

GUIDANCE FOR INDUSTRY

Use of Nucleic Acid Tests on Pooled Samples from Source Plasma Donors to Adequately and Appropriately Reduce the Risk of Transmission of HIV-1 and HCV

This guidance represents FDA's current thinking on this topic. It does not create or confer any rights for or on any person and does not operate to bind FDA or the public. An alternative approach may be used if such approach satisfies the requirements of applicable statutes and regulations.

I. INTRODUCTION

The purpose of this guidance document is to inform you, all establishments, engaged in the manufacture of Source Plasma as defined in 21 CFR 640.60: 1) that we, the Food and Drug Administration (FDA), have approved nucleic acid tests (NAT) to identify human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and hepatitis C virus (HCV) in Source Plasma donations; 2) that we believe that a licensed nucleic acid test to identify HIV and HCV in Source Plasma donations, when available, should be used to adequately and appropriately reduce the risk of transmission of these communicable diseases; and 3) that we expect that a licensed nucleic acid test to identify HIV-1 and HCV in Source Plasma donations will be available after establishments submit biological license application (BLA) supplements providing for the use of an approved nucleic acid test, and after we have approved such supplements. We recommend that you submit pre-approval supplements in accordance with 21 CFR 601.12(b) by June 1, 2002.

II. BACKGROUND

FDA's final rule (66 FR 31146, June 11, 2001) entitled "Requirements for Testing Human Blood Donors for Evidence of Infection Due to Communicable Diseases" becomes effective on December 10, 2001. Section 610.40(b) of that regulation provides that manufacturers "must perform one or more screening tests to adequately and appropriately reduce the risk of transmission of communicable disease" (66 FR 31162). As we noted in the preamble to the final rule, the standard for adequate and appropriate testing will change as new testing technology is approved by FDA. We explained, "we intend to regularly issue guidance describing those tests that we believe would adequately and appropriately reduce the risk of transmission of communicable disease agents" (66 FR 31149).

The availability of nucleic acid testing to identify HIV and HCV will change the testing protocol that should be used to adequately and appropriately reduce the risk of transmission of those diseases. We believe that, when nucleic acid testing is available, it may no longer be appropriate to rely solely on other tests for HIV-1 and HCV, such as those for antibody and HIV-1 p24 antigen; those tests, without nucleic acid testing, may not be adequate and

Draft – Not for Implementation

appropriate. FDA may also consider not requiring HIV-1 p24 testing of Source Plasma if establishments implement NATs that are more sensitive than HIV-1 p24 tests.

Transmission of HIV and HCV by blood and blood products has been dramatically reduced as a result of implementation of sensitive tests for viral antibody and antigen, and in the case of plasma derivatives, the use of effective virus removal and inactivation methods. Sources of remaining risk for transfusion transmission and to plasma pools include window period donations, viral variants, atypical seroconversion and laboratory testing error (Ref 1, 2). A recent report found that paid plasma donors were more likely to donate potentially infectious units (Ref. 3). However, initiatives by the source plasma industry, including NAT testing under IND, greatly reduced the chances of these units entering the pools for manufacturing (Ref 3). Although effective viral clearance methods are in place for almost all plasma derivatives, measures to close the window period are expected to further reduce the residual risk of HIV or HCV infectious units entering plasma pools. In 1994, we held a workshop to explore the potential application of nucleic acid based methods to donor screening for HIV. It was felt that although these methods were clearly sensitive, they were not ready for implementation on a large scale at that time. However, the workshop fueled interest in developing systems for implementation of nucleic acid methodology for testing blood and plasma donations.

Subsequently, industry in collaboration with the National Institutes of Health and FDA actively pursued development of NAT systems for HIV-1 and HCV. Due to the cost and labor intensity of NAT, testing of minipools of plasma rather than individual donations seemed to be more feasible and by 1997 some manufacturers in Europe had voluntarily instituted NAT on pooled samples of plasma. At about that time, the European Union issued a directive that by July 1, 1999, HCV ribonucleic acid (RNA) testing would be required in Europe for all plasma for fractionation and that the requirement for HIV-1 RNA testing would follow at a later date. The European directive, which applied to both Source Plasma and recovered plasma, provided impetus to the rapid development of NAT for all blood and plasma donations. In November 1999, FDA announced the availability of the draft document entitled "Guidance for Industry: Application of Current Statutory Authority to Nucleic Acid Testing of Pooled Plasma" for public comment on FDA's approach to regulating nucleic acid testing for infectious disease agents when intended for use in blood donor screening and/or manufacturing of blood products. We also provided the industry with guidance on assay validation and regulatory strategies for licensure of NAT.

We permitted the clinical study of this investigational technology on a large scale. Such large-scale studies were thought to be necessary to demonstrate the efficacy of NAT as a donor screen primarily because the frequency of window period donations is low. Clinical studies to evaluate NAT were initiated in 1997 under approved Investigational New Drug applications (INDs). Data collected under these INDs would support approval of subsequent BLAs. We have worked with manufacturers toward validation of NAT assays for donor screening.

III. AVAILABILITY OF LICENSED NAT FOR SCREENING OF SOURCE PLASMA DONORS

On September 18, 2001, we licensed the first pooled sample NAT system for the detection of HIV-1 and the first pooled sample NAT system for the detection of HCV RNA in Source Plasma donations. National Genetics Institute developed these test systems for screening pooled Source Plasma donations. On the same day, we approved a prior approval supplement submitted by Alpha Therapeutic Corporation, which authorized Alpha to implement the new testing technology. Other manufacturers are currently investigating other NATs for Source Plasma collections.

IV. IMPLEMENTATION

HIV-1 and HCV NAT of Source Plasma involves the use of complex pooling and testing systems. We recognize that the testing technology is not universally available, and that establishments need time to implement these complex systems. Therefore, we recommend that Source Plasma manufacturers submit prior approval supplements to implement HIV-1 and HCV NAT in their establishments by June 1, 2002. You should not implement the testing change until we have reviewed and approved your prior approval supplement. You may continue NAT testing under IND while we review your prior approval supplement. After we approve the supplement for use of a licensed HIV-1 and HCV, the establishment may continue use of alternative NAT testing under an approved IND provided that the manufacturer implements the approved test at the same time. In the meantime, manufacturers who wish to pursue validation of in-house tests should submit INDs and BLAs as appropriate.

