

研究用試薬エコロジーナ®

高感度 BPA ELISA キット  
(マイクロプレート)  
使用説明書

はじめに

ビスフェノール A(BPA)は、プラスチック原料として広く用いられていますが、近年、環境水や食品などから検出される事例が数多く報告されており<sup>1), 2), 3)</sup>、その内分泌攪乱作用による水環境や生態系への影響が懸念されています。

現在、環境庁(当時)作成の「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(1998)」<sup>4)</sup>や(社)日本下水道協会発行の「下水試験方法(追補暫定版)(2002)」<sup>5)</sup>には、BPA の測定法として GC/MS 法が記載されていますが、GC/MS 法には抽出、誘導體化などの煩雑な操作が含まれるほか、分析に高価な機器が必要となります。

本品は、酵素免疫測定法により試料中の BPA を高感度かつ簡便に測定できるキットで、新規モノクローナル抗体の採用により、弊社従来品に比べて 100 倍感度よく BPA を検出することができます。

また、機器分析値とも良好な相関があり<sup>6)</sup>、試料によっては前処理(固相抽出等)を省略することができます<sup>7)</sup>。



## キットの特長

1. 定量範囲は 0.05–10  $\mu\text{g/L}$ (ppb)と高感度で、試料中の BPA を特異的に検出できます。
2. モノクローナル抗体を使用しているため、製造ロット間で抗体性能にばらつきがありません。
3. 測定値の CV(変動係数)は 10%以下で、高精度です。
4. 有機溶媒の使用量を低減できます。
5. 測定試料の調製から定量まで 2.5 時間で完了します<sup>注)</sup>。
6. 標準液が各濃度列に設定されており、濃縮液からの希釈操作が不要です。
7. 簡単な操作で多検体を同時に処理できるため、経済的です。

注) 試料の前処理時間は含みません。

## 測定原理 (競合 ELISA 法)

### 1. 抗原抗体反応(競合反応)

BPA(抗原)と特異的に結合するたんぱく質(抗体)が、マイクロプレート内面に塗布(固相化)されています。

前処理した試料水と、BPA に発色用酵素(ペルオキシダーゼ)を結合させた抗原酵素複合体(酵素標識抗原)をマイクロプレートに加え、競合反応させます。

### 2. 酵素反応(発色反応)

競合反応後、洗浄により未反応物を除去し、発色基質(過酸化水素、TMB)を加えます。抗体に結合した抗原酵素複合体の発色用酵素のはたらきで発色基質が着色します。BPA 濃度が高い試料では、抗原酵素複合体の抗体への結合量が少ないため、着色が弱くなり、吸光度が低くなります。

### 3. 濃度の定量

450nm での吸光度(着色の度合い)と BPA 濃度との関係から標準曲線を作成します。これを用いて、試料中の BPA 濃度を定量します。

## キット構成内容

No.	品名	容量	数量	保存温度条件
①	抗BPAモノクローナル抗体固相化マイクロプレート	96 well	1枚	2～8℃
②	BPA標準液 0 μg/L (10%メタノール溶液)	1.5mL	1本	2～8℃
	BPA標準液 0.05 μg/L (10%メタノール溶液)			
	BPA標準液 0.3 μg/L (10%メタノール溶液)			
	BPA標準液 1.0 μg/L (10%メタノール溶液)			
	BPA標準液 10 μg/L (10%メタノール溶液)			
③	抗原酵素複合体粉末	7mL用	2本	2～8℃
④	抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)	7mL	2本	2～8℃
⑤	6倍濃縮洗浄液	50mL	1本	2～8℃
⑥	発色液(褐色ビン)	15mL	1本	2～8℃
⑦	発色停止液(黒キャップ)	15mL	1本	2～8℃
⑧	混合用マイクロプレート	96 well	1枚	室温
⑨	プレートシール		1枚	
⑩	使用説明書		1部	

### <キットの他に必要な試薬・器材>

器材例は推奨品であり、弊社で使用可否を確認しておりますが、これらに限定するものではありません。

#### ●環境・生体試料測定に共通●

1. ディスポーザブル培養試験管(例:旭テクノグラス(株)社製、品番 9831-1207)  
※壁面への吸着を防ぐため、試験管は必ずディスポーザブル品を使用してください。
2. マイクロピペット (20-200 μL, 200-1000 μL) (例:ギルソンピペットマン P-200, P-1000 )
3. マルチチャンネルピペット(50-300 μL) (フィンピペットデジタルマルチチャンネル 8チャンネル)
4. プレートリーダー(測定波長 450nm) (例:サンライズリモート 和光純薬工業(株)取扱い)
5. ストップウォッチ(時計)
6. ストリップインジェクター(あると便利です) (例:コーニングゴスター社製、品番 2578)
7. メタノール(高純度品を推奨します)

