

血液中のビスフェノール A (BPA) の分析 (2)

研究分担者 松村 徹 いであ株式会社環境創造研究所副所長

研究要旨

昨年度までに検討し、開発した血液中のビスフェノール A (BPA) の測定分析方法を用い、ヒト血液 101 検体 (母体血 44 検体及び臍帯血 57 検体) に適用し結果を得た。全操作ブランク、MDL、二重測定及び回収率の品質管理項目の結果も安定しており血液試料 1mL を用いる測定分析手法としては完成したものとする。

研究協力者

山本 潤

(いであ株式会社環境創造研究所)

A . 研究目的

ビスフェノール A (以降 BPA) はポリカーボネート製のプラスチックを製造する際、モノマーや、エポキシ樹脂の原料として使用されている化学物質であり、摂取によりエストロゲン受容体が活性化され、エストロゲンに類似した生理作用を表すことが報告されている。低用量仮説の提唱によって注目を受けたが、ヒトに対する健康影響評価に関しては現在も諸説の報告例があり継続して研究が行われているところである。また、近年、BPA については尿道下裂との関連性について幾つか報告がなされているが、血中濃度は極低濃度であり、試料間の有意な濃度差を観測するためには精確な測定値が必要と考えられる。

BPA の体内負荷量を評価するにはヒト血液中における濃度データが必要であるが、存在量は極低く測定分析が困難であり、現在のところ、確からしい結果を用いて議論されているとは言えない状況と考えられる。本研究ではヒト血液中の BPA を議論可能な濃度レベルで精確に測定する手法を開発することを目的とした。

昨年度、固相抽出カラムを用いた前処理とそれに続く同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計

(ID-LC/MS/MS) 法を検討した。血液中 BPA の分析においてはブランク値の低減が最も重要であったため、試薬ブランク、個々の前処理段階におけるブランク、カートリッジからの溶出ブランク及び全操作ブランク、並びに前処理用カートリッジカラムのコンディショニング方法の検討を行い、最終的にブランク値を 0.1ng/mL 未満のレベルに安定して抑えることに成功した。本年度は確立した方法を実際のヒト血液試料 101 検体に適用し、結果を得た。

B . 研究方法

開発した同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析計 (以降 ID-LC-MS/MS) をヒト血液試料 101 検体 (母体血 44 検体及び臍帯血 57 検体) に適用した。内標準物質として、BPA-d₁₆ をクリーンアップスパイク、BPA-2,2',6,6'-d₄ (BPA-d₄) をシリンジスパイクとして用いた。また、固相充填済み樹脂製カートリッジカラムとして ISOLUTE マルチモード (500mg/3mL, Biotage 社製; 904-0050-B) を用いた。

最終的に決定した分析フローを図 1 に LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示す。

C . 研究結果・考察

(1) 操作ブランク及び分析法の検出下限値 (MDL : Method Detection Limit)

試料 101 検体は、4 ロットにわけて分析を行い、各ロットについて操作ブランク試験をそれぞれ 5 回実施した。操作ブランク試験の結果を及びそれによって計算された MDL を表 2 に示す。操作ブランクの平均値は 1 回目 0.040ng/mL、2 回目 0.030ng/mL、3 回目 0.049ng/mL 及び 4 回目 0.036ng/mL と 0.1 ng/mL 未満であった。また 4 回の操作ブランク試験の結果より計算された MDL は 1 回目 0.032ng/mL、2 回目 0.015ng/mL、3 回目 0.048ng/mL 及び 4 回目 0.045ng/mL であった。昨年度と同様に、操作ブランク及び MDL は、0.1ng/mL 未満であった。

(2) 二重測定

測定分析における品質管理の一環として 8 試料(全検体数の 7.9%)について二重測定を実施した。結果を表 3 に示す。二重測定における差は 5.3~20%であった。