V. REFERENCES

1. M.P. Busch and S. H. Kleinman, Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors for Transfusion-Transmitted Infectious Diseases, *Transfusion* 2000; 40:143-159.
2. S.H. Kleinman and M.P. Busch, The Risks of Transfusion-Transmitted Infection: Direct Estimation and Mathematical Modeling, *Bailliere's Clinical Haematology* 2000; 13(4):631-649.
3. General Accounting Office, Blood Plasma Safety: Plasma Product Risks Are Low If Good Manufacturing Practices Are Followed, GAO/HEHS-98-205.

平成 13 年度 厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

医療用ポリ塩化ビニル製品に残留する化学物質の同定

| | | |
|-------|-------|--------|
| 分担研究者 | 星薬科大学 | 中澤 裕之 |
| 研究協力者 | 星薬科大学 | 井之上 浩一 |
| | 星薬科大学 | 吉村 吉博 |

研究要旨

血液製剤の保存や輸血に利用されているポリ塩化ビニル製血液バッグ等に残留する化学物質の同定を目的に、測定法を構築した。本試験では、可塑剤、酸化防止剤等の GC/MS オリジナルライブラリを作成し、保持時間、マススペクトル、ピーク形状の情報をもとに正確な同定を実施した。その結果、フタル酸ジエチルヘキシル、ノニルフェノール、BHT、2-エチルヘキサノール等が同定確認された。

A. 研究目的

現在の医療用具には、多種多様な塩化ビニル(PVC)製品が利用されている。1960年代位まではガラスやゴム製品の医療用具が使用されていたが、化学工業の発達に伴い、食塩からカセイソーダを作る際、発生する塩素を利用して PVC 製品が作られるようになった。1960～1970 年にかけてベトナム戦争時には PVC 製輸血用血液バッグ等が利用され、一部生体影響に関する報告等が発表されたが、詳細なヒト生体影響評価は十分に検討されていない。特に医療用具の柔軟性、透明性、耐久性、酸素遮断性、電気絶縁性等の作用を付与させるために使用される添加剤については、安全性評価の見直しが必要と思われる。又、軟質 PVC 製品に残留する添加剤、分解物、未反応物質等の

溶出挙動や生体影響については十分に解明されていない。

安全な血液製剤を得るためには、その保存血液バッグやチューブにどのような残留化学物質が存在するのかを把握する必要性がある。

そこで、本研究においては、当該製品中の残留化学物質の確認を目的として、GC/MS による同定分析法を構築し、実試料の分析に適用した。

B. 研究方法

B.1. 試薬・試料

今回使用した PVC 製医療用器具 4 社 6 製品 16 種類の部位を用いた。

【添加剤の標準品】

以下に記した資料を参考に、可塑剤、酸化防止剤を主とする添加剤を標準化学物質として用いた（和光純薬社製、

関東化学社製，東京化成社製，
ALDORICH社製）。

【溶媒】

アセトン：溶解液及び洗浄液として，
関東化学社製（フタル酸エステル試験
用）を使用した。

ヘキサン：洗浄液として，関東化学社
製（フタル酸エステル試験用）を使用
した。

シクロヘキサン：試験溶解液として，
和光純薬社製（残留農薬試験用）を使
用した。

2-プロパノール：試験溶液として，和
光純薬社製（高速液体クロマトグラフ
用）を使用した。

B.2. 分析装置・条件

【GC/MS 装置】

HEWLETT PACKARD HP 6890 Series GC
System

HEWLETT PACKARD 5973 Mass Selective
Detector

【測定条件】

カラム：J&W Scientific, DB-1
capillary column (30 m×250 μm I.D.,
film thickness: 0.1 μm) (Folsom, CA,
USA).

カラム温度：50 °C—20 °C/min—300 °C
(12.5 min)

注入口温度：250 °C

キャリアーガス：He, 0.9 mL/min

注入量：1 μL

測定モード：SCAN(M/Z 40-700)

ランタイム：22.5 min

B.3. ライブラリ作成方法

各添加剤標準品 0.05 mg を秤量し，
アセトンで溶解して 1000 ppm の溶液
を調製した。本標準溶液をアセトンで
希釈して，1 ppm 又は 10 ppm とした。
本試験溶液を GC/MS-SCAN により分析
し，GC/MS のデータ解析機能を利用し
て，測定したクロマトグラムとマスス
ペクトルから，測定添加剤の標準品と
して登録した。登録項目は，保持時間，
マススペクトル，ピーク形状等である。
同定方法は，添加剤専用オリジナルラ
イブラリ及び NIST 98 を利用した。

B.4. 試験溶液の調製

試料(PVC 製医療用具)0.25 g に，シ
クロヘキサン/2-プロパノール(1:1，
V/V)混液 5 mL を加え，常温で一晩静
置後，これらを抽出液とした。抽出液
2 mL を 40 °C の水浴上で窒素気流下約
0.2 mL まで濃縮し，アセトンを加えて
2 mL に定容して，これを試験溶液とし
て使用した。

B.5. 定量分析

絶対検量線法により，ピーク面積を
利用して，濃度範囲 0.1-50 ppm にお
いて，各同定された化学物質の検量線
を作成し，定量分析に用いた。

C. 研究結果

GC/MS オリジナルライブラリの登録
標準溶液を使用して作成した添加剤
専用オリジナルライブラリの結果を
Table 1 に示す。フタル酸系として 22

種類, アジピン酸系として 11 種類, その他 6 種類, 合計 39 種類を登録した。

実試料の SCAN 測定結果を Fig.1 に示す。同定結果は Table 2 に示すようになり, ◎は添加剤専用オリジナルライブラリ, ○は NIST 98 による同定となる。このライブラリを使用することにより合計 7 種の化学物質を同定することができた。

同定された化学物質の内, 特に検出量の高かった Di-2-Ethylhexyl Phthalate(DEHP), Butylated Hydroxytoluene(BHT), 2-Ethylhexanol, 4-Nonylphenol の 4 物質について検量線を作成した。いずれの検量線においても相関係数 0.999 と良好な直線性を得る事ができ, この検量線を用いて, 各化合物を定量した (Fig.2)。