## ●環境試料測定●

NEXUSによる固相抽出(濃縮)が不要なとき

8. ガラス繊維フィルター(例:アドバンテック社製、品番 36481047, GS-25φ47mm) およびろ過に必要な器具

NEXUSによる固相抽出(濃縮)が必要なとき

8. ガラス繊維フィルター(例:アドバンテック社製、品番 36481047, GS-25φ47mm) およびろ過に必要な器具
9. 固相カートリッジ(例: GL-Pak GLASS SPE NEXUS 200mg/6ml 品番 5010-26021 ジーエルサイエンス株)  
および固相抽出に必要な器具
10. ジクロロメタン(高純度品を推奨します)

## ●生体試料測定●

Isolute Multimodeによる固相抽出が必須です

11. 酢酸緩衝液:(酢酸ナトリウム 12g+酢酸 10mL+アスコルビン酸 1.5g+EDTA・2Na 0.1g)/蒸留水 1L
12. β-グルクロニダーゼ(β-Glucuronidase)(例: Glucuronidase Type A-I 日本バイオテスト研究所)
13. 固相カートリッジ(例: ISOLUTE Multimode 500mg/3ml 品番 904-0050-B バイオタージ・ジャパン株)
14. 固相抽出用器具一式(VAC ELUTE、真空ポンプ、ガラス遠沈管、濃縮装置など)

## 測定時の一般的注意

- 本キットは、使用前に 30 分程度放置し、室温に戻してからご使用ください。
- 異なるキットの試薬を組み合わせず使用しないでください。
- 試薬は凍結を避けて 2~8°Cで冷蔵保存し、使用期限の過ぎたものは使用しないでください。
- 試薬調製時・測定操作時は、試薬が直接皮膚や目に触れないよう、眼鏡や手術用ゴム手袋などの保護具を使用してください。
- 精度管理のため、繰り返し測定( $n \geq 2$ )を推奨します。

## 前処理法

### ◆環境試料◆

#### 1. 試料中のBPA濃度; キットの定量下限(0.05 μg/L)以上の場合

環境試料水をガラス繊維フィルターでろ過した後 10%メタノール溶液とし、pp. 9-11「測定法」に従って定量します。

#### 2. 試料中のBPA濃度; キットの定量下限(0.05 μg/L)以下の場合

環境試料水をガラス繊維フィルターでろ過し、NEXUSによる固相抽出(濃縮)を行った後 10%メタノール溶液とし、pp. 9-11「測定法」に従って定量します。

### 3. NEXUS 固相抽出

- 1)ジクロロメタン(10mL)、メタノール(5mL)および蒸留水(5mL)であらかじめコンディショニングした NEXUS 固相カートリッジに、試料(ろ液)を通水します。
- 2)蒸留水(5mL)および蒸留水:メタノール混合物(50:50)(5mL)で洗浄後、NEXUS 固相カートリッジを乾燥します(45 分程度)。
- 3)ジクロロメタン(6mL)により溶出します。
- 4)窒素パージ(窒素ガス吹き付け)等により溶媒を除去します。
- 5)10%(v/v)メタノールに再溶解し、pp. 9-11「測定法」に従って定量します。

※ ジクロロメタンはヒトに対する発ガン性が指摘されています(NTP:GROUP b、IARC:GROUP 2B)。「ジクロロメタンによる健康障害を防止するための指針」(厚生労働省 平成14年1月21日公示)に従い、適切な措置を講じた上でご使用ください。

### ◆生体試料◆<sup>8)</sup>

#### 1. Free-BPAを測定する場合

生体試料中の BPA フリー体のみを測定する場合は、3. 「Isolute Multimode 固相抽出」へ進みます。

#### 2. Total-BPAを測定する場合

生体試料中の BPA 総量(Total-BPA:フリー体+抱合体)を測定する場合は、 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理により、生体試料中の BPA 抱合体をすべて BPA フリー体に変換した後、3. 「Isolute Multimode 固相抽出」へ進みます。

