

血液透析患者の HPLC 法によるビスフェノール A 値

清水 康*¹ 申 曾洙*² 佐二木順子*³ 田中和弘*¹
 岡本磨美 田中和馬*⁴ 阪口剛至 大槻英展
 吉本秀之 森上辰哉

はじめに

ビスフェノール A (BPA) は、女性ホルモン様作用を示す内分泌攪乱物質「環境ホルモン」の一つであり、酸性触媒の存在下で、フェノールとアセトンとの縮合反応により製造される。その生産量は年々増加し、世界中で年間 300 万トン以上、日本でも 60 万トン近く生産されている。BPA は、主にポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原料に使用されるほか、フェノール樹脂、ポリスルホン、ポリアリレートなどの樹脂原料、抗酸化剤、重合禁止剤としてポリ塩化ビニルの可塑剤にも添加される。

これらの部材は、各種医用材料にも広く使われおり、特に持続的・継続的治療を必要とする透析医療にとって、BPA の曝露は脅威である。さらに現在、慢性腎不全患者に対する血液透析療法においては、BPA をその一成分とするポリカーボネート樹脂やポリスルホン樹脂が使用された透析器が主流を占めており、透析器からの BPA 溶出、体内移行、蓄積による生体反応への影響が懸念される。

BPA の血中濃度については透析患者も含め、ELISA による報告は散見されるが¹⁻⁴⁾、一方で、ELISA による測定値の問題点も指摘されてい

る⁵⁾。今回われわれは、透析患者、各種透析器および各種透析用水の BPA 濃度を High Performance Liquid Chromatography/Electrochemical Detector (LC/ECD), HPLC/Mass Spectrometry (LC/MS) および ELISA にて測定したので報告する。

対象および方法

各種透析器 (表 1) を使用している 49 名の透析前後の血漿ならびに各種未使用透析器の内部液中の BPA を測定した。

透析器 wet タイプは透析器内部充填液、dry タイプは生理食塩液 (以下、生食) によるプライミングの初期液を検体とした。また、一部については、生食 1 L による洗浄後の液も検体として測定した。

当院透析液製造供給工程での各種透析用水として水道水、RO 水、モルセップ通過前後の透析液、末端透析装置に設置しているエンドトキシンカットフィルター (ETCF) 前後の透析液、透析器入口直前の透析液の BPA を測定した。

中空糸に BPA の使用が予測される PS および PEPA を PS 系、BPA の使用がないとされる透析器を非 PS 系とした。

BPA 測定は、血液検体については LC/ECD と ELISA で行い、一部 LC/MS も使用した。非血液検体については LC/ECD を用い、一部 ELISA、LC/MS も使用した。なお ELISA は高感度 BPA ELISA キット (日本エンバイロケミカルズ) を用いた。

*¹ 五仁会元町 HD クリニック臨床検査部
 (〒 650-0012 神戸市中央区北長狭通 3-6-3)

*² 同 内科

*³ 千葉県衛生研究所

*⁴ 五仁会元町 HD クリニック臨床工学部

表 1 使用した各種透析器

membrane		dialyzer	type
PS	ポリスルフォン	A 社 PS ①	WET
		A 社 PS ②	WET
		B 社 PS	WET
		C 社 PS	DRY
PEPA	ポリエステル系ポリマーアロイ	D 社 PEPA ①	WET
		D 社 PEPA ②	WET
PES	ポリエーテルスルフォン	E 社 PES ①	DRY
		E 社 PES ②	DRY
PAN	ポリアクリロニトリル	F 社 PAN	DRY
CTA	セルローストリアセテート	E 社 CTA ①	DRY
		E 社 CTA ②	DRY
PMMA	ポリメチルメタクリレート	C 社 PMMA	DRY