D. 考察

未知物質の同定を行う際, GC/MS 『NIST 98』のライブラリを使用するのが, 一般的である。しかし, マススペクトルのみから同定することはしばしば困難を伴う。そこでマススペクトル(フラグメントイオン)と保持時間を兼ね備えた添加剤専用オリジナルライブラリを作成することで, 同定能力及び効率を高めることができた。本法を利用することにより, プラスチック可塑剤, 酸化防止剤の同定が可能となった。

実試料について SCAN 測定した結果, 7 種の物質を同定することができた。

このうち, DEHP 及び 2-Ethylhexanol は全ての製品から検出された。DEHP は, 生殖系への影響が懸念されており, IARC の発癌性評価でグループ C に属す化合物である。2-Ethylhexanol は, DEHP の主要な代謝物の一つとして項報告されているため, PVC 製品に添加された DEHP の分解物である可能性が高い。Cyclohexanone は, ゴムの耐薬品として利用され, 毒性として長期反復投与により皮膚炎が生じるが, 発癌性, 生殖毒性は認められていない。Cyclohexanol もゴムの耐薬品として利用されているが, 特に毒性に関する報告はない。BHT は, 酸化防止剤として, 汎用されている化合物である。4-Nonylphenol は, 界面活性剤や酸化防止剤の主原料として利用されているが, 昨年, 環境省で, 内分泌攪乱化学物質として発表されている。

E. 結論

PVC 製医療用具は, 血液保存や輸血行為等に多く利用されているが, 近年, FDA より, PVC から溶出する DEHP のリスクアセスメントが実施された¹⁾。又, S.Hill らの報告²⁾では, PVC 製チューブから溶出する恐れのある化合物を再評価する必要があることを提示している。しかし, PVC 製医療用具に残留する化合物の詳細な測定結果に関する報告はない。

本研究は, プラスチック製医療用具の精度の高い安全性評価を実施する上で, 基礎的かつ重要な研究である。今回の研究結果からのモニタリング

や生体影響評価を実施する必要性を有する化学物質を以下のように選択できた。

{ フタル酸ジエチルヘキシル
2-エチルヘキサノール
ノニルフェノール
BHT

本化合物に関しては、安全な血液製剤を供給するうえで、早急にモニタリングや生体影響評価等を実施する必要性が認められた。

参考文献及び参考資料

- 1) FDA(<http://www.fda.gov/cdrh/newpg.html>.)
- 2) S.Hill et al. *Clinica Chimica Acta* 304 (2000) 1-8
- 3)以下の資料を参考資料として示めす。『13901の化学商品』 化学工業日報社、食品衛生雑誌 40, 189-197 (1999), 『化学大辞典』 東京化学同人, 『衛生試験法 注解 2000』日本薬学会編, 『INDIRECT FOOD ADDITIVES and POLYMERS』 LEWIS PUBLISTHERS

学会発表

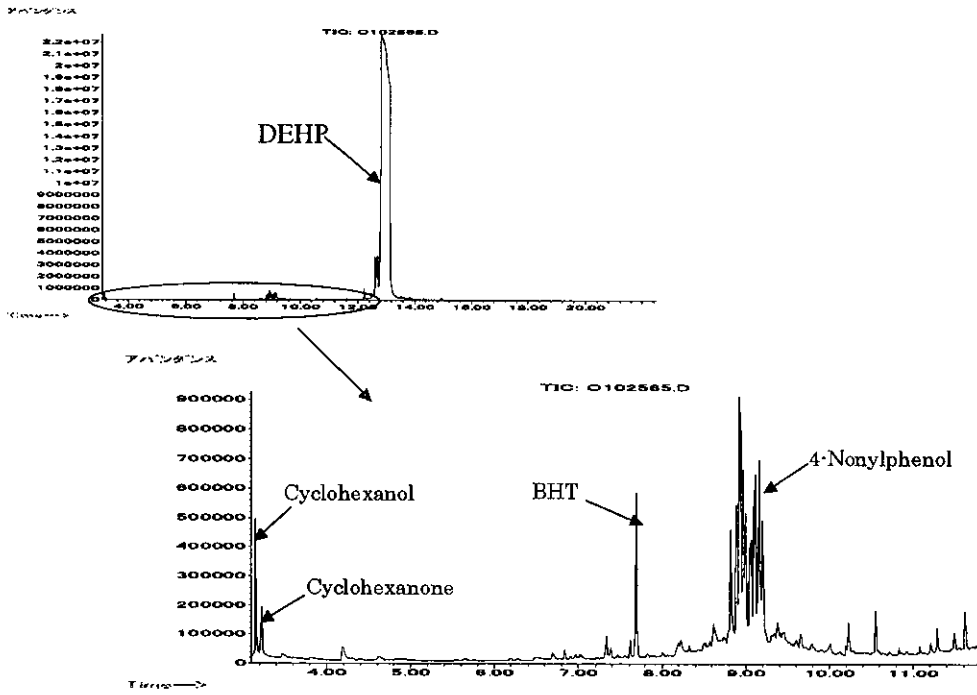
- 1)第122年会日本薬学会：

ポリ塩化ビニル製医療用具の安全性評価(第1報):GC/MSによる点滴用チューブ中の残留物質添加剤の分析 井之上浩一, 奥村紘代, 吉村吉博, 中澤裕之, 伊藤裕子, 岡尚男, 月岡忠, 寺澤潤一, 牧野恒久

発表論文

- 1) “Characterization of the estrogenic containers in medical polyvinyl- chloride tubing by gas chromatography - mass spectrometry and estrogen receptor binding assay”

Koichi Inoue, Hiroyo Okumura, Tae Higuchi, Yoshihiro Yoshimura and Hiroyuki Nakazawa (*Clinica Chimica Acta*)投稿予定



