg，投与放射エネルギーは1.15，および $5.75 \text{ MBq}/\text{kg}$ )と設定した。なお経口投与では胃内に強制投与，静脈内投与では尾静脈に投与した。

#### B-1-4. データ処理

試験成績の表示の基準は以下のとおり。

- 1) 試験成績は動物例数の平均値と標準偏差(SD)で表示する。
- 2) 放射能の検出限界はバックグラウンド値の2倍とする。
- 3) 動物例数の半数を越えて検出限界値未満の場合にはND(Not detected)と表示し，半数以下が検出限界値未満の場合には検出限界未満の数値も含めて計算し，例数の平均値および標準偏差(SD)で表示する。
- 4) 放射能濃度はBPAに換算して表示する。

#### B-1-5. 薬物速度論的パラメーターの算出法

- 1) 血漿中放射能濃度・時間曲線下面積(AUC)は台形法により指定時間範囲での実測値を用いる。
- 2) 最終の測定時点以降については片対数曲線の消失相を直線回帰して外挿することによりAUCを求める。
- 3) 静脈内投与後のAUCの算出に際し，時間 $t=0$ における濃度( $C_0$ )は，初期の片対数曲線を直線回帰し $t=0$ を代入して求める。
- 4) 消失半減期( $t_{1/2}$ )は指定時間範囲での実測値を用いて最小二乗法により求めた見かけの値として表示する。
- 5) いずれも個別値を用いて算出し，動物例数の平均値と標準偏差(SD)で表示する。

#### 実験1 血漿中放射能濃度の測定

$^{14}\text{C}$ -BPAを経口或いは静脈内投与した動物より経時的に採血し，血漿中放射能濃度の推移を求

めた。投与群は以下の通りで、各群 3 匹のラットを用いた。

<試験群>

群番号	性	投与	投与量
第 1 群	雄	経口	20 $\mu$ g/mL/kg
第 2 群			100 $\mu$ g/mL/kg
第 3 群			500 $\mu$ g/mL/kg
第 4 群	雌		20 $\mu$ g/mL/kg
第 5 群			100 $\mu$ g/mL/kg
第 6 群			500 $\mu$ g/mL/kg
第 7 群	雄	静脈	100 $\mu$ g/mL/kg
第 8 群			500 $\mu$ g/mL/kg
第 9 群	雌		100 $\mu$ g/mL/kg
第 10 群			500 $\mu$ g/mL/kg

<試料採取時間>

経口	血漿	15, 30 分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 時間
静脈	血漿	5, 10, 20, 30 分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 時間

なお、試料は経口投与では投与後 15, 30 分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 時間に、尾静脈よりヘパリン処理したマイクロピペットを用いて血液約 100  $\mu$  L をヘパリン入りマイクロチューブに採取した。静脈内投与の場合は投与後 5, 10, 20, 30 分, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 時間に投与部位と反対側の尾静脈から採血し、遠心分離 (8,060 $\times$ g, 室温, 5 min) 後、血漿 20  $\mu$  L をエッペンドルフピペットで分取した。これを 5 mm $\times$ 5 mm のティッシュペーパーに血漿 20

$\mu$  L をしみ込ませ、乾燥させた後、イメージングプレートに 24 時間コンタクトし、バイオイメージアナライザー (BAS 2000) により発光強度 (PSL) を求める。既知の放射能より求めた検量線から各試料中の放射能を得た。

実験. 2 尿、糞中排泄率、体内残存率の測定

$^{14}$ C-BPA 500  $\mu$  g/mL/kg (5.75 MBq/kg) を経口投与した雌雄ラット (それぞれ第 11 群および第 12 群とした。) をステンレス製代謝ケージに収め、168 時間後まで尿、糞を採取し、尿および糞中排泄率を求めた。また、最終試料採取後、ラットをエーテル麻酔死させ、体内残存率を測定した。

なお、尿および糞は分別採取し (採取時間毎にケージを少量の蒸留水で洗浄し、洗浄液は尿と合わせる)、投与後 168 時間にエーテル麻酔死させ、屍体を 0.5 M 水酸化ナトリウム 500 mL とトルエン 50 mL を加え、加熱還流し溶解した。これらの液をシンチレーター (HIONICFLUOR) に混和し液体シンチレーションカウンターにて 2 分間測定した。