結 果

1. 透析患者の血中 BPA 濃度

1) 透析前後の血中 BPA 濃度比較

LC/ECD で透析前 (n=49) 0.16 ± 0.43 ng/mL から透析後 0.24 ± 0.39 ng/mL, ELISA で透析前 (n=49) 0.22 ± 0.33 ng/mL から透析後 0.19 ± 0.25 ng/mL, LC/MS で透析前 (n=32) 0.17 ± 0.21 ng/mL から透析後 0.14 ± 0.17 ng/mL であり, 測定法間で有意差を認めなかった。

2) PS 系と非 PS 系使用透析器に分けた透析前後の BPA 濃度比較

PS 系を使用した患者の血中 BPA は, LC/ECD で透析前 (n=21) 0.05 ± 0.11 ng/mL から透析後 0.25 ± 0.41 ng/mL, ELISA で透析前 (n=21) 0.18 ± 0.21 ng/mL から透析後 0.14 ± 0.17 ng/mL, LC/MS で透析前 (n=11) 0.10 ± 0.13 ng/mL から透析後 0.15 ± 0.14 ng/mL となった。

非 PS 系を使用した患者の血中 BPA は, LC/ECD で透析前 (n=28) 0.25 ± 0.55 ng/mL から透析後 0.23 ± 0.38 ng/mL, ELISA で透析前 (n=28) 0.25 ± 0.39 ng/mL から透析後 0.23 ± 0.30 ng/mL, LC/MS で透析前 (n=21) 0.20 ± 0.24 ng/mL から透析後 0.13 ± 0.19 ng/mL となった。

LC/ECD において PS 系使用で透析後に上昇

傾向, 非 PS 系使用で低下傾向を示したが, 透析前後の差については PS 系と非 PS 系間で有意差を認めなかった。

2. 各種未使用透析器の内部液 BPA 濃度(表 2)

LC/ECD で中空糸素材が PS, PEPA の透析器より PBA が検出された。

また, 中空糸素材に BPA を含まない透析器よりも BPA が検出され, それらの一部は, 容器が PBA を含む素材でできていた。中空糸および容器にも BPA を含まない F 社 PAN では BPA が検出され, C 社 PMMA では検出されなかった。一部の透析器で測定した, 生食 1 L 洗浄後の液においても依然 BPA が検出されたが, その濃度は 1 ng/mL 未満であった。

3. 透析液製造供給工程での各種透析用水中の BPA 濃度 (表 3, 4)

LC/ECD にて水道水, RO 水, モルセップ通過後, 日常使用中 ETCF 後の検体には BPA が検出されなかった。しかし, 新品 ETCF 取り付け直後では, ETCF 後の透析液に 1.39 ng/mL および 1.94 ng/mL の BPA を検出し, 使用 3 日後でも 0.44 ng/mL の BPA が検出された。透析器入口直前の透析液にも 1 ng/mL 未満であったが BPA を検出した。

表 2 各種透析器内部液のBPA濃度

membrane	dialyzer	type	liquid	BPA (ng/mL)		fiber	case
				LC/ECD	ELISA	BPA	BPA
PS	A社PS①	WET	充填液	0.00	1.50	○	×
			充填液	0.00	0.07		
	A社PS②	WET	充填液	0.44		○	×
			洗浄後液	0.25			
B社PS	WET	充填液	0.12	0.15	○	○	
		充填液	0.14				
		洗浄後液	0.22				
C社PS	DRY	初期液	0.00	0.03	○	×	
		初期液	0.29				
		洗浄後液	0.39				
PEPA	D社PEPA①	WET	充填液	2.79	2.59	○	○
			充填液	0.80			
	D社PEPA②	WET	充填液	0.71	3.10	○	○
洗浄後液	0.63						
PES	E社PES①	DRY	初期液	0.00	0.00	×	○
			初期液	0.00			
E社PES②	DRY	初期液	0.15	0.10	×	○	
		初期液	0.15				
		洗浄後液	0.23				
PAN	F社PAN	DRY	初期液	0.00	0.00	×	×
			初期液	0.65			
			洗浄後液	0.47			
CTA	E社CTA①	DRY	初期液	3.97		×	○
			洗浄後液	0.09			
E社CTA②	DRY	初期液	5.43		×	○	
		洗浄後液	0.13				
PMMA	C社PMMA	DRY	初期液	0.00	2.00	×	×
			初期液	0.00			
			洗浄後液	0.00			