**Fig.1 Chromatograms of containers in medical PVC tubing
by GC/MS-SCAN**

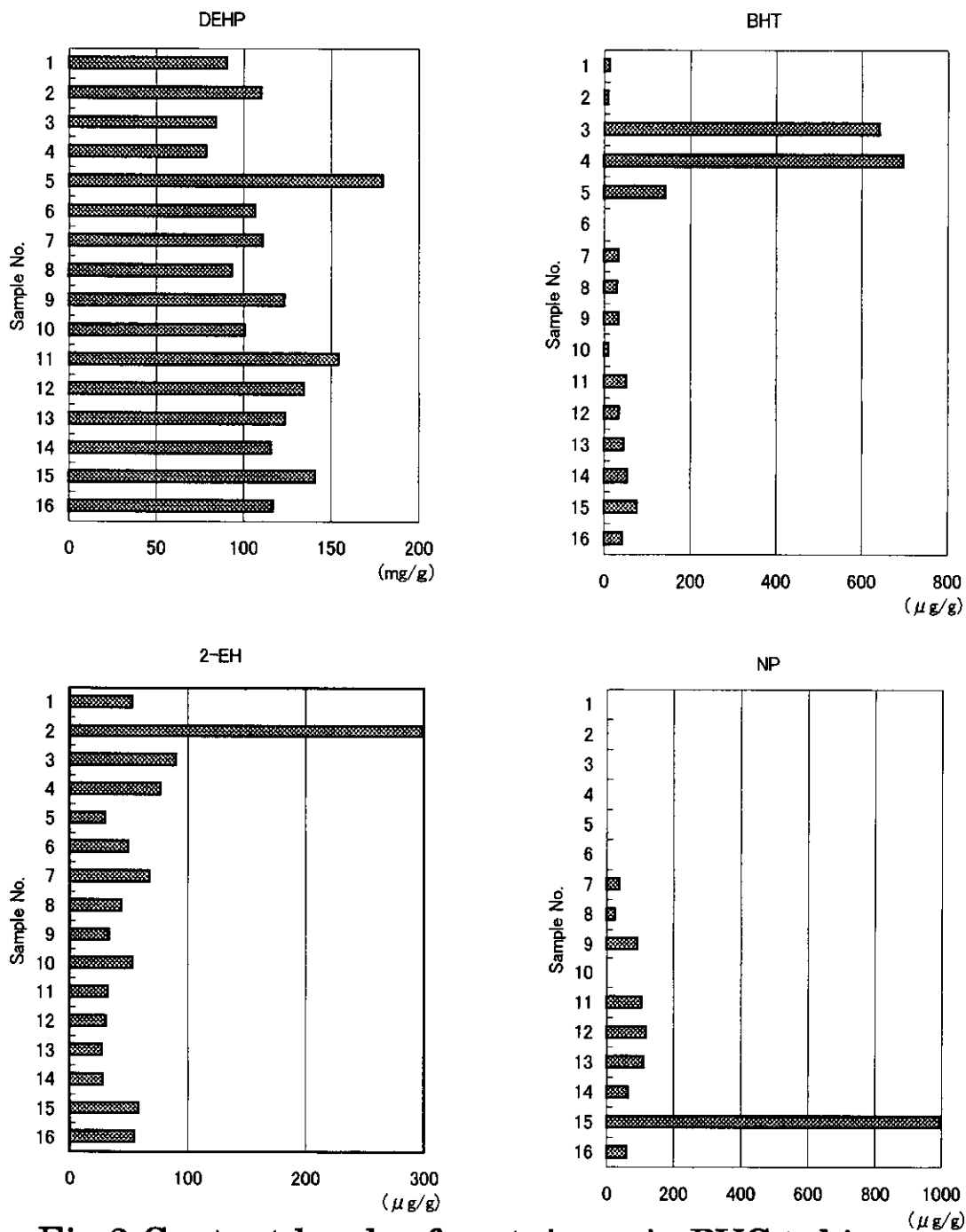


Fig.2 Content levels of containers in PVC tubing

Table 1 GC/MS ライブラリ登録化合物

フタル酸系

| 登録番号 | 標準溶液名 | 濃度(ppm) | リテンションタイム(min) |
|------|---------------------------|---------|----------------|
| 1 | Di-2-ethylhexyl phthalate | 1 | 12.9 |
| 2 | Benzyl n-butyl phthalate | 1 | 12.2 |
| 3 | Diethyl phthalate | 1 | 8.3 |
| 4 | Dimethyl phthalate | 1 | 7.4 |
| 5 | Dicyclohexyl phthalate | 1 | 12.9 |
| 6 | Disooctyl phthalate | 10 | 12.6-13.6 |
| 7 | Dihexyl phthalate | 10 | 11.5-12.1 |
| 8 | Diisononyl phthalate | 10 | 13.6-14.7 |
| 9 | Di-n-hexyl phthalate | 1 | 12.1 |
| 10 | Di-n-pentyl phthalate | 1 | 11.2 |
| 11 | Mono-n-pentyl phthalate | 10 | 6.6 |
| 12 | Diisobutyl phthalate | 1 | 9.8 |
| 13 | Diallyl phthalate | 1 | 9.2 |
| 14 | Di-n-butyl phthalate | 1 | 10.3 |
| 15 | Di-n-propyl phthalate | 1 | 9.3 |
| 16 | Mono-n-benzyl phthalate | 10 | 6.5 |
| 17 | Disodacyl phthalate | 10 | 14.3-16.0 |
| 18 | Di-n-octyl phthalate | 1 | 13.8 |
| 19 | Dinonyl phthalate | 10 | 13.8-14.9 |

アジピン酸系

| 登録番号 | 標準溶液名 | 濃度(ppm) | リテンションタイム(min) |
|------|---------------------------|---------|----------------|
| 22 | Diethyl adipate | 1 | 12.2 |
| 23 | Disodacyl adipate | 10 | 13.3-15.0 |
| 25 | Diethyl adipate | 1 | 6.9 |
| 26 | Diisononyl adipate | 10 | 12.9-13.8 |
| 27 | Dimethyl adipate | 1 | 5.9 |
| 28 | Diisopropyl adipate | 1 | 7.3 |
| 29 | Dibutyl adipate | 1 | 9.2 |
| 31 | Disobutyl adipate | 1 | 8.8 |
| 32 | Di-(2-ethylhexyl) adipate | 1 | 12.3 |
| 33 | Di-n-propyl adipate | 1 | 8.1 |
| 34 | Dibenzyl adipate | 1 | 13 |

その他

| 登録番号 | 標準溶液名 | 濃度(ppm) | リテンションタイム(min) |
|------|--------------------------|---------|----------------|
| 30 | Tributyl citrate | 1 | 11.6 |
| 35 | Triethyl citrate | 1 | 9.1 |
| 36 | 1-Octadecene | 10 | 9.3 |
| 37 | Nonanal (Nonyl aldehyde) | 10 | 4.8 |
| 38 | 1-Nonylphenol | 10 | 8.8-9.3 |
| 39 | 2-Ethylhexanol | 1 | 4.2 |