(3) ヒト血液の分析

ヒト血液試料 101 検体(母体血 44 検体及び臍帯血 57 検体)について BPA の測定分析を行った。結果を表 4 に示す。血液中の BPA 濃度は、ND~0.18ng/mL(平均値 0.075ng/mL、中央値 0.069ng/mL)であった。なお、表 4 における BPA 濃度は、操作ブランク値を差し引いた値で、ND は、4 回の分析ロットごとに求めた検出下限値(MDL)未満であることを示す。

(4) 回収率

検体の測定における各試料の回収率(クリーンアップスパイク内標準物質(BPA d-16)/シリンジスパイク内標準物質(BPA d-4))の値を用い、回収率を計算した。結果を表 4 に示す。全試料において回収率は 60~96%の範囲であった。なお、本分析方法は内標準法であるので回収率の数値は結果に影響を与えない。

(5) 装置の応答変動の確認

装置の応答変動の確認のため、チェック用標準液(PA 濃度 1.0ng/mL)を実試料 7~10 検体ごとに測定し、その相対感度係数(RRF)を検量線作成時の RRF と比較した。4 回の分析ロットにおける測定時の装置の応答変動を表 5 に示す。各測定におけるチェック標準液の RRF は、4 回の分析ロットで 89~101%の範囲であった。また、測定ごとの RRF(平均)は、0.98、0.99、0.98 及び 0.98 であり、測定間の差がないことが確認された。

D. 結論

本研究で開発した分析方法によって血液中の BPA を評価可能な濃度レベルでデータ取得可能となった。昨年度から実試料計 171 検体へ適用したが、全操作ブランク、MDL、二重測定及び回収率の品質管理項目の結果も安定しており、試料 1mL を用いる手法の開発としては現在の科学技術レベルの範囲においては完成したものと考ええる。ただし、試薬及び実験器具の品質管理には細心の注意が必要である。MDL の更なる低減に関しては装置本体の検出感度に依存するので今後の装置の進歩に期待したい。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

参考文献

1. Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent Bisphenol A Accumulation in the Human Maternal-Fetal-Placental Unit. *Environ. Health Perspectives* 2002;110:703-707.
2. Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H. Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. *J. Pharmaceutical and Biomedical Anal.* 2003;30:1743-1749.
3. Chen M, Chang C, Shen Y, Hung J, Guo B, Chuang H, Mao I. Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol. *Chemosphere* 2008;73:239-245.

