

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）研究分担報告書
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 -

分担研究者 今中雅章 岡山県環境保健センター衛生化学科長

研究要旨

内分泌かく乱作用が疑われているビスフェノール A (BPA) について、その摂取量を把握するための研究を行った。分析法としては、平成 11 年度の厚生科学研究において本研究班で開発した、HFB 誘導体化後 GC/MS(SIM 法)で測定する高感度な方法を採用した。調査対象の食事には代表的な陰膳である病院の給食(普通食)を選び、地域の異なる 2 施設において 1 週間継続して全食事を採取し、BPA 濃度を分析した。測定された BPA 濃度は 0.14 ~ 5.32 ng/g の範囲にあり、いずれも微量レベルであったが、その中で 1 食のみが他試料と比較して高い値(5.32 ng/g)を示した。その理由としては、該当する食事メニューの中で、ツナ缶詰を材料に用いたフレーク煮が提供されていたためと推定された。

上記の測定結果と食事量から求めた給食 1 食あたりの BPA 摂取量は、A 病院で 0.08 ~ 3.5 µg、B 病院で 0.60 µg 以下であった。また 3 食とも病院給食を食べた人の 1 日摂取量は A 病院で 0.40 ~ 3.7 µg、B 病院で 0.19 ~ 1.3 µg の範囲にあった。特にツナ缶詰からの寄与率が高かったことが特徴であった。BPA の平均 1 日摂取量は、1.5 µg 以下であると推定され、この値は Reference dose(50 µg/kg 体重・日)の 0.06%にあたる。

協力研究者

北九州市環境科学研究所
植田英一、宮田大典

岡山県環境保健センター
宇津木順子

国立医薬品食品衛生研究所
佐々木久美子

様になったのは比較的新しく、1993 年、Krishnan 等による「ポリカーボネート製実験器具から溶出した微量の BPA にはヒト乳ガン細胞 MCF-7 を増殖させる作用がある」との報告⁴⁾が公にされて以来である。

1997 年には Nagel, vom Saal⁵⁾等により「極微量(20 µg/kg/day)の BPA を妊娠マウスへ投与することによっても、生まれた雄マウスに前立腺重量が増加する」との報告もなされている。このいわゆる BPA 等の低用量作用(Low Dose Effects)に対しては、その再現性を巡って現在研究者間で論争が行われている⁶⁾。しかしその解決のためには、米国立環境保健科学研究所(NIEHS)の R.L.Melnick⁷⁾が指摘したように今後数多くの知見を集積する必要があり、更に長期間にわたる検討が要請されている。

A . 研究目的

BPA はエポキシ樹脂、ポリカーボネート樹脂、殺菌剤等の製造時に原料として多用されており¹⁾、我が国における生産量は約 27 万トン(平成 9 年度)に達している²⁾。BPA がエストロゲン作用を有することは、既に 1938 年の段階で Dodds 等³⁾により明らかにされている。しかし衆目を集める

一方、ヒトが現時点で食品からいかなるレベルの BPA を摂取しているかも非常に重要な問題であるが、正確な測定データが少ないのが現状である⁸⁾⁻¹³⁾。

以上のことから、BPA による各種食品の汚染実態を明らかにし、その食品経路摂取量を知ることは食品衛生上意義あることと考えられる。著者等は平成 11 年度厚生科学研究で GC/MS を用いた汎用性のある高感度分析法の開発を行うとともに、各種缶詰類、魚介類、肉類、野菜、果物等計 222 検体について BPA の実態調査を行った¹⁴⁾。

平成 12 年度においては、代表的な陰膳として病院給食を選び、2 カ所の施設で 1 週間継続して全食事を採取し(2 施設 × 3 食 × 7 日=42 検体)、BPA 摂取量を明らかにしたので報告する。

B. 研究方法

調査研究は、岡山県環境保健センター、北九州市環境科学研究所の 2 機関で実施した。分析方法は統一して行ったが(図 1 参照)、用いた試薬及びその精製方法は一部異なる。研究方法及び結果等の実施機関により相違する部分については、それぞれ機関名 A、B と区別して記載した。

1. 試料

平成 12 年 10 月～12 月に岡山市(A 病院)および北九州市(B 病院)の 2 病院で提供された給食各 1 週間分、計 42 検体を試料とした。給食は、各回ごとに密閉製のステンレス容器に移して持ち帰った後、秤量し、1 晩 4℃以下で冷却した。