##### 【 $\beta$ -グルクロニダーゼ処理例】

生体試料 0.1mL、酢酸緩衝液 0.2mL と  $\beta$ -グルクロニダーゼ 10  $\mu$ L を混合し、37°C で一晩(約 18 時間)反応させ、BPA 抱合体を全て BPA フリー体へと変換します。

#### 3. Isolute Multimode 固相抽出

- 1) 1. または 2. で調製した Free-BPA または Total-BPA 測定用試料を、メタノール(10mL)および蒸留水(6mL)であらかじめコンディショニングした Isolute Multimode 固相カートリッジに通水します。
- 2) 35%メタノール溶液(6mL)で洗浄後、メタノール(2.5mL)により溶出します。
- 3) 窒素パージ(窒素ガス吹き付け)等により溶媒を除去します。
- 4) 10%(v/v)メタノールに再溶解し、pp. 9-11「測定法」に従って定量します。

# 測定法

## 1. 「抗原酵素複合体溶液」の調製

「③抗原酵素複合体粉末」(1本)に、「④抗原酵素複合体溶解液(白キャップ)」(1本)を全量(7mL)加えて溶解し、抗原酵素複合体溶液を調製します。

※抗原酵素複合体溶液は冷蔵保存し、溶解後2週間以内に使用してください。

※マイクロピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回繰り返して混合してください。

※抗原酵素複合体溶液を2本同時に使用する時は、あらかじめ混合してから使用してください。1本(7mL)で約50well分の測定ができます。

## 2. 「混合液」の調製

「⑧混合用マイクロプレート」を使用し、抗原酵素複合体溶液 100  $\mu$ L/well に測定試料または各濃度の「②BPA 標準液(いずれもメタノール濃度 10%)」100  $\mu$ L/well を添加して、混合液を調製します。

※必ず抗原酵素複合体溶液を先に分注し、測定試料またはBPA標準液を後から添加してください。添加順序を逆にすると、標準曲線を正確に作成できない場合があります。

※マイクロピペットあるいはマルチチャンネルピペットを利用し、液中で吸入・排出を2~3回繰り返して混合してください。また、泡立ちやすいため、分注の際は気泡が入らないようゆっくりと操作してください。

※BPA 標準液中のメタノールが揮散しますので、分取後速やかにフタを固く閉め、冷蔵保存してください。

※使用しなかったBPA 標準液は回収し、水系に直接廃棄しないでください(例:布や紙で取り取り、焼却処理)。

## 3. 抗原抗体反応(競合反応)

室温に戻した「①抗 BPA モノクローナル抗体固相化プレート」に4. で調製した混合液を 100  $\mu$ L/well ずつ分注し、液面が水平になるように端を軽くたたきます。「⑨プレートシール」を表面に貼り、室温(18~25°C)で 60 分間反応させます。

※マイクロプレートは、必要なwell数だけ使用することができるように、8well ずつのスプリットタイプになっています。未使用部分は凍結剤とともにチャック付ラミネート袋に戻し、密封後、冷蔵保存しておけば次回も使用することができます。

※測定誤差の原因となりますので、分注する際は泡が入らないように注意してください。

※異物混入および蒸発防止のため、反応中はプレートシールでマイクロプレート上面を覆ってください。

※反応中はマイクロプレートを静置してください。

※23°Cの室温が可能な恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。

※特に検本数が多い場合は、各検本の抗原抗体反応時間が一定になるように注意してください。

## 4. 「洗浄液」の調製

抗原抗体反応時間中に、「⑤ 6倍濃縮洗浄液」と蒸留水を 1:5 の割合で混合し、洗浄液を調製します(例:20mL の「⑤ 6倍濃縮洗浄液」に 100mL の蒸留水を添加)。

※分割使用の場合は、1回の測定に必要な量だけ分取して使用してください。1wellあたり約 1.2mL (1プレートあたり約 120mL) を調製の目安としてください。

※一旦希釈した洗浄液は冷蔵保存し、希釈後1ヶ月以内に使用してください。

## 5. 未反応物の除去

プレートシールを取り、well 中の反応液を捨て、洗浄液 300  $\mu$  L/well を用いて 3 回洗浄します。3 回目の洗浄液を捨てた後は、裏返したマイクロプレートをペーパータオル等の上で軽くたたいて(タッピング)、洗浄液を完全に除去します。