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

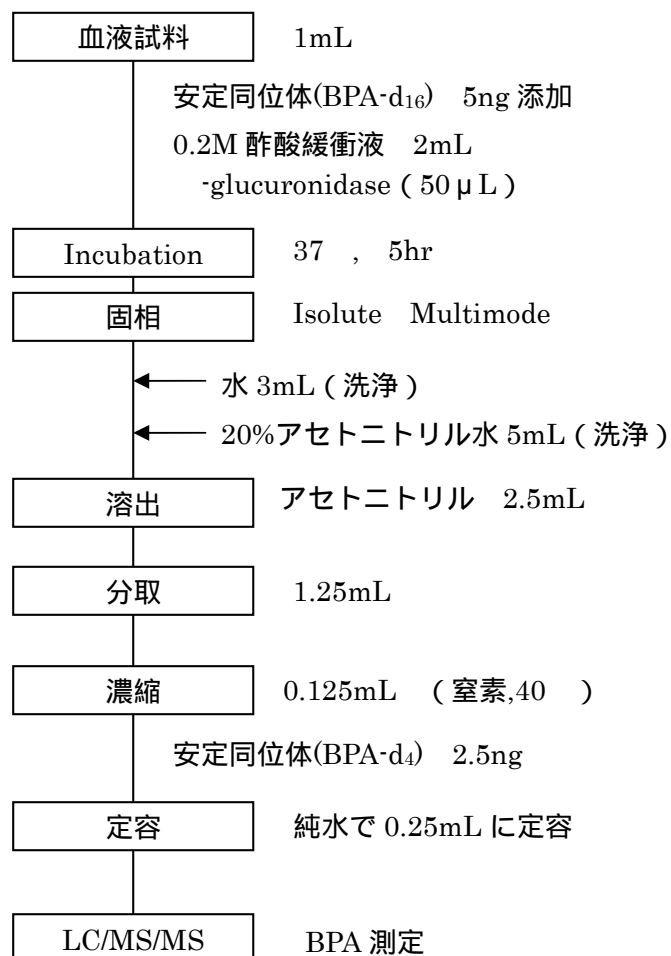


図 1. 血液中の BPA の分析フロー

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
 分担研究報告書

表 1 . BPA 分析における LC/MS/MS 測定条件

測定装置	LC : Agilent-1100 MS : API-4000 Q Trap
分析カラム	Waters ACQUITY UPLC BEH C18 2.1×50mm,1.7μm
溶離液	A : 水 B : アセトニトリル
グラジエント(B)	20%(0min)→20%(1min)→60%(7min)→99%(7.1min)→99%(13min) →20%(13.1min)→20%(19min)
注入量	20μL
カラム温度	40
モード	ESI-Negative
m/z	227.0 > 132.9(BPA) 241.0 > 142.0(BPA-d ₁₆) 231.0 > 134.9(BPA-d ₄)

表 2 分析ロット毎の全操作ブランク試験の結果及び MDL .

試料名	BPA濃度 (ng/mL)			
	分析ロット No.1	分析ロット No.2	分析ロット No.3	分析ロット No.4
Blank 1	0.036	0.030	0.066	0.049
Blank 2	0.037	0.031	0.056	0.043
Blank 3	0.053	0.025	0.042	0.032
Blank 4	0.037	0.031	0.040	0.021
Blank 5	0.037	0.034	0.042	0.034
平均値	0.040	0.030	0.049	0.036
標準偏差	0.00745	0.00329	0.0111	0.0105
t値(危険率5%, 片側)	2.132	2.132	2.132	2.132
MDL	0.032	0.015	0.048	0.045

【注釈】

$$\text{MDL} = (\text{標準偏差}) \times t \text{ 値} \times 2$$

分析ロット No.4 については、血球試料と血漿試料を全量混合して分析試料とした。

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

表 3 8 検体についての二重測定の結果 .

北大ID	BPA濃度 (ng/mL)		差 (%)
	1回目	2回目	
232 (臍帯血)	0.057	0.069	20
224 (母体血)	0.024	0.027	11
369 (臍帯血)	0.066	0.054	20
511 (臍帯血)	0.094	0.077	19
230 (臍帯血)	0.042	0.044	5.5
302 (臍帯血)	0.057	0.051	11
76 (臍帯血)	0.082	0.086	5.3
129 (臍帯血)	0.027	0.023	17

【注釈】

差(%) = (2 回の測定分析における BPA 濃度の差) / (2 回の測定分析における BPA 濃度の平均) x 100
表 4 における BPA 濃度は、1 回目の結果を表記 .

表 5 母体血及び臍帯血中の BPA 濃度に関する統計量 .

統計量	BPA濃度 (ng/mL)		
	母体血 (n=44)	臍帯血 (n=57)	全体 (n=101)
最大	0.12	0.18	0.18
最小	0.016	0.021	0.016
平均値	0.052	0.065	0.059
標準偏差	0.029	0.036	0.034
中央値	0.053	0.064	0.059

【注釈】

濃度 ND については、対応する分析ロットにおける MDL の半値を用いて統計量を算出 .

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
 分担研究報告書

表 4 母体血及び臍帯血中の BPA 濃度及び各検体における回収率 .