翌日ステンレス製のマルチブレンダーミルで迅速かつ均一に細碎、混合後、ガラス製密閉容器に入れ、-20℃～-30℃で凍結保存した。

2. 試薬

アセトン、ジエチルエーテル(エーテ

ル)、アセトニトリル、トルエン、n-ヘキサン(ヘキサン):和光純薬または関東化学製の残留農薬試験用試薬(1000 倍または 2000 倍濃縮検定品)。

塩化ナトリウム:石津製薬製の残留農薬試験用試薬を 300mg、24 時間加熱処理(機関 A)または和光純薬製特級試薬を 700mg、6 時間加熱処理(機関 B)して使用。

リン酸:和光純薬製の特級試薬

無水硫酸ナトリウム:石津製薬製の残留農薬試験用試薬を 300mg、24 時間加熱処理(機関 A)または林純薬製特級試薬を 700mg、6 時間加熱処理(機関 B)して使用。

純水:ミリポア製環境ホルモン用水(機関 A)またはミリ Q 水をエーテル/ヘキサン混液(50/50)で 3 回洗浄して使用(機関 B)。

食塩水:純水 1.5L に塩化ナトリウム 300g を溶解、ヘキサン/エーテル混液(50/50)で 50mL × 3 回洗浄後、残存溶媒を減圧留去して使用。

ヘプタフルオロ酪酸無水物:和光純薬製ガスクロ用を使用。

カートリッジカラム:PSA カラムとしてはバリアン製 Bond-Elut PSA (3cc/500mg)(ガラス製、機関 B)または Bond-Elut PSA Jr.(500mg)(新型、機関 A)を使用。

C₁₈カラムとしてはバリアン製 Bond-Elut C₁₈(ガラス製、機関 B)またはウォーターズ製 Sep-Pak-Plus C₁₈(機関 A)を使用。

いずれもコンディショニング終了後、直ちに使用に供した。

Jr.または Plus タイプのカートリッジを使用する際には、ガラス製 10 mL シリンジを装着した。

0.5mol/L リン酸緩衝液(pH6.0):リン酸二ナトリウム 12 水和物 53.72g を純水 300mL に溶解したものと、リン酸二水素

ナトリウム 46.80g を純水 600mL に溶解したものを混合して pH6.0 に調整し、更に食塩水の場合と同様にヘキサノール/エーテル混液洗浄後、溶媒を留去して使用に供した。

標準品：BPA は和光純薬製標準品を使用した。BPA-d₁₆ は関東化学製標準品を使用した。注入量確認用の内標として使用したフタル酸ジエチル-d₄ は和光純薬製標準品を使用した。

ガラス器具は、使用する約 1 時間前にアセトンで洗浄、風乾して実験に用いた。

駒込キャップは、内部を水洗し、風乾後使用した。

試薬類のマイクロリットルオーダーでの採取に際しては、ガラス製マイクロシリンジを用い、プラスチック製チップは使用しなかった。

3. ホモジナイザー

日本精機製作所製

：マルチブレンダーミル(形式 BLAS-1002)
イカ・ジャパン製

：ウルトララックス T-25 ベーシック

4. 装置及び測定条件

定性・定量はキャピラリーカラムを装着した GC/MS (イオントラップ型および四重極型) を用い、SIM 法で行った。機関ごとの詳細な測定条件は、下に記載した。

機関 A

ガスクロマトグラフ： TRACE GC 2000
(CE INSTRUMENTS 社製)

検出器： Polaris

(ThermoQuest-Finnigan 社製)

インジェクター： AS2000

(CE INSTRUMENTS 社製)

カラム：Restek-5MS (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25 μ m) (Restek 社製)

オープン温度：105 (1 min) 15 /min
280 (10 min)

注入口温度：230

トランスファーライン温度：285

イオン源温度：230

キャリアーガス：ヘリウム

定流量モード, 1 mL/min

イオン化電圧：70 eV (EI モード)

注入量：1 μ L (スプリットレス)

測定法 SIM 法

モニターイオン：

m/z =605.2, 315.1 (BPA)

=616.3, 321.1 (BPA-d₁₆)

=153.0, 180.9 (フタル酸ジエチル-d₄)

(アンダーラインが定量イオン)

機関 B

ガスクロマトグラフ： HP5890

(Agilent 社製)

検出器：JEOL Automass120 (System)

(日本電子製)

インジェクター：HP6890 インジェクター

(Agilent 社製)

カラム：HP-5MS (内径 0.25mm, 長さ 30m
膜厚 0.25 μ m (Agilent 社製)

オープン温度：100 (2 min) 25 /min
200 5 /min 230 30 /min
300 (3 min)

