

血液中PCB分析における使用血液量の少量化に関する検討 (2023年度)

江川 真文, 谷口 香織, 辻村 和也

Study on Reducing the Amount of Blood Used in PCB Analysis in Blood (2023)

Masafumi EGAWA, Kaori TANIGUCHI and Kazunari TSUJIMURA

キーワード: PCB、血液、油症、GC-ECD

Key words: PCB, human blood, Yusho, GC-ECD

はじめに

1968年に発生したカネミ油症発生当時から長崎県では「長崎油症研究班」が組織され、毎年、五島市及び長崎市で油症検診を実施し、油症の診断と治療法に関する研究等を行っている。

当センター(旧、長崎県衛生公害研究所)においても1973年から血液中のポリ塩化ビフェニル(PCB)の分析を開始し、各年度の分析結果をカネミ油症認定審査の基礎資料として認定審査会に提供してきた。血中PCB分析は少量の血液量で安定した結果が求められる。今回、高齢化しつつある認定患者の身体的負担の軽減や再検査時における検体の有効活用を目的として、従来、血液5.0 gを使用する方法(5 g法)により検査していたところ、血液2.0 gを使用する方法(2 g法)について検討を行った。

また、従来の5 g法は、還流冷却装置を用いたアルカリ分解や分析ロートを用いたヘキサン抽出を行っており、安全面や作業効率面において課題があった。そこで、2 g法を検討するにあたり、低温条件下でのアルカリ分解方法や試験管を用いたヘキサン抽出方法の検討を行い、5 g法との回収率等について比較検証し妥当性評価を行った。これらの検討結果について報告する。

試験方法

1 試薬等および器具

(1) PCB標準液

- ・カネクロールKC-300、KC-400、KC-500、KC-600、ジーエルサイエンス(株)製(1:1:1:1)より調製したPCB標準原液400 ppmを使用した。
- ・ヘキサン5000: 関東化学(株)製、残留農薬・

PCB分析用

(2) 試薬

- ・ヒト全血A型(個別)、コスモ・バイオ(株)製
- ・蒸留水(ヘキサン洗浄品): 関東化学(株)製、残留農薬試験用
- ・エタノール(99.5): 富士フイルム和光純薬(株)製、残留農薬・PCB試験用
- ・無水硫酸ナトリウム: 富士フイルム和光純薬(株)製、残留農薬・PCB試験用
- ・水酸化カリウム: 関東化学(株)製、試薬一級

(3) 器具

- ・シリカゲルフロリジルー一体型ミニカラム(以下、一体型ミニカラム)(SI/FL(500 mg/500 mg/6 mL)カスタムメイド品)、ジーエルサイエンス(株)製

(4) PCB標準溶液の調製

PCB標準液400 ppmをヘキサン5000で希釈し0.1 ppmのPCB標準溶液を調製した。

2 分析方法及び分析機器

(1) 前処理法

5 g法については、松永ら¹⁾の報告を参考にし、2 g法については、堀ら²⁾の報告を参考に実施した(図1)。

2 g法では、10 mL容丸底試験管に血液2.0 gを量り取り、2 mol/L水酸化カリウム/エタノール溶液5 mLを加え、ボルテックスミキサーを用いてよく混合した。アルカリ分解では、30°Cに設定したアルミブロック恒温槽に装着し、約12時間静置した。