北大 ID	分析 ロット No.	母体血		分析 ロット No.	臍帯血	
		BPA濃度 (ng/mL)	回収率 (%)		BPA濃度 (ng/mL)	回収率 (%)
224	1	ND	91	1	0.071	69
232	1	0.092	82	1	0.057	66
221	1	ND	87	1	0.089	68
280	1	0.054	82	1	0.079	77
293	1	0.037	68	1	0.070	70
368	1	0.051	81	1	0.058	80
355	1	0.047	82	1	0.045	72
376	1	0.072	74	1	0.13	70
370	1	0.085	60	2	0.061	73
364	1	0.045	80	2	0.028	85
365	1	0.059	84	2	0.021	79
369	1	0.12	74	2	0.066	77
483	1	0.034	75	2	0.12	67
485	1	0.069	68	2	0.064	65
506	1	0.067	72	2	0.052	75
511	1	0.076	82	2	0.094	85
497	1	0.082	76	2	0.13	80
76	4	ND	73	4	0.082	80
49	4	0.057	80	4	ND	82
53	4	0.068	91	4	ND	83
56	4	0.061	75	4	ND	83
91	4	ND	80	4	ND	78
129	4	ND	74	4	ND	74
117	4	ND	87	4	ND	68
123	4	ND	91	4	0.058	66
139	4	ND	83	4	0.063	73
179	4	0.047	89	4	0.056	75
178	4	ND	82	4	0.068	69
160	4	ND	82	4	0.064	66
147	4	ND	79	4	ND	96
167	4	0.10	87	4	ND	73
438	3	ND	91	2	0.076	76
437	3	0.062	85	2	0.18	75
463	3	ND	89	2	0.078	73
469	3	0.11	90	2	0.056	83
458	3	ND	83	2	0.075	77
465	3	0.059	92	2	0.041	83
467	3	0.059	84	2	0.11	86
479	3	0.079	85	2	0.075	74
501	3	0.10	80	2	0.076	90
481	3	0.058	80	2	0.16	80
489	3	ND	82	2	0.084	89
504	3	ND	80	2	0.11	78
505	3	0.066	67	2	0.12	74
210				2	0.091	86
240				2	0.088	81
234				2	0.077	68
235				3	ND	85
225				3	0.077	77
249				3	ND	78
230				3	ND	76
284				3	ND	81
269				3	ND	74
277				3	0.070	78
283				3	ND	73
278				3	0.069	69
302				3	0.057	89

【注釈】

BPA 濃度は、対応するロットのブランク試験値を差し引いた値。
 ブランク試験結果から求めた MDL(分析ロット 1:0.032ng/mL、分析ロット 2:0.015ng/mL、分析ロット 3:
 0.048ng/mL、分析ロット 4:0.045ng/mL)未満の試料については、『ND』で表記。
 回収率は、クリーンアップスパイク内標準物質(BPA d-16)の応答/シリンジスパイク内標準物質(BPA d-4)の
 応答を用い、(試料液)/(標準液の平均) × 100 で算出した値。

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

表 6 分析ロットにおける装置の応答変動の確認 .

分析ロット No.1	RRF	相対比(%)
検量線作成時	0.98	98
Check(1 回目)	1.01	101
Check(2 回目)	0.99	98
Check(3 回目)	0.96	95
Check(4 回目)	0.95	95
Check(5 回目)	0.99	98
平均値	0.98	98
最大値	1.01	101
最小値	0.95	95

分析ロット No.2	RRF	相対比(%)
検量線作成時	1.01	100
Check(1 回目)	1.01	100
Check(2 回目)	0.95	94
Check(3 回目)	1.02	101
Check(4 回目)	0.97	96
平均値	0.99	98
最大値	1.02	101
最小値	0.95	94

分析ロット No.3	RRF	相対比(%)
検量線作成時	0.97	92
Check(1 回目)	0.94	89
Check(2 回目)	0.98	93
Check(3 回目)	0.98	93
Check(4 回目)	1.01	96
Check(5 回目)	1.00	95
平均値	0.98	93
最大値	1.01	96
最小値	0.94	89

分析ロット No.4	RRF	相対比(%)
検量線作成時	0.93	92
Check(1 回目)	0.96	96
Check(2 回目)	1.00	100
Check(3 回目)	0.99	99
Check(4 回目)	1.00	100
平均値	0.98	97
最大値	1.00	100
最小値	0.93	92

【注釈】

相対比(%) = RRF(Check で測定した標準液の値)/RRF(検量線の平均値) .