実験. 3 組織内放射能濃度の測定

$^{14}$ C-BPA を胃ゾンデで強制経口投与した雌雄ラットを所定時間にエーテル麻酔死させたのち、全身オートラジオグラムを作製し、定量的全身オートラジオグラフィー法により組織内放射能濃度を測定する。なお、試験群は以下の通りで、1 群 3 匹とした。

<試験群>

群番号	性	作製時間
第13群	雄	30分
第14群		24時間
第15群		72時間
第16群	雌	30分
第17群		24時間
第18群		72時間

なお、BPAの投与量はいずれも500 μg/mL/kgで投与放射エネルギーは5.75 MBq/kgで、強制経口投与する。

実験. 4 胎仔および新生仔の放射能濃度の測定

<sup>14</sup>C-BPAを妊娠ラット(妊娠12, 15, 18日)または哺育中ラット(分娩後10日前後)に強制経口投与し、所定時間にエーテル麻酔死させたのち、全身オートラジオグラムを作製し、定量的全身オートラジオグラフィ法により胎仔および新生仔(雌雄各1匹)の組織内放射能濃度を測定した。測定方法は実験2と同じ。

試験群は以下のとおり。

<試験群>

群番号	動物種	作製時間
第19群	妊娠12日目	30分
第20群	雌ラット	24時間
第21群	妊娠15日目	30分
第22群	雌ラット	24時間
第23群	妊娠18日目	30分
第24群	雌ラット	24時間

第25群	哺育中雌	30分
第26群	ラット	24時間

なお、BPAの投与量はいずれも500 μg/mL/kgで投与放射エネルギーは5.75 MBq/kgで、強制経口投与する。

実験. 5 乳汁中放射能濃度の測定

哺育中の動物に<sup>14</sup>C-BPAを胃内に強制投与して乳汁および血液を経時的に採取し、血漿を分取したのち乳汁および血漿中放射能濃度の推移を求め、乳汁中への移行の程度について検討した。なお、<sup>14</sup>C-BPAは500 μg/mL/kg(5.75 MBq/kg)を1群3匹に投与し、血漿および乳汁を0.5, 2, 4, 8, 24, 48時間にわたり採取した。

<試験群>

群番号	性	採取試料
第27群	哺育中雌	血漿/乳汁

なお、BPAの投与量はいずれも500 μg/mL/kgで投与放射エネルギーは5.75 MBq/kgで、強制経口投与する。

なお、乳汁採取に際しては、乳児は母獣1匹につき5匹とし、乳汁採取1時間前に母獣から離し、乳汁採取後再び母獣に戻した。また、乳汁採取にあたり、乳汁採取30分前に0.5 IU/mLのオキシトシン生理食塩水溶液を1mL/kg腹腔内投与した。母獣を軽度エーテル麻酔し、乳頭よりマイクロピペットを用いて100 μLを搾乳した。血漿は尾静脈よりヘパリン処理したマイクロピペットを用いて血液約250 μLをヘパリン入りマイクロチューブに採取し、遠心分離(8,060 G, 室温, 5min)後、血漿100 μLをエッペンドルフピペットで分取した。これに組織溶解剤(SOLUENE-350)を加え、溶解した後、シンチレーター(HIONICFLUOR)10 mL加え、室温で静置下の後、液体シンチレーションカウンター

で2分間測定した。

## B-2 サルにおけるBPAの体内動態の検討

### B-2-1. 被験物質

B-1-1と同様。なお、静脈内投与溶液はリン酸緩衝液に溶解したのち、0.22 μmのフィルターで濾過した後に使用した。

### B-2-2. 試験系および飼育方法

米国テキサス州アリスのHRP, Inc.社より購入した成熟雌雄のカニクイサル (*Macaca fascicularis* (cynomolgus)) を使用した。サルはステンレス製ケージに個別に飼育した。実験開始時の体重は約2.5-4.6 kgであった。飼育室の設定は温度 21±3°C, 湿度 50±20%, 照明 12時間明, 12時間暗のサイクルで換気は1時間当たり10-15回で行った。餌は標準的な市販の飼料 (Teklad Certified Primate Chow #8726C) を自由に摂取させた。水は逆浸透水を紫外線照射したのち0.22 μmのフィルターを通したものを自由に摂取させた。

