

## Bisphenol A (BPA) Assay Kit - IBL

96 Well

## 1. はじめに

ビスフェノールA (Bisphenol A : BPA)は、エポキシ樹脂やポリカーボネート樹脂の主原料で、近年、いわゆる環境ホルモンとしてその内分泌攪乱作用が疑われている化学物質です。BPAを原料とするポリカーボネート樹脂は食器や哺乳瓶など直接口にする製品に広く使用されており、缶飲料や缶詰の内面塗料にも使用されています。BPAは現在日本国内で年間約48万トン以上が流通し、環境省の水質調査では河川等に0.11 µg/Lの濃度との報告もあり、水環境や生態系への影響が懸念されています。BPAの生体への影響は、1999年にF.S.Vom Saalらにより妊娠マウスに一日許容摂取量の1/25である体重1 kg当り2 µgを与えると、生まれた雄の前立腺が肥大することが報告されています。

本製品は、抗ウサギIgG抗体を固相抗体としたELISAにより、生体成分(血清または血漿)中のBPAを検出する研究用試薬です。

## 2. 原理および測定方法

本製品は、競合法に基づく Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)により、生体成分(血清または血漿)中の BPA を測定するものです。抗ウサギ IgG 抗体固相化プレートに標準物質または検体を分注後、酵素標識 BPA および抗 BPA 抗血清を加えて検体中の BPA と酵素標識 BPA を競合反応させウェルに結合させます。ウェルを洗浄後、基質液を加えて酵素反応を行います。発色はマイクロプレート用分光光度計を用いて測定し、標準物質の吸光度から標準曲線を作成して、検体の濃度を算出します。

## 3. 測定範囲

0.3 ~ 100 ng/mL

## 4. 使用目的

ヒト血清または血漿中の BPA を測定できます。

\* 検体採取器具および保存容器からの汚染 (材質の溶出も含む) にご留意ください。

## 5. 構成試薬

1 抗体プレート (抗ウサギ IgG 抗体 固相)	96Well x 1
2 酵素標識 BPA (HRP 標識 BPA)	6mL x 1
3 標準物質 (BPA 0 ng/mL, 0.3 ng/mL, 1 ng/mL, 3 ng/mL, 10 ng/mL, 30 ng/mL, 100 ng/mL)	各 0.3mL x 1
4 抗 BPA 抗血清	6mL x 1
5 欠番	
6 TMB 基質液	15mL x 1
7 停止液 (1N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	12mL x 1
8 濃縮洗浄液 (40 倍濃度、0.05 % Tween20 を含むリン酸緩衝液)	50mL x 1

## 6. 用法および用量 (操作方法)

## (1) 必要な器具・器材

プレートリーダー (測定波長 : 450nm)	マイクロピペットおよびチップ
プレートミキサー	メスシリンダーおよびビーカー
精製水	グラフ用紙 (片対数)
ペーパータオル	洗浄ピン
採取用容器 (清潔な試験管など)	

## (2) 準備

## 濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液は 40 倍濃度です。使用前に常温に戻し十分に転倒混和します。濃縮洗浄液 50mL に対して精製水を 1,950mL 加え混和します。これを洗浄液とします。冷蔵保存し 2 週間以内に使用してください。

\* その他の試薬はそのまま使用してください。

## (3) 測定操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事を確かめてください。

検体の測定と同時に標準物質を測定し標準曲線を設定してください。

測定は通常二重測定でおこないます。

(以降図(1)、表(1)参照)

- 検体数に応じて必要な数の抗体プレートのスリットを用意します。標準にはブランクを含め 16 ウェル、検体測定には通常 1 検体あたり 2 ウェルを用意します。
- ウェルの A-1 および A-2 に 0 ng/mL、ウェルの B-1 および B-2 に 0.3 ng/mL の標準物質を 20 µL ずつ入れ、以下同様に順次ウェルの C-1, C-2, D-1, D-2, E-1, E-2, F-1, F-2, G-1, G-2 まで各標準物質を 20 µL ずつ加えます。(H-1, H-2 はブランク用に空けておきます。)
- 3 列目以降の A~H 行の検体測定用ウェルに、検体を 20 µL ずつ加えます。
- 標準物質あるいは検体を入れたウェルに酵素標識 BPA を 50 µL ずつ加えます。次に抗 BPA 抗血清を 50 µL ずつ加えます。
- プレートカバーをして 5 分間攪拌後、常温(20~30 °C)で 55 分間反応させます。
- 洗浄 7 回  
洗浄操作に十分注意して測定してください。推奨する洗浄方法は、抗体プレートの各ウェルを洗浄ピンに入れた洗浄液を用いて勢い良く洗い流し、その後洗浄液をウェルに満たして 15~30 秒間静置し、プレートを逆さまにして振り払い洗浄液を完全に除去します。この洗浄操作を規定回数以上おこない、ペーパー