注入口温度：280

インターフェース温度：250

イオン源温度：210

キャリアーガス：ヘリウム

定流量モード, 1 mL/min

注入量：1 μ L (スプリットレス)

測定法 SIM 法

モニターイオン：

m/z=605, 315, 169 (BPA)

=616, 321, 169 (BPA-d₁₆)

=153, 182, 91 (フタル酸ジエチル-d₄)

(アンダーラインが定量イオン)

4. 分析方法

試料 20g を 100mL 遠沈管に採取し、リン酸 1mL と BPA-d₁₆ 0.2 μ g を添加後、テフロンシーリング製のステンレスシャフト

ジェネレータで高速ホモジナイズ抽出を行い、遠心分離操作により含水アセトン層を採取した。以降の操作は、図 1 に示すフローシートに従った。

C . 研究結果および考察

1 . BPA-HFB 誘導体および BPA-d₁₆-HFB 誘導体の SIM クロマトグラム

平成 11 年度厚生科学研究でコンビニ弁当 6 検体中の BPA を調査した際、3 検体から BPA が検出されたがいずれも微量(トレース)レベルであった。

本年度は、更に検出限界を下げるべく GC/MS 条件、カートリッジカラム等(材質等)に検討を加えた。図 2 には、BPA-HFB、BPA-d₁₆-HFB 及び(シリンジスパイクとして加えた) Diethyl phthalate-d₄ のトータルイオンクロマトグラムと相当する EI マススペクトルを示した。これをもとに、定量イオンとして BPA-HFB(605)、BPA-d₁₆-HFB(616)、Diethylphthalate-d₄(153) を選択した。四重極型と二重収束型の装置を使用したときに、BPA-HFB と BPA-d₁₆-HFB から強度の強いイオンとして出現した m/z=169 のフラグメントは、イオントラップ型装置の場合は観察されなかった。

図 3 は、微量注入時の BPA-HFB と BPA-d₁₆-HFB の SIM クロマトグラムである。注入量は両者とも 1 pg にすぎないが、S/N 比は 30-40 であり、高感度分析が可能であった。

2 . 操作ブランク値と検出限界

図 4 は、操作ブランクを代表する SIM クロマトグラム(S/N 比=13)を例示したものであるが、試料を 20g 採取したとすると、BPA 値は約 0.03 ng/g に相当した(機関 A)。

表 1 に機関 A、表 2 に機関 B の操作ブランク値とその平均値および標準偏差値を

示した。その結果を基に、標準偏差の 3 倍を検出限界(LOD)、10 倍を定量限界(LOQ)とした。なお機関 A では、設定に少し余裕を持たせて設定した。機関 A : LOD=0.05 ng/g, LOQ=0.14 ng/g, 機関 B : LOD=0.20 ng/g, LOQ=0.70 ng/g

3 . 添加回収実験結果(BPA と BPA-d₁₆ との比較)

実際の給食(均一に混合した物)を用いて、BPA の添加回収実験を行った(BPA 添加濃度:10 ng/g)。また実態調査の際に BPA の回収率チェックの目的で添加した BPA-d₁₆ の妥当性を調べるために、後者についても同時に回収率を調べた。

両化合物の添加回収実験結果を、表 3(機関 A)と表 4(機関 B)にまとめた。BPA および BPA-d₁₆ 共に、80%以上の良好な値であった(機関 A,B)。また BPA と BPA-d₁₆ の回収率がほぼ一致した値であることも明らかになった。したがって、実際の給食中の BPA 実態調査の際、BPA-d₁₆ を用いて BPA の回収率をチェックすることは合理性があると判断した。

なお、操作ブランク実験における BPA-d₁₆ の回収率を表 1(機関 A)、表 2(機関 B)の右欄に示した。いずれも 70%以上の良好な値であったが、試料への添加回収実験と比較すると 10~20%低い傾向であった。BPA は試薬として使用するエーテル中の過酸化物質等と容易に反応するために、食品抽出物のマトリックスがない操作ブランク実験では、平均回収率が低い値になったものと推定した。

4 . 試料分析時に得られた BPA および BPA-d₁₆ の SIM クロマトグラムの例

病院給食を分析したときに得られる SIM クロマトグラムの代表例として、10 月 18 日朝食(A 病院)の分析例を図 5 に示した。

BPA ピークの高い S/N 比(1949)に明らか
なように、この給食からは、5ng/g を超え
る BPA 値が検出された。

5. 実態調査結果及び考察

5-1. 病院給食の実態調査結果

著者等は平成 11 年度厚生科学研究にお
いて、加工食品から生鮮食品にわたる各種
食品、計 222 検体について BPA 含有量を
調査し、以下の点を明らかにした¹⁴⁾。