アルカリ分解後の操作は、ヘキサンを3 mLを加えて密栓し、ボルテックスミキサーで十分に混合し

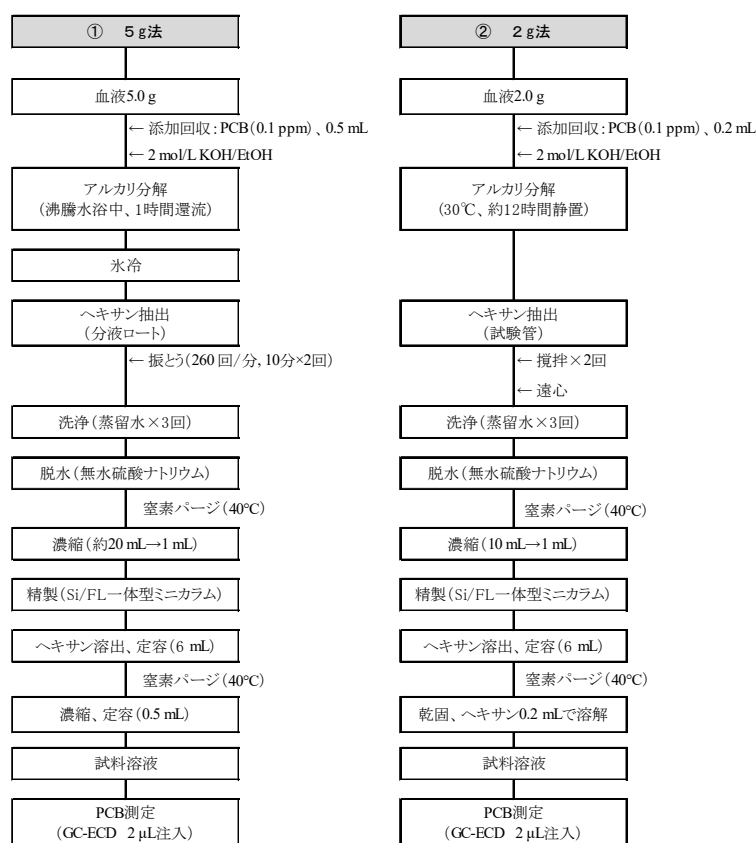


図1 血液中PCB前処理法

た。試料を1000 rpmで5分間遠心分離し、上層のヘキサン層を別の試験管に分取し、この操作を繰り返した。

合わせたヘキサン層(約6 mL)を蒸留水3 mLで3回洗浄した後、無水硫酸ナトリウム約1 gを詰めたカラムを通過させ、溶出液が10 mLになるまでヘキサンを添加した。その後、窒素ガスパージで、約1 mLになるまで濃縮し、5 g法と同様の方法で精製を行った。精製した溶出液を、再度窒素ガスでパージ乾固させ、ヘキサン0.2 mLで再溶解したものを試料とした。

なお、使用する器具類は、事前にアセトンにより洗浄を行ったものを使用した。

(2) 添加回収試験

5 g法の場合、血液5.0 gにPCB標準溶液(0.1 ppm)を血液量の1/10量の0.5 mLを添加して前処理を行い、最終試料溶液を0.5 mLとした。2 g法の場合、血液2.0 gにPCB標準溶液(0.1 ppm)を血液量の1/10量の0.2 mLを添加して前処理を行い、最終試料溶液を0.2 mLとした。

(3) 分析機器、測定条件
表1の方法で行った。

表1 GC-ECD測定条件

GC	GC-2014((株)島津製作所)
検出器	電子捕獲検出器(ECD)
カラム	SiliconOV-1 Uniport HP60/80 mesh (2.1 m x 3.2 mm I.D.)
カラム温度	200°C
注入口温度	250°C
検出器温度	290°C
キャリアガス、流量	N ₂ , 40 mL/min
注入量	2 µL

(4) データ解析

PCBの定量は、数値化法³⁾を参考にピーク高さにより解析を行った。

3 実施項目

2 g法によるPCB分析への影響を確認するため、5 g法と2 g法による比較を、既知濃度PCB添加血液による添加回収試験により行った。各前処理法のクロマトグラムについて標準品とのピーク形状を確認し、真度、精度について妥当性評価を実施した。妥当性評価の性能パラメータは、真度、精度(n=3、1濃度、3日間)とした。

結果と考察

1 2 g法によるクロマトグラムへの影響

ブランク血液に、PCB標準溶液を添加したPCB添加血液を、5 g法及び2 g法により前処理し、GC-ECDにて分析したクロマトグラムの一例を示す(図2)。2 g法の各ピーク形状は、5 g法と同様のピーク形状を示した。また、5 g法では確認されていない妨害ピークは

認められず、2 g法とした場合も、妨害ピークの影響の無い良好なクロマトグラムが得られることが確認された。

2 5 g法と2 g法の各ピークの添加回収率の比較

5 g法及び2 g法の各ピークにおける添加回収率を示す(表2)。2 g法の総ピーク平均値の回収率が98.2%、5 g法では102.5%であり、ほぼ同等であった。また、2 g法の各ピークとも約94~104%と良好な回収率が得られた。

また、パターン判定等に使用しているピークNo.15、No.16、No.20、No.21について、5 g法及び2 g法における真度、併行精度、室内精度を示す(表3)。5 g法及び2 g法のいずれも、医薬品開発ガイドラインの目標⁴⁾(真度:理論値の±15%以内、精度:目標値の±15%以下)を満たしており、良好な結果が得られた。

表2 前処理の精製法の違いによる各ピークの添加回収率の影響比較

ピークNo.	5g法					2g法				
	回収率(%) (n=3/回)					回収率(%) (n=3/回)				
	1回目	2回目	3回目	平均%	RSD%	1回目	2回目	3回目	平均%	RSD%
No.15	102.0	99.3	100.0	100.4	1.4	94.8	94.7	95.6	95.0	0.5
No.16	102.2	100.3	101.0	101.2	1.0	96.3	96.1	96.7	96.4	0.3
No.17	100.2	102.4	96.3	99.6	3.1	92.4	98.1	94.3	94.9	3.1
No.18	100.8	100.0	100.0	100.3	0.5	94.4	93.4	94.1	93.9	0.5
No.19	102.5	100.8	103.2	102.2	1.2	96.2	95.6	96.8	96.2	0.6
No.20	103.9	101.6	102.0	102.5	1.2	99.9	99.2	95.4	98.2	2.5
No.21	101.6	101.0	101.4	101.3	0.3	100.9	98.8	98.8	99.5	1.2
No.22	102.8	105.0	99.4	102.4	2.8	101.2	96.5	98.4	98.7	2.4
No.23	114.2	108.3	103.6	108.7	4.9	100.7	99.4	100.1	100.1	0.6
No.24	112.1	106.4	99.5	106.0	5.9	107.6	95.4	105.2	102.7	6.3
No.25	106.4	101.7	101.3	103.1	2.8	111.4	100.8	100.6	104.3	5.9
総ピーク平均値	104.4	102.4	100.7	102.5	1.8	99.6	97.1	97.8	98.2	1.3