※測定誤差の原因となりますので、3 回目の洗浄後はwell の底に洗浄液が残っていないことを確認してください。

※プレート裏面の汚れは吸光度の測定誤差の原因となりますので、触れないように注意してください。

※反応液は回収し、BPA を水系に直接棄棄しないでください(例：布や紙へ吸い取り、焼却処理)。

## 6. 発色反応

「⑥発色液(褐色ビン)」を 100  $\mu$  L/well 加え、プレートシールを再び表面に貼って、室温(18 ~25°C)で 30 分間反応させた後、「⑦発色停止液(黒キャップ)」を 100  $\mu$  L/well 添加します。

※23°Cの保持が可能な恒温槽を所有している場合は、恒温槽の使用をおすすめします。

※特に検体数が多い場合は、各検体の発色反応時間が一定になるように注意してください。

※発色試薬を加えると青色に、発色停止液を加えると黄色に呈色します。

## 7. 比色および濃度計算

プレートリーダーを用い、波長 450nm で吸光度(OD)を測定します。

方眼紙もしくはパソコンを利用し、検液中の BPA 濃度を算出します。検液中の BPA 濃度より、次式を用いて試料中の BPA 濃度を算出します。

$$\text{試料中の BPA 濃度}(\mu\text{g/L}) = \text{検液中の BPA 濃度}(\mu\text{g/L}) / 0.9 / \text{濃縮倍率}$$

(係数 0.9 は、添加した 10%(V/V)メタノール由来の補正係数)

※発色反応停止後 15 分以内に測定してください。

※標準曲線は測定ごとに作成してください。

※マイクロプレートの裏面には触れないよう注意してください。

## ■BPA 濃度算出方法例■

### 方眼紙利用:

BPA 0 $\mu$ g/L の時の OD を 100%として、各濃度での阻害率(B/B0%)を次式により算出します。

$$\text{阻害率 (B/B0\%)} = (\text{サンプルまたは標準液のOD}) / (\text{BPA 0 } \mu\text{g/Lの時のOD})$$

標準液の BPA 濃度( $\mu$ g/L)と OD または B/B0%を両対数方眼紙(または片対数方眼紙)にプロットして検量線を作成し、得られた検量線より検液中の BPA 濃度を算出します。

(測定例)  
Standard OD or B/B0%

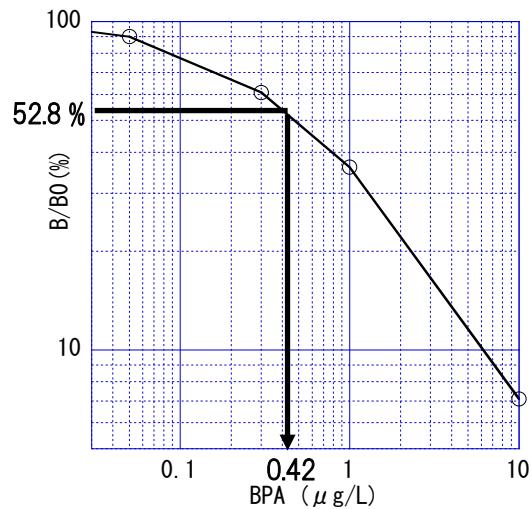
BPA ( $\mu$ g/L)	OD	B/B0%
0	1.356	100
0.05	1.220	90.0
0.3	0.824	60.8
1.0	0.488	36.0
10.0	0.096	7.1

方眼紙からの読み取り例

BPA ( $\mu$ g/L)	OD	B/B0%
0.42	(0.716)	52.8

Log-Log Graph Paper Calculation

BPA=0.42( $\mu$ g/L) from B/B0%=52.8%



### パソコン利用:

データ処理ソフトウェアを用いて 4-parameter logistic fitting 後、回帰式より検液中の BPA 濃度を算出します。

<データ処理ソフトウェアの例>

“デルタソフト(DeltaSoft)” : BioMetallics, Inc., Princeton, NJ (<http://www.microplate.com>)



## 測定サンプル数（例）

添付の「① 抗BPAモノクローナル抗体固相化マイクロプレート」には96のwellがあり、一列(8well)ずつ12列に分割できます。

※精度管理のため、可能であればBPA濃度0の標準液をできるだけ多く測定するようおすすめします。

例1)一括測定：BPA標準液として5系列(0, 0.05, 0.3, 1.0, 10 $\mu$ g/L)を使用

BPA標準液として5系列をn=2で使用すると、残りのwell数は86となりますので、43サンプル(n=2)を一度に測定することができます。

【レイアウト例】検液は分割しやすいように縦方向に分注してください(A1~E2は標準液に使用)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S04	S04	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
B	0.05	0.05	S05	S05	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
C	0.3	0.3	S06	S06	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
D	1.0	1.0	S07	S07	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
E	10	10	S08	S08	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
F	S01	S01	S09	S09	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
G	S02	S02	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42
H	S03	S03	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35	S43	S43