缶詰については、その内容を問わず調査
したすべての検体から痕跡量 ~ 602 ng/g の
BPA が検出された。しかしその検出レベル
は缶詰の種類や個々の製品により、大きな
差が見られた。ツナ、コンビーフ、鶏肉等
の缶詰では、100 ng/g をはるかに超える値
も測定されたが、果物や豆類では低いレ
ベルであった。調査数は少なかったが、レ
トルパック食品からも 11-86 ng/g の BPA
が検出された。生鮮魚介類及び肉類では 25
検体中 8 検体から痕跡量 ~ 31 ng/g の BPA
が検出された。野菜、果実、精白米からは
検出されなかった。この調査から、一般
的には生鮮食品の BPA 汚染濃度は低いと
推定した。

しかしながら、我々が摂取する食品の
種類は極めて多く、その生産地も多様で
あることから、限られた種類の食品の BPA
実態調査のみをベースとしてその 1 日摂取
量等を推定することは、正確性を欠くお
それがある。

平成 12 年度においては、代表的な陰膳
と考えられる病院給食を選び、BPA の摂
取量調査を実施した。すなわち異なる地
域（岡山市と北九州市）の 2 病院から 1 週
間継続して給食（普通食）の提供を受け、
総計 42 食中の BPA 含有量を分析した。さ
らにその結果を基に、1 日摂取量を求めた。

表 5 には、機関 A で調査した A 病院給
食中の BPA 濃度の変化を時系列でまとめ

た。分析開始時に添加した BPA-d₁₆ の回収
率はいずれの給食においても 80% ~ 120%
の範囲にあったことから、全ての BPA 測
定値は有効であると考えられる。表 5 の結
果をグラフ化した図 6 を見ると、(BPA 汚
染レベルとしては低い値であるが) 10/18
の朝食が 5ppb を超えて飛び抜けて高く、
特定の汚染源の存在を推定させた。また
10/20 と 10/21 のいずれも朝食が、1.0 ng/g
以上の濃度であった。

別添の A 病院給食メニュー表を見ると、
副食でフレーク煮(1 食につきツナ缶詰 10
g 使用)が提供されていることから、ツナ
が BPA の主要な汚染要因であろうと推論
した。因みに 10/18 の朝食中 BPA から、
フレーク煮に使用された缶詰中の濃度を逆
算すると、346 ng/g となった。

10/18 の夕食では、茶碗蒸しに缶詰の銀
杏 5g が使用されていたが、BPA レベルは
極めて低かった(0.25 ng/g)。一方 10/20 朝食
ではミックスベジタブル(冷凍ではない)
が使用されており、その寄与が考えられ
るが、詳細は不明である。

なお A 病院では、塩ビ製手袋は食器洗い
時のみ使用されており、またラップは塩化
ビニリデン製であった。

表 6 には、機関 B で調査した B 病院給
食中の BPA 濃度の調査結果を示した。
BPA-d₁₆ 回収率はいずれも 70%-120%の範
囲にあった。21 試料中 13 検体でトレ
ースレベルの BPA が検出されたが、1 ng/g
を超えたのは 11/28 の朝食と昼食のみで
あり、これは A 病院(3 試料/21 試料)とほ
ぼ同じ割合であった。

図 7 では、表 6 をもとに、トレースと nd
(検出限界の 1/2=0.1 ng/g)の値も加えて、
参考までに測定結果を棒グラフで示した。
11 /28 の朝食と昼食の BPA 値が定量限
界以上(0.70 ng/g 以上)であったが、その
要因は B 病院のメニュー - 表を詳細に検
討して

も不明であった。

5-2. 1日摂取量推定

表7には、A病院給食1食あたりのBPA摂取量を示した。図8には、A病院給食1日あたりのBPA摂取量(3食の合計)をグラフ化して表示した。BPA摂取量は10/23の0.40 μg から10/18の3.7 μg まで約10倍の差があり、平均1日摂取量は1.16 μg であった。なお、ツナフレーク煮を摂食していた10/18を除く残りの6日間の平均1日摂取量は、0.74 μg となり、約60%に減少した。

一方B病院給食では、機関Bの定量限界(0.70 ng/g)を超えた給食は2食のみであり、厳密な意味での1日摂取量の推計は不可能であった。そこで図7の場合に使用した条件、すなわちndとtrも数値化して利用可能であるとの仮定のもとで、摂取量を推計した(表8、図9)。図9に基づいて計算されたBPA一日摂取量は0.19から1.34 μg 範囲にあり、平均1日摂取量は0.66 μg であった。