Table 2 GC/MS による同定結果

| サンプル 番号 | シクロヘキサ ノール | シクロヘキサ ノン | 2-EH (42min) | Nbriane | EH (177min) | 4-FP (88-93min) | DEHP (179min) |
|------------|---------------|--------------|--------------|---------|-------------|-----------------|------------------|
| 1 | ○ | ○ | ◎ | ◎ | ◎ | | ◎ |
| 2 | | | ◎ | | ◎ | | ◎ |
| 3 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | | ◎ |
| 4 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | | ◎ |
| 5 | ○ | ○ | ◎ | | | | ◎ |
| 6 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | | ◎ |
| 7 | | | ◎ | | ◎ | ◎ | ◎ |
| 8 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | ◎ | ◎ |
| 9 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | ◎ | ◎ |
| 10 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | | ◎ |
| 11 | | | ◎ | | ◎ | ◎ | ◎ |
| 12 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | ◎ | ◎ |
| 13 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | ◎ | ◎ |
| 14 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | ◎ | ◎ |
| 15 | ○ | ○ | ◎ | | ◎ | ◎ | ◎ |
| 16 | | | ◎ | | ◎ | ◎ | ◎ |

平成 13 年度厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

採血基準に関するスクリーニング開発

一 血液バッグ保存血液中のテトラヒドロフラン及び 2-エチル-1-ヘキサノールの分析法
の開発

分担研究者 宮崎 豊 愛知県衛生研究所・所長

研究協力者 猪飼誉友・愛知県衛生研究所

近藤文雄・愛知県衛生研究所

伊藤裕子・愛知県衛生研究所

後藤智美・愛知県衛生研究所

岡 尚男・愛知県衛生研究所

松本 浩・愛知県衛生研究所

要旨

血液バッグから保存血液中への溶出が疑われるテトラヒドロフラン（THF）および 2-エチル 1-ヘキサノール（2-EH）の実態を調査するため、血液中に含まれるこれら化合物の分析法を検討した。その結果、試料を飽和食塩水で希釈し、内部標準物質としてそれぞれの安定同位体を用いて、ヘッドスペース-ガスクロマトグラフ/質量分析（GC/M）により分析するという方法を確立した。人血清へ THF および 2-EH を 0.1ppm 添加した場合の回収率（CV 値）はそれぞれ 97.6%（2.0%）、89.2%（2.2%）で、1.0ppm 添加した場合はそれぞれ 99.8%（0.3%）、95.0%（0.7%）と良好な結果が得られた。また、検出下限値は両化合物とも 1ppb であった。この方法を用いて、血液バッグに採取された後、冷蔵保存した人血液（n=1）を経時的に分析したところ、血漿より THF および 2-EH がそれぞれ最高で 26.8ppm および 1.85ppm 検出されるとともに、これら化学物質の濃度は保存時間と共に増加する傾向が認められた。

A. 目的

昨今の医療現場ではプラスチック製の器具や容器が随所で使用されており、これらから溶出する様々な化学物質への患者の暴露が問題となっている。なかでも、輸血用

血液や血液製剤の保存や輸送に用いられる血液バッグには、可塑剤として大量に使用されているフタル酸ジエチルヘキシル（DEHP）以外にも製造過程で使用された有機溶剤類が残留している可能性があり、こ

れらが保存血液などの内容物に溶出することが懸念されている。

我々が豚血液を用いて行なった予備調査の結果から、献血用の血液バッグからはトルエンやキシレンなどとともに、テトラヒドロフラン (THF) および 2-エチル-1-ヘキサノール (2-EH) が溶出し、保存 20 日後の豚血清中の濃度は、トルエンやキシレンが最高でも数十 ppb であったのに対し、THF は数十 ppm、2-EH は数 ppm にまで達することが判明した。これらの結果から、血液バッグからの溶出が強く疑われている THF および 2-EH について、人血液を用いた同様な調査を行なうことや、血液センターに保存されている輸血用血液や血液製剤中の残留実態、さらには、これら化合物の生体内での消長や、血液バッグへの混入原因の解明などが必要であると考えられた。そこで今回、血液や血清などの生体試料から、THF および 2-EH を精度よく且つ高感度に分析する方法として、安定同位体を内部標準物質として用いたヘッドスペース GC/MS 法を開発するとともに、その方法を用いて血液バッグ中に保存した人血液中の THF および 2-EH の分析を試みた。

B. 研究方法

1. 試薬および材料

THF および 2-EH の標準品には和光純薬製を、また、内部標準物質として使用したテトラヒドロフラン-d8 (THF-d8) および 2-エチル-1-ヘキサノール-d17 (2-EH-d17) には CDN Isotopes 社製 (ケベック, カナダ)

を、メタノールには和光純薬製残留農薬分析用を、その他の試薬については和光純薬製の特級試薬を使用した。血液バッグについては、JMS 社製 S-200 (CPD 液 28mL 入) および川澄製 カーミ C 液 (CPD 液 28mL 入) の 2 種類を用いた。

2. 試料の調製

赤十字名古屋血液センターにて 2 種類の血液バッグ各 1 個に被験者 (1 名) の血液約 200mL を採取し、愛知県衛生研究所の冷蔵庫 (4°C) に保存した。採取直後、1、2 および 4 日後に、各バッグから血液 10mL を採取し、3000rpm で 10 分間遠心分離して得られた上層 (血漿) および下層 (赤血球液) をそれぞれ分析用試料とした。

3. 分析条件

ヘッドスペース条件 装置 : Tekmer 7000 (Tekmer)、バイアル容量 : 22mL (Chromacol, CV-22)、バイアル加熱条件 : 85°C (20 分)、バイアル振とう機能 : 使用 (Power 5:3 分)、サンプルループ容量 : 1mL、サンプルループ温度 : 150°C、トランスファーライン温度 : 160°C。