考 察

現在、さまざまな研究機関でBPAの測定が行われており、その対象物質は多種多様である。プラスチック器材から水など単純溶媒への溶出物中の測定であれば、フリーのBPAがほとんどであるため、その検出は比較的容易である。しかし対象が血液となると、夾雑物の影響、体内でのBPA代謝経路の存在⁵⁾により検出は困難となる。実際、ELISA法では体内に存在する類似の物質とのク

ロスリアクションやBPAの代謝産物などを同時に測定する可能性が考えられ、また、用いられる抗体の純度の違いによりキット間で感度も異なるため⁶⁾、HPLCによる測定が推奨されている。今回は、フリーのBPAをLC/ECD、LC/MS、ELISAの3法で測定したが、測定法間に値の差は認められなかった。このことは、従来のELISAキットに比べ、今回使用したキットの抗体のBPA選択性が優れていることを示している。

透析前患者血中BPAは、従来の報告²⁻⁴⁾より低

表 3 透析液製造供給過程の BPA 濃度

sample		membrane	BPA (ng/mL)		fiber	case
sampling point	liquid		LC/ECD	ELISA	BPA	BPA
水道栓	水道水		0.00			
RO 装置後	RO 水	PS	0.00	0.00	○	
モルセップ通過前	透析液		0.00	0.09		
モルセップ通過後	透析液	PES	0.00	0.07	×	○
継続使用中 1st ETCF 前	透析液		0.00	0.00		
継続使用中 1st ETCF 後	透析液	PEPA	0.00	0.07	○	○
継続使用中 2nd ETCF 後	透析液	PEPA	0.00	0.07	○	○
個人用 A ETCF 前	透析液		0.00	0.00		
個人用 A ETCF 後	透析液	PEPA	0.00	0.00	○	○
個人用 B ETCF 前	透析液		0.00	0.04		
個人用 B ETCF 後 (交換直後)	透析液	PEPA	1.39	1.11	○	○
個人用 C ETCF 後 (交換直後)	透析液	PEPA	1.94		○	○
個人用 C ETCF 後 (交換 3 日後)	透析液	PEPA	0.44		○	○

表 4 透析器入口直前透析液の BPA 濃度

sample		BPA (ng/mL)	
sampling point	liquid	LC/ECD	ELISA
監視装置 A 透析器	透析液	0.13	0.24
監視装置 B 透析器	透析液	0.07	0.05
監視装置 C 透析器	透析液	0.09	0.16
監視装置 D 透析器	透析液	0.53	0.95
監視装置 E 透析器	透析液	0.42	0.41
監視装置 F 透析器	透析液	0.00	0.06
監視装置 G 透析器	透析液	0.08	0.08
個人用装置 H 透析器	透析液	0.00	0.15

値であり、後述するように、透析中に透析器および透析液から BPA 負荷があると考えられるにもかかわらず、透析前後値に差がなく、透析による BPA 負荷を認めなかった。その理由については、体内負荷されたフリー-BPA の代謝、他物質との結合などにより、フリー-BPA としては検出されなかった可能性も考えられる。

BPA は経口投与されたほぼ 100% が速やかに消化管で吸収された後、肝臓でグルクロン酸抱合され、血液中に入り体循環し、きわめて短い半減期 (6 時間以内) でほぼ全量尿中に排泄されるといわれている⁹⁾。このことは、尿が出ない透析患者にとっては半減期がかなり長くなることを意味しており、停滞中の代謝産物の増加、蓄積も問題にな

るかもしれない。実際、体内の BPA を測定する場合、その代謝産物も測定することが必要とも考えられており、フリーの BPA 以外にも、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体、カテコール体、キノン体、そのほか活性代謝物の測定が今後必要となろう。

