

血液中のビスフェノール A (BPA) フリー体の分析

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) の測定分析方法をもとに BPA のフリー体の分析方法を開発した。この方法を用い保存中の血液試料について BPA フリー体の濃度を確認し、コンタミネーション(汚染)の状況を確認した。分析した試料からは、BPA は検出されなかったため、試料採取から保存までの操作における試料のコンタミネーションはなかったと考えられた。

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、また、様々な化成品に含まれていることから BPA の分析においてはブランク値や試料採取から保存中におけるコンタミネーション(汚染)の低減、把握する事が必要となる。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できていることを確認するため、コンタミネーションの状況

を把握する事を目的とした。

血液中に存在する BPA のほとんどがグルクロン酸と結合し、抱合体の形で存在することに着目し、BPA フリー体の測定方法について開発し、試料採取から保存におけるコンタミネーション状況の確認を行う事とした。

B . 研究方法

これまでに血液中の BPA の測定を行うため同位体希釈-液体クロマトグラフ/タンデム型質量分析法(以降 ID-LC-MS/MS)を開発し、ヒト血液試料(母体血及び臍帯血)に適用した。この方法は、酵素を用いて BPA グルクロン酸抱合体の脱抱合化を行い、血液中の総 BPA を評価する方法であるが、今回は、脱抱合処理を行わず、BPA フリー体を測定する事で、血液試料のコンタミネーションの状況を確認した。

今回の測定に用いた分析フローを図 1 に、LC-MS/MS の測定条件を表 1 に示す。

C . 研究結果・考察

(1) 分析法の確認

純水、又は血液試料を用い BPA フリー体の分析法の確認を行った。純水と血液試料それぞれに 0.5ng/mL となるように BPA を添加し、回収率の確認を行った。純水に添加した場合は、回収率 97%、血液試料に添加した場合は、回収率 101%で

あった。

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

血液試料 20 検体 (母体血 10 検体及び臍帯血 10 検体) の分析と操作ブランク試験を 5 回実施した。操作ブランク試験の結果及びそれらの結果より計算された MDL を表 2 に示す。操作ブランクの平均値は 0.036ng/mL であり、操作ブランク試験の結果より計算された MDL は 0.037ng/mL であった。これまでの総 BPA の分析法と同様に、操作ブランク及び MDL は、0.1ng/mL 未満であった。

(3) 血液中の BPA フリー体の分析

試料は、以前、BPA の分析を行い、濃度の確認の取れているものを用いた。ヒト血液試料 20 検体 (母体血 10 検体及び臍帯血 10 検体) について BPA フリー体の測定分析を行った。結果を表 3 に示す。血液中の BPA フリー体の濃度は、すべての試料で ND であった。なお、表 3 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、操作ブランクの 5 回測定より求めた検出下限値 (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 3 に示す。全試料において回収率は 66 ~ 112% 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。

D . 結論

本研究で開発した分析方法によって血液中の BPA フリー体が評価可能な濃度レベルでデータ取得可能となった。過去の測定で BPA が検出された試料について

BPA フリー体の測定を行い採血から保存中における BPA のコンタミネーションの状況の確認を行ったが、BPA のフリー体は検出されなかった。このため、本研究における BPA のコンタミネーションの影響は軽微であり、これまで報告を行った試料の分析値に与える影響は、ほとんどないものと考えられた。

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

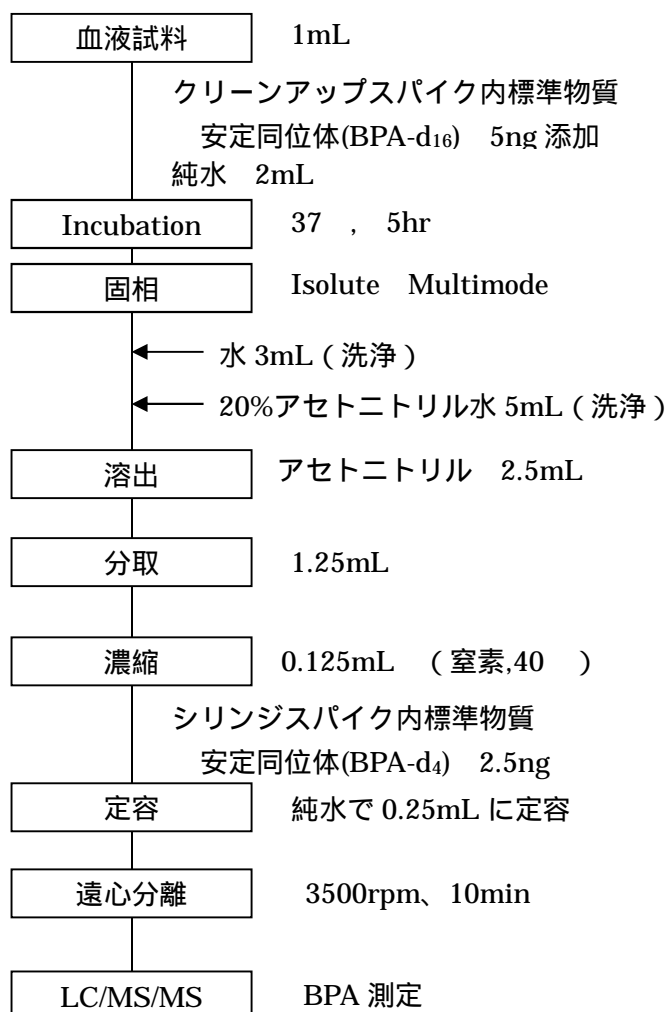


図 1. 血液中の BPA フリー体の分析フロー

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 操作ブランク試験の結果及び MDL .

試料名	BPA 濃度(ng/mL)
Blank 1	0.042
Blank 2	0.040
Blank 3	0.033
Blank 4	0.022
Blank 5	0.042
平均値	0.036
標準偏差	0.00865
t 値(危険率 5%、片側)	2.132
MDL	0.037

【注釈】

MDL= (標準偏差) × t 値 × 2

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 母体血及び臍帯血中の BPA フリー体の濃度及び各検体における回収率 .

試料名		BPA 濃度 (ng/mL)	回収率 (%)
	SRL		
臍帯血	124	ND	72
	234	ND	106
	241	ND	78
	198	ND	88
	289	ND	88
	252	ND	84
	283	ND	90
	196	ND	95
	227	ND	112
	265	ND	102
母体血	390	ND	85
	395	ND	106
	397	ND	76
	519	ND	66
	520	ND	86
	526	ND	81
	528	ND	87
	85	ND	70
	110	ND	92
	222	ND	86

【注釈】

BPA 濃度は、ブランク値を差し引いた値 .

ブランク試験結果から求めた MDL(0.037ng/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 .