GC/MS 条件 装置 : AUTO MASS SYSTEM II (日本電子) カラム : Vocol (0.25 mm i.d. x 60 m、膜厚 : 1.5 μ m、Sperco) カラム温度 : 40°C で 4 分間保持し、230°C まで毎分 10°C で昇温後、230°C で 5 分間保持。イオン源温度 : 210°C イオン化 : EI、イオン化電圧 : 70 eV、検出方法 : スキャン法 (m/z 41-260) または SIM 法、モニターイオン : THF (m/z 71)、2-EH (m/z 112)、THF-d8 (m/z 80)、2-EH-d17 (m/z 128)

4. 分析操作

測定 希釈水 14.5mL が入ったヘッドスペースバイアルに、試料 0.5mL および内部標準溶液 (THF-d8 および 2-EH-d17 の 250ppm メタノール溶液) 1 μ L を加えた後、テフロン張りのシリコンゴムセプタムおよびアルミシールで密封した。このバイアルをヘッドスペースオートサンプラーにセットし、ヘッドスペース-GC/MS により測定を行なった。

検量線および定量 ヘッドスペースバイアルに希釈水 15mL、混合標準溶液 (THF および 2-EH のメタノール溶液、濃度：50 または 1000ppm) 1. 10 μ L、および内部標準溶液 1 μ L を加え、試料と同様に測定した。そこで得られた測定対象物質とその安定同位体内部標準の面積比により検量線を作成し、それを用いて試料中の測定対象物質濃度を算出した。

希釈水 300 $^{\circ}$ C で 5 時間加熱処理した食塩と Milli Q 水とで調製した飽和食塩水に対し、高純度ヘリウムを 60 $^{\circ}$ C で加温しながら 5 分間ばっ気 (約 1L/分) した後、超音波水槽中でアスピレーターにより脱気するという処理を 3 回繰り返すことにより揮発性の溶質を除去した溶液を使用した。

C. 結果と考察

1. 分析法の確立

今回、分析の対象とした THF および 2-EH は揮発性化合物であるため、これらの物質を精度良く且つ高感度分析するためには、ヘッドスペース-GC/MS 法が適当であると考

えられた。ヘッドスペース法は、試料溶液を入れて密封したバイアルを加熱、振とうし、試料に含まれる揮発性の化合物をバイアル上部のヘッドスペースと呼ばれる気相に気化、濃縮した後に、その気相の一部を GC に導入するという方法である。この方法を用いれば、試料溶液中の揮発性化合物を選択的に、しかも効率的に分析することが可能であるが、この方法を用いて血液や血清の分析を試みたところ、以下に述べるような問題点が明らかとなり、それらを解決するための検討を行なった。

血液や血清をバイアルに入れて加熱、振とうすると、それらは激しく発泡し、ヘッドスペース部分の空間が狭くなるため、オートサンプラーを用いての自動分析が困難であった。そこで、我々は試料を希釈する方法を種々検討した結果、試料を飽和食塩水で 15 倍以上に希釈することにより試料の発泡が効果的に抑制され、ヘッドスペースオートサンプラーを用いた GC/MS 自動分析が可能となった。

一方、血液や血清には脂質など極性の低いマトリックスが多く含まれており、これらのマトリックスはバイアル内での目的物質の気化を抑制するため、表 1 に示したように十分な回収率が得られないだけでなく、ばらつきも大きくなるなどの問題があり、精度の高い分析が困難であった。このような場合には、分析対象物質と揮発性などの物理的性質が類似している安定同位体を内部標準に用いて測定を行ない、回収率を補正する方法が一般的に用いられる。そこで、

THF および 2-EH それぞれの内部標準として THF-d8 および 2-EH-d17 を用いて人血清からの回収率を測定したところ、表 2 に示したように、満足すべき回収率および再現性を得ることができた。

次いで、GC/MS による THF および 2-EH の分離、検出条件の検討を行なった。その結果、GC 固定相に揮発性物質分離用のキャピラリーカラムである Vocol を用い、質量検出を SIM モードで行なうことにより、試料中の濃度で 1ppb の THF および 2-EH を検出することが可能となった。定量に用いるイオンとしては図 1 のマススペクトル上に示したように、THF に m/z 71 (内部標準 THF-d8 : m/z 80) を、2-EH には m/z 112 (内部標準 2-EH-d17 : m/z 128) を選択した。図 2 に、スキャンモードで測定した標準品のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示した。この条件を用いれば約 30 分で両物質を分離、検出できるだけでなく、トルエンやキシレンなどの有機溶剤類やパラジクロロベンゼンなど他の揮発性化合物の同時分析も可能であった。

以上の検討により確立した分析法を図 3 に示した。この方法で分析者が行う操作は、試料、希釈液および内部標準液をバイアルに入れてキャップを付し、ヘッドスペースオートサンプラーにセットすることのみである。その後のバイアルの加熱、振とう、GC へのインジェクションなどの操作は全て自動化されているため、50 試料の処理に要する時間は 1 時間足らずであり、GC/MS 分析等の時間を含めても 2 日程度で 50 試料の

全分析を終えることが可能である。以上のことより、この方法は迅速性および簡便性を兼ね備えているだけでなく、精度管理の面からも優れた方法であると評価できる。

2. 血液バッグに保存された人血液の分析

本研究で確立された分析法の評価、および、来年度以降に予定している溶出挙動調査等の予備段階として、血液バッグに採取し、冷蔵保存した人血液の分析を実施した。赤十字血液センターにおいて 2 種類の血液バッグに約 200mL ずつ採取された同一被験者の血液を、採血直後、1、2 および 4 日後に 10mL ずつ分取し、遠心分離によって血漿と赤血球液に分けた後、血漿及び赤血球液のいずれをも試料として用い、THF および 2-EH の分析を行なった。その際得られた人血液の TIC とマスキロマトグラムを図 4 に示した。それぞれのクロマトグラム上には、定量の妨害となるようなピークは認められなかったことから、本法を用いれば血液試料中の両化合物の高精度な定量が可能であることが示唆された。

表 3 には、2 種類のバッグに採取し冷蔵保存された人血液を経時的に血漿および赤血球液に分離した後、それぞれに含まれる THF および 2-EH の濃度を測定した結果を、バッグに封入されていた抗凝固剤水溶液 (CPD 液) の分析結果とともに示した。