タオル等の上でたたいて全ウェルの水分を完全に除去してください。

プレートウォッシャーによる洗浄は、機種により洗浄が不十分な場合がありますので、4 回洗浄後さらに上記洗浄方法による洗浄を 3 回おこなってください。

- あらかじめ必要量の TMB 基質液を採取用容器にとり、そこからすべてのウェルに 100 µL ずつ添加します。TMB 基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この時の反応は遮光して下さい。また、採取用容器に残った TMB 基質液は、コンタミの原因になりますので元に戻さないでください。
- 遮光して常温 30 分間反応させます。
- すべてのウェルに停止液を 100 µL ずつ添加します。プレートの側面を軽くたたいて混和します。反応液は青色から黄色に変化します。
- プレート底面のよごれや水滴を拭き取り液面に気泡がないことを確認した後、30 分以内にブランク(H-1 または H-2)を対照として、検体および標準物質の波長 450nm における吸光度を測定してください。

図 (1) ウェルの使用例

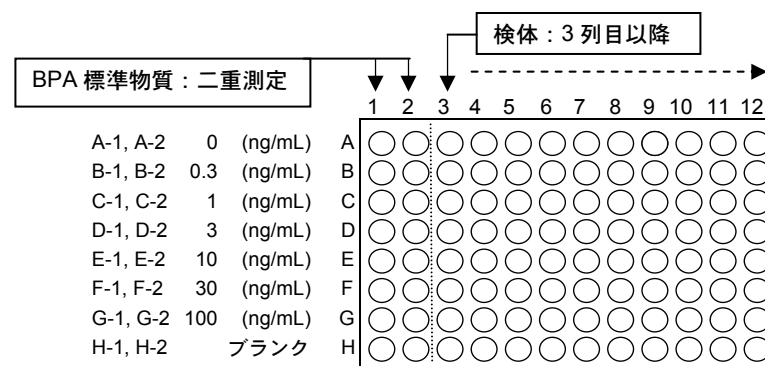


表 (1) 測定操作一覧

試料	標準物質	検体	ブランク
	標準物質 20 µL	検体 20 µL	-
酵素標識 BPA	50 µL	50 µL	-
抗 BPA 抗血清	50 µL	50 µL	-
プレートカバーをして 5 分間攪拌後、常温(20~30 °C)で 55 分間反応			
洗浄 7 回			
TMB 基質液	100 µL		
遮光、常温 30 分間反応			
停止液	100 µL		
プレートをとたたいて反応液を混和し、30 分以内にブランクを対照として 450 nm における標準物質、検体の吸光度を測定			

## 7. 操作上の注意事項

- 検体は生体成分(血清または血漿)を使用してください。冷所もしくは-20 °C にて保存してください。
- 検体や標準物質は、二重測定することをおすすめします。
- 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので十分におこなってください。
- 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- TMB 基質液は光に対して敏感ですので、遮光保存してください。金属との接触も避けてください。
- 吸光度測定は、停止液添加後 30 分間以内におこなってください。

## 8. 測定結果の算出方法

- ウェル A-1 および A-2 の 0 ng/mL の標準物質の吸光度の平均(B<sub>0</sub>)を算出します。
- 他の濃度の標準物質のウェルについて、次式により B<sub>0</sub> に対する結合率(B / B<sub>0</sub>)を求めます。