以上の病院給食実態調査結果から、BPAの平均1日摂取量は、1.5 μg 以下であると推定された。この値は米国EPAのReference dose(50kg体重のヒト)の0.06%にあたる。

D. 結論

1. 代表的な陰膳として病院給食を選び、ビスフェノールA(BPA)の摂取量調査を行った。

2. 異なる地域(岡山市と北九州市)の2カ所の病院から、一週週間連続して給食(総計42食)を採取し、それぞれの給食中のBPA濃度、給食1食中のBPA量、BPAの1日摂取量を求めた。

3. 個別の給食中のBPA濃度は、0.14 ~ 5.32 ng/gの範囲内にあり、いずれも微量レベルであったが、その中で1給食から5

ng/gを超える、他と比較して飛び抜けて高い値が得られた。5.32 ng/gのBPA濃度を示した給食では、副食の1つとしてツナ缶詰を用いたフレーク煮が提供されていた。5.32 ng/gの値から逆算すると、給食で使用されたツナ缶詰中のBPA濃度は、346 ng/gと推定された。その他の給食では、42食中4試料が1 ng/g以上の値であった。

4. 今回の測定結果と食事量から求めた給食1食あたりのBPA摂取量は、A病院で0.08 ~ 3.5 μg 、B病院で0.05 ~ 0.60 μg の範囲にあった。3食とも病院給食を食べた人の1日摂取量はA病院で0.40 ~ 3.7 μg 、B病院で0.19 ~ 1.34 μg の範囲にあった。

BPAの平均1日摂取量は、1.5 μg 以下であると推定された。

E. 謝辞

本研究において、給食試料の採取に御協力いただいた各病院の関係者各位に深謝いたします。

F. 参考文献

- 1) Keith, L.H., "ENVIRONMENTAL ENDOCRINE DISRUPTORS", New York, Wiley Inter-science, 1997, p.261-270. (ISBN 0-471-19126-4)
- 2) 堀江正一, ポリカーボネート製容器等からのビスフェノールAの溶出について, 平成11年度食品化学講習会, 厚生省食品化学課, 1999, p.11-21
- 3) Dodds, E.C., Lawson, W.: Proc. Roy. Soc. B 125, 222-232 (1938).
- 4) Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokens, L., Feldman, D.: Endocrinology, 132, 2279-2286 (1993).
- 5) Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Boechler, M., Welshons, W.V.: Environ. Health Perspect, 105, 70-76 (1997).

6) 第3回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム プログラム・アブストラクト集(環境庁主催): セッション5 低用量問題, 121-137, 2000

7) R.L.Melnick, Summary of the NTP/NIEHS Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Review, 第3回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム プログラム・アブストラクト集(環境庁主催), 124-125 (2000)

8) Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Vi-lalobos, M., Pedraza, V., Olea,N.: Envi-ron. Health Perspect. 103, 608-612, 1995.

9) Biles, J.E., McNeal, T.P., Begley, T.H.,: J. Agric. Food Chem. 45, 4697-4700 (1997).

10) 河村葉子,佐野比呂美,山田隆: 食衛誌, 40, 158-165 (1999).

11) 瀧野昭彦,津田泰三,小嶋美穂子,原田浩之,村木一枝,和田稔: 食衛誌, 40, 325-333 (1999).

12) 堀江正一他: 分析化学, 48, 579-587 (1999)

13) 河村葉子,井之上浩一,中澤裕之,山田隆,米谷民雄: 食衛誌, 42, 13-17 (2000)

14) 平成11年度 厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業): フタル酸エステル及びフェノール類の食品汚染実態及び摂取量に関する研究 報告書,主任研究者外海泰秀, 2000

15) 今中雅章, 佐々木久美子, 根本了, 植田英一, 村上恵美子, 宮田大典, 外海泰秀: GC/MSによる各種食品中のビスフェノールAの分析, 食衛誌, 印刷中 (2001).

1) 根本了, 佐々木久美子, 高附巧, 豊田正武, 今中雅章, 村上恵美子, 植田英一: 食品中のビスフェノール A 分析法の検討 日本食品衛生学会第80回学術講演会, 2000

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 今中雅章, 佐々木久美子, 根本了, 植田英一, 村上恵美子, 宮田大典, 外海泰秀: GC/MSによる各種食品中のビスフェノールAの分析 食衛誌, 印刷中 (2001).

2. 学会発表