THF に関しては、川澄製バッグに保存された血液の濃度 (最高 26.8ppm、血漿) が JMS 製に保存されたもの (最高 0.85ppm、血漿) よりも 30 倍以上高く、メーカーにより溶出量が大きく異なることが明らかとなった。

濃度の経時変化は、いずれのバッグも非常に緩慢であり、採取直後の濃度が維持されるか、僅かに増加する傾向が認められた程度であった。これは、バッグに封入されていた CPD 溶液中の THF が非常に高濃度（川澄製 109 ppm、JMS 製 8.5 ppm）であった可能性が高いことから判断すると、試料から検出された THF のほとんどが CPD 液に溶け込んでいたものであり、バッグの樹脂から溶出した THF の量は少なかったことを示唆するものと考えられた。また、血漿と赤血球液中の濃度がほぼ同レベルにあったことから、保存する内容物が異なっても、検出される THF 濃度にはそれほど差が生じないことが示唆された。

2-EH に関しては、JMS 製のバッグに保存された血液中の濃度（最高 1.85ppm、血漿）が川澄製のバッグに保存されたもの（最高 1.48ppm、血漿）よりも幾分高い程度であり、メーカー間の違いは小さかった。しかしながら、採血直後の濃度が保存 4 日後にはバッグのメーカー、保存血液の成分を問わず、いずれにおいても約 5 倍に上昇していたこと、血漿中の濃度が赤血球液中濃度よりも全期間を通じて 6.11 倍も高いなど、THF とは異なった挙動が認められた。さらに注目すべきことは、保存期間が増すと共に保存血漿中の 2-EH 濃度が CPD 液の濃度より高くなったことから、2-EH の血液バッグからの溶出が確認されたことである。このバッグからの溶出により、試料中の 2-EH 濃度は保存期間と共に増大して行ったものと考えられた。また、2-EH は、血液バッグに使

用されている可塑剤である DEHP が血液に含まれるリパーゼなど酵素の作用で加水分解される際に生成される分解物でもあることから、DEHP の分解も経時的な 2-EH 濃度増加の要因の一つとも考えられる。一方、血漿および赤血球液の濃度に約 10 倍という大きな差があったことから、事例を増して検討を加えるとともに、その他血小板等の血液成分の保存に際しての 2-EH の溶出に関しても検討を加える必要があるものと考えられた。

D. 結論

ヘッドスペース-GC/MS 法による血液中の THF および 2-EH の分析法を確立した。この方法は、安定同位体内部標準法を採用しているため、良好な回収率および再現性（0.1 および 1.0 ppm 添加における血清からの回収率：89.2、99.8%、CV 値：0.3、2.2%）が得られ、操作性（50 試料の処理に要する時間：1 時間以内）も良好であった。これより本法は、血液バッグから保存血液中に溶出する THF および 2-EH の分析に有用と考えられた。

本分析法を用いて、血液バッグに採取し、冷蔵保存した特定一個人の血液の分析を行った。その結果、THF および 2-EH がそれぞれ最高で 26.8 および 1.85ppm（いずれも血漿中の濃度）検出され、2-EH 濃度が保存期間と共に増加する傾向や、血液バッグのメーカーにより溶出量に大きな違いのあること、さらには、保存内容物（血漿と赤血球液）による違いも存在した。これら今年