各種未使用透析器の内部液 BPA 測定結果より、透析器からの BPA 溶出は比較的抑えられており、各メーカーが製造最終工程での洗浄強化など、透析器由来の各種溶出物を除去する努力をしているものと思われた。このことも、患者の血中 BPA 値が低く維持された理由の一つである。しかし、一方で中空糸に BPA を含まない透析器からの BPA 溶出も確認され、ハウジングなど容器からの溶出が考えられた⁹⁾。

ポリカーボネートは 37°C の血漿と接すると、より多くの BPA が溶出してくるとの報告もあり⁷⁾、場合によっては透析中における予測以上の BPA 負荷も考えられる。透析器からの BPA 溶出については、今後も定期的な監視が必要である。

透析液製造供給工程での各透析用水中の BPA 測定結果より、モルセップ通過後、日常使用中 ETCF 後の透析液には検出されなかった BPA が透析器入口前の透析液に検出された。今回、BPA 溶出箇所の特定はできなかったが、透析監視装置内での BPA 溶出源の存在を示唆するものであ

る。

ETCF は PEPA 膜であり、新品ならびに日常使用 3 日後においても依然 BPA が検出された。ETCF はエンドトキシンを阻止できても BPA は除去できず、逆に膜素材から溶出し、BPA 負荷の要因になり得る可能性は否定できない。十分な洗浄後取り付けることが必要であろう。

今回の結果より、おのおのの BPA 溶出は少量であっても全くゼロではなく、透析中の BPA 低容量負荷は避けられず、腎排泄経路の荒廃している透析患者では、BPA 代謝遅延による代謝産物の蓄積などによる生体反応には注意深い観察が必要と考えられる。

今後、透析器の製造メーカーには、極力 BPA を含まない新たな膜素材開発、現存する BPA 含有透析器においては製造最終工程でのさらなる洗浄強化を希望する。われわれも今後、施設の透析液製造過程、供給ライン、透析器入口までの素材を把握し、極力 BPA が混入しない透析液を作製する必要があると考える。

ま と め

1) 透析患者の LC/ECD による血中フリー BPA 値は、これまでの報告値に比べると低値であった。

2) 透析前後の血中フリー BPA 値には大きな変化はなかった。

3) PS, PEPA 膜以外の透析器からもわずかながら BPA 溶出が確認された。

4) 透析器に供給される透析液にも BPA の混

入が確認された。

5) 透析中の低容量持続負荷による長期的影響が危惧される。

文 献

- 1) Fukata H, Mori C, Miyagawa H, et al : Comparison of elisa- and LC-MS-based methodologies for the exposure assessment of bisphenol A. *Toxicology Mechanisms and Methods* **16** : 427-430, 2006
- 2) 村上和隆, 下郷紗智子, 西 冴子, 他 : 血液透析患者におけるビスフェノール A の蓄積. 腎と透析 **49** 別冊ハイパフォーマンスメンブレン '05 : 238-240, 2005
- 3) 川越信秀, 土田和穂, 卯月昌子, 他 : 透析患者における血清中ビスフェノール A 測定キットの使用経験. 第 4 回環境ホルモン学会 講演要旨集, 2001
- 4) 菅野義彦, 岡田浩一, 中元秀友, 他 : 人工透析療法患者における血中ビスフェノール A の測定. 第 3 回環境ホルモン学会 講演要旨集, p 322, 2000
- 5) Volkel W, Colnot T, Csanady GA, et al : Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* **15** : 1281-1287, 2002
- 6) 山崎浩子, 長宅芳男, 佐藤 稔, 他 : 各種透析器からのビスフェノール A の溶出に関する検討. 腎と透析 **49** 別冊ハイパフォーマンスメンブレン '00 : 28-32, 2000
- 7) Sajiki J, Takahashi K, Yonekubo J : Sensitive method for the determination of bisphenol A in serum using to systems of high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* **736** : 255-261, 1999