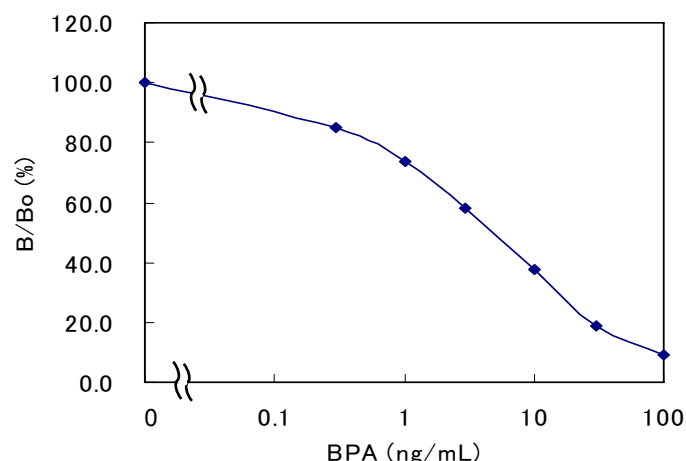
$$B / B_0 (\%) = \frac{\text{各ウェルの吸光度}}{B_0} \times 100$$

- 片対数グラフの対数目盛(横軸)に標準物質の各濃度を取り、整数目盛(縦軸)には結合率(B / B<sub>0</sub>)をとって、標準曲線を作成します。
- 検体測定用ウェルについても、同様に結合率(B / B<sub>0</sub>)を求め、標準曲線にあてはめて各検体中の BPA 濃度を読みとります。

## 9. 測定値と標準曲線作成例

標準品濃度 (ng/mL)	吸光度 (B) (450nm)	B / B <sub>0</sub> (%)
0	1.828 (B <sub>0</sub> )	100.0
0.3	1.554	85.0
1	1.349	73.8
3	1.058	57.9
10	0.685	37.5
30	0.343	18.8
100	0.163	8.9

標準曲線



\* 上記標準曲線は作成例です。測定に当たってはその都度標準曲線を作成してください。

## 10. キットの性能

### (1) 感度

- BPA 濃度が 0 ng/mL のときの吸光度 ( $B_0$ ) は、1.5 以上。
- BPA 濃度が 100 ng/mL の吸光度 ( $B_{100}$ ) と ( $B_0$ ) との吸光度比 ( $B_{100} / B_0 \times 100$ ) は、20% 以下。

### (2) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
1.32	0.19	14	8
4.49	0.38	8.5	8
14.73	1.03	7	8
31.15	1.72	5.5	8

### (3) 特異性

反応物質	交差率
BPA	100 %
BPA-Glucronide	85.0 %
BPA-Na-Sulfate	68.0 %
Bisphenol B	8.3 %
Bisphenol F	0.2 %
Diethylstilbestrol	≤ 0.02 %
Hexesterol	
17β-Estradiol	
4-Heptylphenol	
4-n-Nonylphenol	
4-Propylphenol	
4-Hexyloxyphenol	
4-Pentylphenol	
4-Hexylphenol	
4-Butylphenol	
2-ter-Butylphenol	
4-Dodecylphenol	
Di-n-Butyl-Phthalate	
Benzyl-n-Butyl Phthalate	
Daidzein	
Genistein	
Bis-GMA	

## 11. 使用上または取り扱い上の注意

- キット中の各試薬および検体は、使用前に常温に戻して泡立てないように混和し、液を均一にしてから用いてください。
- 停止液は強酸性 (1N 硫酸) です。衣服、皮膚等への接触および廃棄には十分注意してください。
- 測定結果はインキュベーションの時間や温度に影響されるので、検体および標準物質とも同一条件下で同時に操作をしてください。
- 抗体プレートおよび標準物質はアジ化ナトリウムを含んでいます。廃棄する際には爆発性の金属性アジドが生成されないように、多量の水で希釈し流してください。
- 使用後の容器は焼却処理するか、廃棄する場合は各種規定に従い、感染性廃棄物等を分別して処理してください。
- 構成試薬には動物血液成分を含む物があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いなどをおこなってください。
- ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換して使用することは避けてください。
- キットは表示されている 2~8 °C に保存し、有効期限内に使用してください。抗体プレート開封後、未使用のスリットは乾燥剤の入った密封容器に入れ、2~8 °C に保存し、有効期限内に使用してください。
- 本キットは、研究用試薬です。診断等に用いることはできません。
- 検体にはヒト血清または血漿を用いるので、HIV や HBV 等の感染の危険があるものとして注意して取り扱ってください。使用後の検体および器具類は、感染の危険があるものとして処理してください。

あるものとして処理してください。

### 【処理例】

※次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 1,000 ppm 以上)に 1 時間以上浸漬する。ただし、酸を含むものは中和してから浸漬してください。  
※121 °C で 20 分間オートクレーブにかける。ただし、次亜塩素酸ナトリウムが附着したものはオートクレーブにはかけないでください。