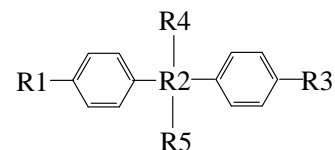
例2)二分割測定：BPA標準液として5系列を使用(n=2)

一回当たりの検体数が19個までなら、二分割での測定が可能です(n=2)。

【レイアウト例】検液は分割しやすいように縦方向に分注してください(A1~E2、A7~E8は標準液に使用)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	S04	S04	S12	S12	0	0	S04	S04	S12	S12
B	0.05	0.05	S05	S05	S13	S13	0.05	0.05	S05	S05	S13	S13
C	0.3	0.3	S06	S06	S14	S14	0.3	0.3	S06	S06	S14	S14
D	1.0	1.0	S07	S07	S15	S15	1.0	1.0	S07	S07	S15	S15
E	10	10	S08	S08	S16	S16	10	10	S08	S08	S16	S16
F	S01	S01	S09	S09	S17	S17	S01	S01	S09	S09	S17	S17
G	S02	S02	S10	S10	S18	S18	S02	S02	S10	S10	S18	S18
H	S03	S03	S11	S11	S19	S19	S03	S03	S11	S11	S19	S19

# BPA 抗体の交差反応性 -1-



## 【BPA 類縁化合物に対する交差反応性】

化合物	R1	R2	R3	R4	R5	交差反応性 (%)
Bisphenol A (BPA)	OH	C	OH	CH3	CH3	100
Bisphenol E (BPE)	OH	C	OH	H	CH3	6.0
Bis(p-hydroxyphenyl)methane	OH	C	OH	H	H	1.8
Bisphenol B (BPB)	OH	C	OH	CH3	C2H5	15.6
2,2'-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-propanol	OH	C	OH	CH3	CH2OH	1.7
4,4'-Bis(p-hydroxyphenyl) pentanoic acid	OH	C	OH	CH3	C2H4COOH	<0.1
p, p'-dihydroxybenzophenone	OH	C	OH	-	O	<0.1
4,4'-dihydroxydiphenyl ether	OH	O	OH	-	-	0.2
1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-2-propanol	OH	CH2C	OH	OH	CH3	0.4
Bisphenol S (BPS)	OH	SO2	OH	-	-	0.2
Bis[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]sulfone	O(CH2)2OH	SO2	O(CH2)2OH	-	-	<0.1
BPA Diacetate	OOCCH3	C	OOCCH3	CH3	CH3	0.2
BPA Dimethacrylate		C		CH3	CH3	0.7
BPA Diglycidyl Ether		C		CH3	CH3	<0.1
BPX-33		C		CH3	CH3	<0.1

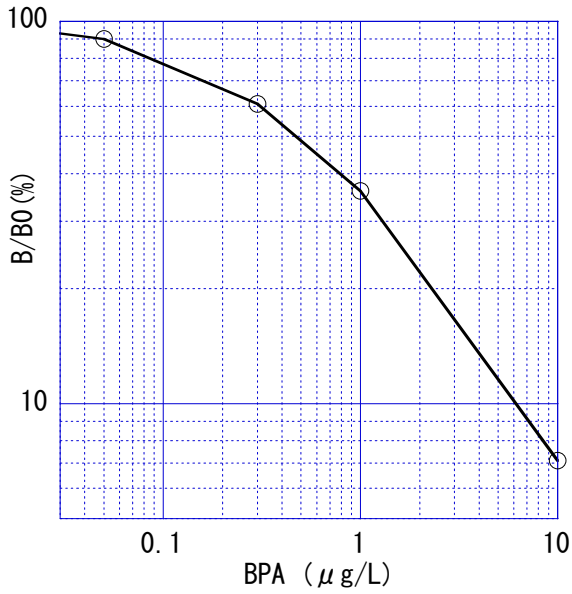
## 【環境汚染物質に対する交差反応性】

	化合物	交差反応性 (%)
Endocrine Disruptors	Bisphenol A (BPA)	100
	Diethylhexylphthalate (DEHP)	<0.05
	Nonylphenol (NP)	0.19
Estrogens	17β-Estradiol (E2)	<0.05
	Estrone (E1)	<0.05
Surfactants	Linear alkylbenzene sulfonate (LAS)	<0.05
	Alkylphenol Ethoxylate (APE)	<0.05
	Alkyl Ethoxylate (AE)	<0.05
Humic substance	Humic acid Na	<0.05