度の研究で得られた結果は、来年度以降に
予定している溶出挙動調査や保存血液など
の実態調査を実施するための基礎データと
して役立つものと考えられた。

謝辞

本研究を行なうにあたり、血液バッグへ
の採血などで協力いただきました日本赤十
字社 名古屋血液センターに深謝いたしま
す。

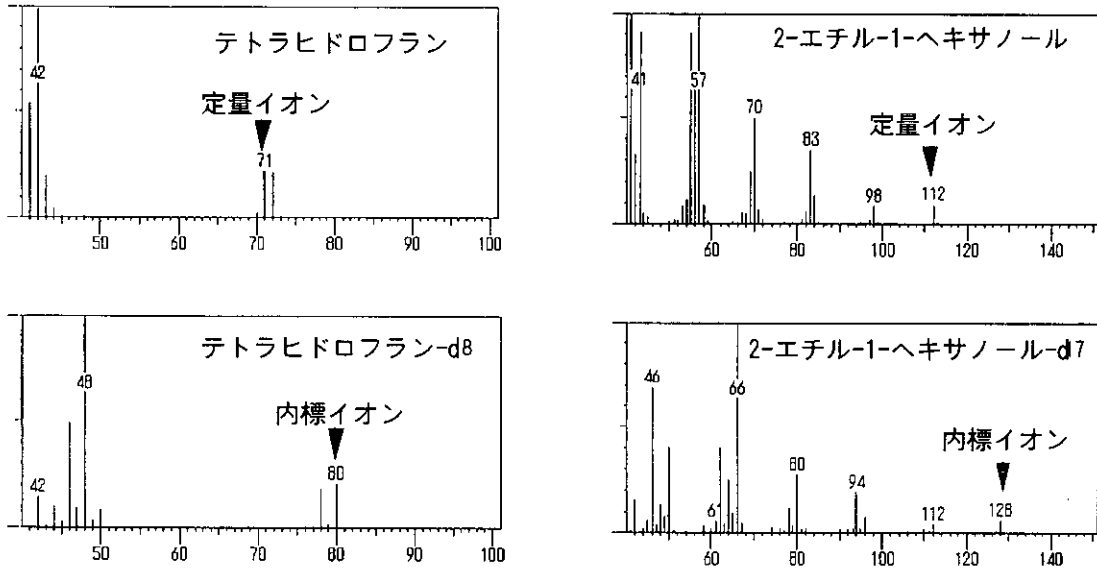


図1 測定対象および内部標準化合物のマススペクトルおよび定量イオン

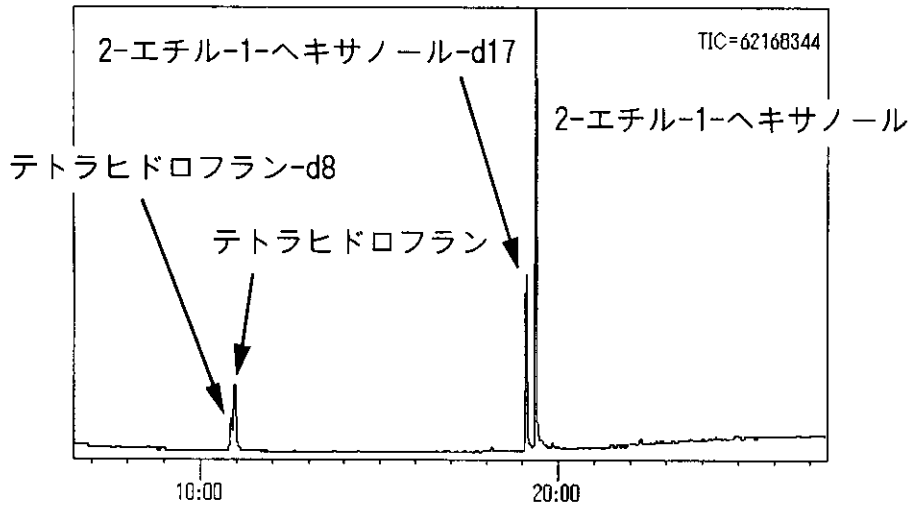


図2 測定対象および内部標準化合物のトータルイオンクロマトグラム (TIC)

ヘッドスペースバイアル（容量22mL）

←飽和食塩水 14.5mL

←試料 0.5mL

←内部標準溶液 1 μ L

密封

ヘッドスペースGC/MS

図3 テトラヒドロフランおよび2-エチル-1-ヘキサノールの分析方法
内部標準溶液：テトラヒドロフラン-d8および2-エチル-1-ヘキサノール-d17の250ppmメタノール溶液

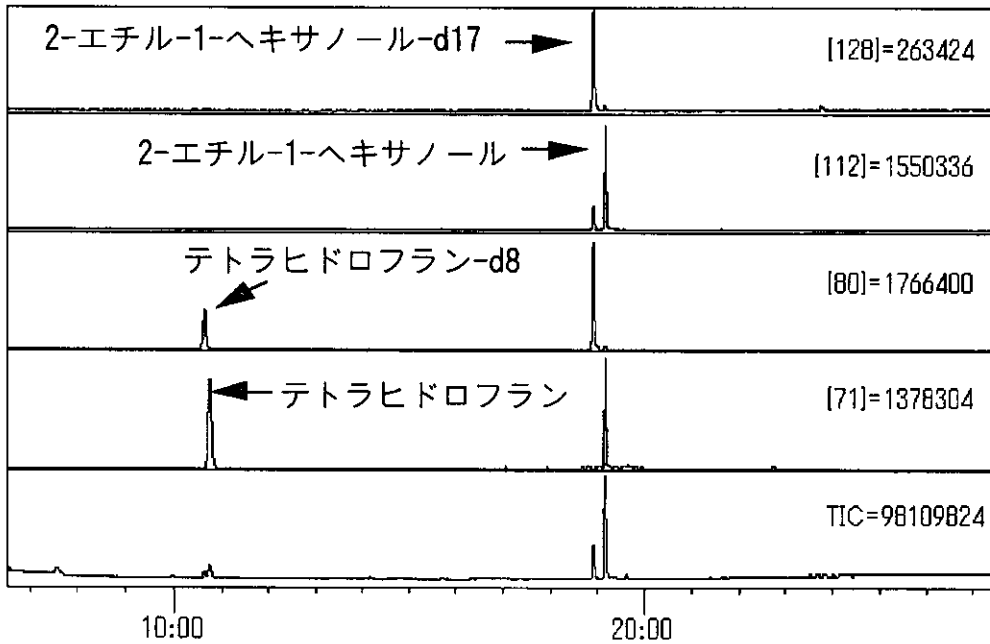


図4 血液バッグに4日間保存した人血液（血漿）をヘッドスペースGC/MS分析した結果として得られたTICおよびマスクロマトグラム

表1 絶対検量線法による人血清からの添加回収率

| | n | 添加濃度 0.1ppm | | 添加濃度 1.0ppm | |
|---------------|---|-------------|--------|-------------|--------|
| | | 回収率 (%) | CV (%) | 回収率 (%) | CV (%) |
| テロラヒドロフラン | 5 | 92.6 | 8.6 | 90.7 | 5.1 |
| 2-エチル1-ヘキサノール | 5 | 56.2 | 6.2 | 51.1 | 5.0 |

表2 安定同位体内部標準法による人血清からの添加回収率

| | n | 添加濃度 0.1ppm | | 添加濃度 1.0ppm | |
|---------------|---|-------------|--------|-------------|--------|
| | | 回収率 (%) | CV (%) | 回収率 (%) | CV (%) |
| テロラヒドロフラン | 5 | 97.6 | 2.0 | 99.8 | 0.3 |
| 2-エチル1-ヘキサノール | 5 | 89.2 | 2.2 | 95.0 | 0.7 |

表3 血液バッグに保存した人血液中のテロラヒドロフランおよび2-エチル1-ヘキサノール濃度の経時変化

テロラヒドロフラン

| 使用バッグ | CPD液* | 試料 | 保存期間 (日) | | | |
|------------|-------|------|----------|------|------|------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 4 |
| 川澄製 カーミC液 | 109 | 血漿 | 22.0 | 22.5 | 25.2 | 26.8 |
| | | 赤血球液 | 22.5 | 23.6 | 25.1 | 24.0 |
| JMS製 S-200 | 8.47 | 血漿 | 0.68 | 0.65 | 0.68 | 0.85 |
| | | 赤血球液 | 0.49 | 0.52 | 0.56 | 0.62 |

2-エチル1-ヘキサノール

| 使用バッグ | CPD液* | 試料 | 保存期間 (日) | | | |
|------------|-------|------|----------|------|------|------|
| | | | 0 | 1 | 2 | 4 |
| 川澄製 カーミC液 | 1.01 | 血漿 | 0.21 | 1.13 | 1.27 | 1.48 |
| | | 赤血球液 | 0.03 | 0.11 | 0.11 | 0.17 |
| JMS製 S-200 | 0.52 | 血漿 | 0.36 | 1.34 | 1.60 | 1.85 |
| | | 赤血球液 | 0.06 | 0.14 | 0.20 | 0.30 |

単位：ppm

*バッグに封入されていたCPD溶液 (28mL) 中の濃度。ただし、血液保存実験に用いたものとは異なるロットのバッグで測定したデータ。