## 12. 保存方法および有効期限

2~8 °C 保存  
使用期限は外箱に記載

## 13. 包装単位および製品番号

96 Well  
製品番号 27766

## 14. 参考文献

- Yan H, Takamoto M, Sugane K. Exposure to Bisphenol A Prenatally or in Adulthood Promotes T(H)2 Cytokine Production Associated with Reduction of CD4CD25 Regulatory T Cells. *Environ Health Perspect.* 2008 Apr;116(4):514-9.
- Yamanaka H, Moriyoshi K, Ohmoto T, Ohe T, Sakai K. Efficient microbial degradation of bisphenol A in the presence of activated carbon. *J Biosci Bioeng.* 2008 Feb;105(2):157-60.
- Mahalingaiah S, Meeker JD, Pearson KR, Calafat AM, Ye X, Petrozza J, Hauser R. Temporal variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations in men and women. *Environ Health Perspect.* 2008 Feb;116(2):173-8.
- Bonefeld-Jørgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect.* 2007 Dec;115 Suppl 1:69-76.
- Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett.* 2008 Jan 30;176(2):149-56.
- Vom Saal FS, Hughes C. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect.* 2005 Aug;113(8):926-33.
- Inoue H, Tsuruta A, Kudo S, Ishii T, Fukushima Y, Iwano H, Yokota H, Kato S. Bisphenol a glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metab Dispos.* 2005 Jan;33(1):55-9.
- Hiroi H, Tsutsumi O, Takeuchi T, Momoeda M, Ikezaki Y, Okamura A, Yokota H, Taketani Y. Differences in serum bisphenol a concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia. *Endocr J.* 2004 Dec;51(6):595-600.
- Inoue H, Yuki G, Yokota H, Kato S. Bisphenol A glucuronidation and absorption in rat intestine. *Drug Metab Dispos.* 2003 Jan;31(1):140-4.
- Shibata N, Matsumoto J, Nakada K, Yuasa A, Yokota H. Male-specific suppression of hepatic microsomal UDP-glucuronosyl transferase activities toward sex hormones in the adult male rat administered bisphenol A. *Biochem J.* 2002 Dec 15;368(Pt 3):783-8.
- Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2002 Feb;110(2):193-6.
- Inoue H, Yokota H, Makino T, Yuasa A, Kato S. Bisphenol a glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metab Dispos.* 2001 Aug;29(8):1084-7.
- Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, Yuasa A. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J.* 1999 Jun 1;340 ( Pt 2):405-9.
- Kamiura T, et al. Determination of Bisphenol A in Air. *J. Environ. Chem.* 1997 7:275-9.
- Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature.* 1999 Oct 21;401(6755):763-4.
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology.* 1993 Jun;132(6):2279-86.
- Vom Saal FS. Sexual differentiation in litter-bearing mammals: influence of sex of adjacent fetuses in utero. *J Anim Sci.* 1989 Jul;67(7):1824-40.
- Ohkuma H, Abe K, Ito M, Kokado A, Kambegawa A, Maeda M. Development of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol A in serum. *Analyst.* 2002 Jan;127(1):93-7.
- Y. Usuki: *Bio. Clinica.* 2000 15: 55-8.
- Y. Takai: Proceedings of the 51st Annual meeting of the Japan Society for Obstetrics and Gynecology, Tokyo, April, p.S300, 1999
- A. Kokado: Proceedings of the 120th Annual meeting of the Japan Society for Pharmaceutical, Gifu, March, p.179 (4), 2000
- H. Ohkuma: Book of abstract of the 5th Annual meeting of the Immunochemical Society of Japan at Kobe, June, p. 21, 2000
- H. Kakishima: Book of abstract of the 4th Annual meeting of the Japan Society of Endocrine Disrupter Research at the Japanese Society City of Tsukuba, December, p.421, 2001
- N. Kawagoe: Book of abstract of the 4th Annual meeting of the Japan Society of Endocrine Disrupter Research at the Japanese Society City of Tsukuba, December, p.147, 2001

## 15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所 営業部  
〒370-0831 群馬県高崎市あら町 5-1  
TEL 027-310-8040 FAX 027-310-8045

Version 1.3