## BPA 抗体の交差反応性 -2-

化合物	交差反応性(%)
<b>Bisphenol A</b>	<b>100</b>
Equol	43.8
Dihydrodaidzein	0.7
O-Desmethylangolensin	0.2
Biochanin	<0.1
Daidzein	<0.1
Genistein	<0.1
Luteolin	<0.1
O-Methoxyphenol	<0.1
Quercetin	<0.1
Formononetin	<0.1
Enterodiol	<0.1
Matairesinol	<0.1
Creatinin	<0.1
Hipuric acid	<0.1
Uric acid	<0.1
Urobilin	<0.1
Biliverdin	<0.1
Bilirubin	<0.1

## BPA 標準曲線 (例)



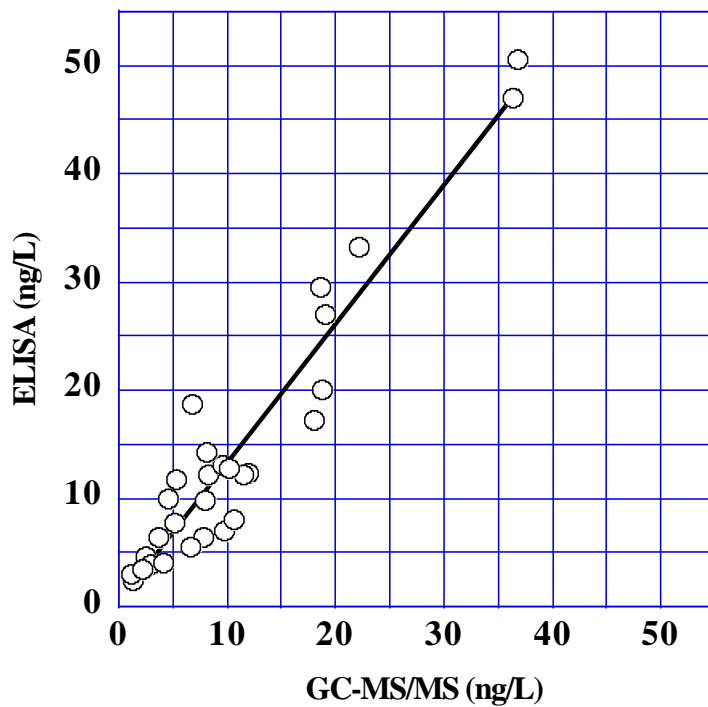
定量範囲は 0.05~10μg/L で、濃縮によりさらに低濃度の試料も測定できます。

測定値の CV(変動係数)は 10%以下で、測定のばらつきが少なく、高精度です。

## GC/MS/MS との相関<sup>6)</sup>

$$\text{ELISA} = 1.29 \times \text{GC-MS/MS} + 0.39$$

$$R^2 = 0.91$$



## 参考文献

- 1) 国土交通省河川局河川課: 平成12年度水環境における内分泌攪乱物質に関する実態調査結果について (2001)
- 2) 環境省環境管理局水環境部水環境管理課: 平成12年度水環境中の内分泌攪乱化学物質(いわゆる環境ホルモン)実態調査結果(平成13年10月)
- 3) 中澤ら: 厚生科学研究費補助(生活安全総合事業)協力研究報告書(1999)
- 4) 環境庁水質保全局水質管理課: 外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(水質、底質、水生生物) (1998)
- 5) (社)日本下水道協会: 下水試験方法(追補暫定版)ー内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編ー (2002)
- 6) 白石寛明ら: 国立環境研究所 特別研究報告書 (SR-46) (2002)
- 7) 郷田ら: 「ビスフェノールA高感度 ELISA および前処理法の開発」環境ホルモン学会 第4回研究発表会 要旨集 p.92 (2001)
- 8) 廣部ら: 「高感度 BPA ELISA の交差反応性」環境ホルモン学会 第7回研究発表会 要旨集 p.174 (2004)

## MEMO

- ・本キットは研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助として使用することはできません。
- ・使用説明書は予告なく変更する場合があります。