### B-2-3. 試験デザイン

#### 実験. 1 予備試験

雄のサルに100 μg/kg (1 mL/kg, 1.15 MBq/mL) をプラスチック製シリンジを用いて、一匹ずつの別々のサルに単回経口あるいは静脈内投与した。しかし、投与液を濾過した際に吸着が起これ、実際の投与量は経口投与では84 μg/kg 静脈内投与では83 μg/kgであった。投与前及び経口投与後0.25~168時間に、静脈内投与では0.083~168時間まで大腿静脈 (静脈内投与後0.083時間のみ上腕静脈) よりヘパリン含有試験管に、それぞれ1 mLずつ、合計12回採血した。これを遠心し得られた血漿0.1 mLを10 mLのシンチレーター (ReadyGel, Beckman) に混和し、放射活性を測定した。また、尿、糞、及びケージ洗浄液を毎日採取し、秤量後尿及び洗浄

液はその200 μLについて放射活性を測定した。糞は2倍量の精製水と混和・ホモジナイズし、その200mgを分析した。これを乾燥したのち燃焼させ、生成した<sup>14</sup>C-CO<sub>2</sub>をCarbo-Sorb (Packard)に吸収させ、その放射活性を測定した (Permafluor E, Packard)。

#### 採血時間

投与経路	投与前	投与後 (時間)
経口	0*	1.25, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 168
静脈	0*	0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 168

\* : During the pretreatment period, a control sample (1 mL blood) will be collected from each animal and the plasma will be pooled to be used for determination of background levels.

#### 糞尿の採取時間

検体	採取時間	
	投与前	投与後 (時間)
糞	24時間*	0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144and144-168時間
尿	24時間*	0-12, 12-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144and 144-168時間
ケージ洗浄液	24時間*	0-12, 12-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144and 144-168時間

\* : During the pretreatment period, a sample will be collected to be used for background level determination.

#### 実験. 2 本試験

同じ用量を雌雄3匹ずつのサルに実験. 1と同じ用量を経口投与及び静脈内投

与した。なお、6匹のサルに静脈内に単回投与した。その後、15日の洗浄期間後に同じサルを用いて、経口投与試験を行うこととした。但し、尿中に有意な放射活性が排出される時は更に洗浄期間を延長することとした。採血スケジュールは以下のとおり。その他は実験1と同じ。

#### 1回目投与（経口投与）

群	経路	投与前	投与後(時間)
1	静脈	0*	0.83, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 168

#### 2回目投与（経口投与）

群	経路	投与前	投与後(時間)
1	経口	0*	0.25, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 168

\*: During the pretreatment period, a control sample (1 mL blood) will be collected from each animal and the plasma will be pooled to be used for determination of background levels.

### C. 研究結果

#### C-1. ラットにおけるBPAの体内動態

##### C-1-1. BPAの血中動態

経口及び静脈内投与後BPAは投与経路にかかわらず汚染レベルに近い用量から投与量に依存して血中濃度が増加した。また、経口投与では投与後4時間以後に再び血中濃度が増加し、腸肝循環があるものとおもわれた。雌雄差については雄の方が血中濃度が高かった。100  $\mu$  g/kg投与2~3日後の消失半減期は約15-18時間であった。生物学的利用能は100  $\mu$  g/kgの時は雄が54.6%、雌で47.6%であり、500  $\mu$  g/kgの

時は雄が31.9%、雌で69.5%であった。

##### C-1-2. BPAの乳汁中排泄

BPAは乳汁中に排泄される。排泄濃度は投与後8時間で最高になり、その後低下していく。また、最高濃度時の乳汁排泄濃度は血漿中濃度の約1/4であった。

##### C-1-3. BPAの体内分布

現在、試験実施中であり、結果はまだ得られていない。

#### C-2. サルにおけるBPAの体内動態

##### C-2-1. BPAの血中動態

2匹の雄サルを用いた経口及び静脈内投与後の血中動態の結果を比較するとC<sub>max</sub>はそれぞれ238と220と余り差がなかった。また、AUCにも差が少なく、生物学的利用能は98.7%と投与したもののほとんどが吸収されているものと思われた。また、ラットでは著明に認められた腸肝循環がサルでは明確ではなかった。また、血漿中の半減期は静脈内投与後6時間までの計算では約3時間、8から48時間までの計算では約15時間であった。