表3 妥当性評価試験結果

	5g法			2g法			評価
	真度(%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)	真度(%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)	
No.15	100.4	2.6	2.6	95.0	1.7	1.9	○
No.16	101.2	2.5	2.8	96.4	1.2	1.4	○
No.20	102.5	3.6	4.0	98.2	2.3	3.1	○
No.21	101.3	3.4	3.9	99.5	1.8	1.9	○
総ピークの平均値	102.5	2.7	2.9	98.2	1.5	1.8	○

まとめ

5 g法と2 g法の比較検討を行い、妥当性評価試験を実施した結果、2 g法は従来法の5 g法と同等の性能を示し、前処理法として実用化できる可能性が示唆された。2 g法の実用化により、油症検診における採血量の少量化が期待できる。

今後は、実検体による検討を蓄積し、実用化に向けた取り組みを進めたい。

参考文献

1) 松永尚子, 他: GC-ECDによる血中PCB分析法

最適化の検討(2020-2021年度), 長崎県環境保健研究センター所報, 67, (2021).

- 2) 堀就英 他: 血液中PCB異性体分離分析におけるアルカリ分解温度の検討, 福岡医誌, 104(4), 152-160(2013)
- 3) 鶴川昌弘, 他: PCBの数値化方法に関する研究, 食衛誌, 14, 415(1973).
- 4) 薬食審査発0711第1号「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析のバリデーションに関するガイドライン」について(2013年7月11日)

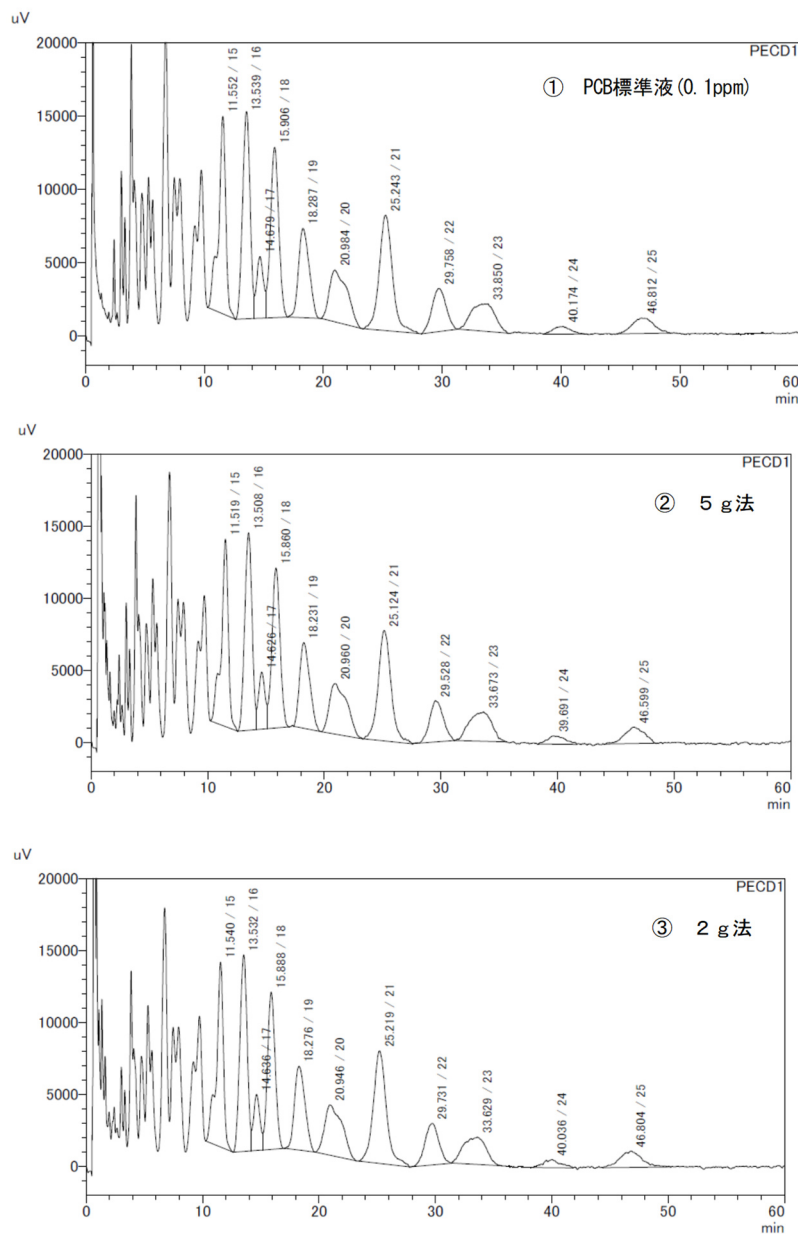


図2 前処理法の違いによるクロマトグラムの比較 (① PCB標準液(0.1 ppm)、②5 g法、③2 g法)