なお、一群3匹の雌雄のサルを用いた本試験結果はまだ得られていない。

##### C-2-1. BPAの排泄

上記の雄サルを用いた試験において尿、糞中へのBPAの排泄を調べたところ、BPAは主に尿中に排泄され、経口投与24時間以内に投与した放射活性の53%が尿中より回収された。また、この間の糞からの回収率は投与量の0.29%と少ないことから、ケージ洗浄液から得られた14.12%の放射活性のほとんどは尿に由来するものと思われる。これを合わせると、24時間までの尿中排泄率は約69%と推定された。なお、投与後1週間の全回収率は79.9%であった。静

脈内投与の場合もほぼ同様であり、投与 24 時間以内に約 79%が尿中に排泄されたと推定される。また、投与後 1 週間で 87.6%が糞尿中に排泄された。

#### D. 考察

暴露レベルに近い用量を含む BPA を雌雄の F344 ラットに経口投与(20, 100, 500  $\mu$  g/kg), 或いは静脈内投与(100, 500  $\mu$  g/kg)したとき、血漿中の BPA 当量は投与量にほぼ線形に増加した。また、BPA の生物学的利用能は 100  $\mu$  g/kg 投与時で約 50%であった。一方、雄の方が雌より血中濃度が高かった。通常の薬物においては、雌よりも雄の方が薬物代謝活性が高く、血中濃度は低くなる傾向がある。今回の結果は、BPA が雄に活性の高い P-450 分子種で代謝されるのではないことを示しているのかも知れないが、今のところ、精製した分子種での結果は得られず、その理由については明確ではない。また、経口投与では腸管循環によると思われる二相性の血漿中動態が認められた。即ち、ラットにおいては経口投与された BPA は肝臓により代謝を受け、抱合体となった後、速やかに胆汁中に排泄されるが、その一部は腸内で分解され、また、消化管より再吸収を受けるものと思われた。一方、雄サルに BPA を 100  $\mu$  g/kg 静脈内投与と経口投与したときの  $C_{max}$  および AUC に差は少なく、生物学的利用能はほぼ 100%であった。これはサルでは明瞭な腸肝循環は認められなかったこと、また、投与した BPA の大部分が尿中に排泄されたことから、サルでは経口投与された BPA が肝臓で代謝を受けても、胆汁中に排泄される量が少ないものと思われた。これについては、近日中にラットにおける尿中および糞中

排泄量に関するデータが得られる予定であること、また、より多数のサルを用いた試験の結果が得られる予定であることから、その後に再度考察すべき事項である。更に、100  $\mu$  g/kg 投与後急速に低下するが、ラットでは投与後 2~3 日後の消失半減期は約 15-18 時間であり、サルでは投与 8 時間から 48 時間の間の消失半減期は約 15 時間であった。両者で大きな差は認められなかった。血中の BPA 当量の内、未変化体がどの程度あるかについては今後検討する予定である。

BPA の体内分布に関する検討はラットで行っており、これについても近日中に結果が得られる予定である。

BPA は乳汁中に排泄され、排泄濃度は投与後 8 時間で最高になり、この時の乳汁排泄濃度は血漿中濃度の約 1/4 であった。

ラットにおいては暴露レベルに近い低用量においても、血漿中濃度は投与量に応じてほぼ線形に増加する。また、ラットでは腸肝循環が著しく生物学的利用能も 50%程度と低いが、サルでは腸肝循環はそれほど有意ではなく、生物学的利用能も約 100%と高い。投与後しばらく経過した後の排泄半減期はラットとサルでほぼ同じで、15-18 時間であった。乳汁中に排泄される BPA の濃度は血漿中の約 1/4 の濃度である。今後、ラットでの体内分布、糞尿中排泄、比較的多数のサルを用いた血中動態および排泄に関する結果が得られる予定である。

#### E. 今後の展望

サルとラットの両者におけるビスフェノール A の体内動態についての研究を更に進める。