

C.結果及び考察

EU 及び米国の血液製剤のウイルス NAT ガイドラインにおいて記載されている基本的要件について比較したものが表 1 である。FDA では HCV 及び HIV の NAT を求めているが、CPMP では HCV のみが NAT の対象となっている。これに対して、我が国では、HCV、HIV 及び HBV の NAT が求められていることも大きく異なっている。この相違点は、FDA 及び EU の NAT ガイドラインが血漿分画製剤を対象として策定されていることがその要因と考えられる。

特異性に関しては、FDA 及び CPMP のガイドラインともプライマー／プローブの選択に当たって遺伝的に保存されている領域かどうかを明らかにすることを求めている。一方、CPMP では分析法バリデーションとして、100個の HCV RNA 陰性血漿プールを用いての確認を求めている。

検出限界としては95%の確率で検出されるウイルスゲノム量を求めている。CPMP では、これを陽性カットオフ値として段階希釈した陽性血漿を用いて測定し、統計学的手法を用いて明らかにするように求めている。また、CPMP は、HCV RNA 量として血漿プールでの測定に際して、プール前の個別検体で5000IU/ml以上の感度をもとめており、FDA では HCV 及び HIV-1 RNA としてプール血漿での検出感度としてプール前の個別検体レベルで5000IU/mlを確保するように求めている。

試料の調製に関しては、CPMP ではサンプリング法、ミニプールの調製法、試験までの保存法、クロスコンタミネーション防止策、ウイルスゲノムの回収率を

明らかにするように求めている。FDA では、試料中の抗凝固剤や NAT の阻害因子の混入について評価するように求めており、また、ウイルスゲノムの回収の効率を明らかにするように求めている。

標準品としては、CPMP は WHO の HCV 国際標準品 (96/790) に対して較正された参照品や標準品を用いることが求められている。一方、FDA でも WHO の標準品を用いることを推奨しているが、それ以外に CBER あるいは AIDS Clinical Trial Group の Virology Quality Assurance の標準品や標準パネルを用いることも推奨されている。

分析法としての性能確認として、CPMP では少なくとも20検体の陰性血漿と種々のウイルス濃度の少なくとも20個の陽性血漿プールを用いて試験することを求めるとともに、日内、日差変動や試験担当者による変動についても明らかにすることを求めている。一方、FDA では少なくとも500人の血液あるいは血漿試料を用いて試験することが求められている。このように FDA では大量の血漿検体を用いた試験を求めているが、これは有償での治験として行うことが認められているためと考えられる。

以上のように EU 及び米国の NAT ガイドラインではその基本的要件として感度、精度、及び再現性に関して最も重点を置いた説明責任を血漿分画製剤製造者に求めている。この点に関しては、我が国でも同様であると考えられる。一方、NAT ガイドラインの対象とするウイルスに関しては日米欧で大きく異なっている。この点は我が国独自の安全対策として3種のウイルスの NAT を求めているわけであるが、欧米がそこまでの要求をして

いない理由についてさらに調査する必要がある。一方標準品に関しては、WHO 国際標準品を用いることが欧米の両ガイドラインとも推奨されているが、FDA では別途、独自の標準品の使用も推奨されている。この点についても、さらに調査する必要があると思われる。

D. 結論

血液製剤のウイルス NAT ガイドライン策定に当たって考慮すべき事項や要素について、関連する文献や EU 及び米国の NAT ガイドラインについて調査研究を行った。その結果、特異性、感度、再現性等をどの様に担保するか、プライマーやプローブをはじめとする用いる試薬・試液の選択基準等、NAT を導入に際して求められる基本的要件は共通していることが明らかになった。

E. 研究発表

1. 論文発表及び著書

- 1) A. IWATA, K. SATOH, M. MURATA, M. HIKATA, T. HAYAKAWA, T. YAMAGUCHI; Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. *Biol. Pharm. Bull.*, (in press)
- 2) K. SATOH, A. IWATA, M. MURATA, M. HIKATA, T. HAYAKAWA, T. YAMAGUCHI; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Virol. Method.*, (in press)
- 3) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Kogi M, Uchida E, Hayakawa T: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem. Pharm.* (in press)
- 4) TKANEYASU-TOYODA, T YAMAGUCHI, T OSHIZAWA T HAYAKAWA: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells, *J Cell Physiol.*, 195, 119-129 (2003)
- 5) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Kogi M, Uchida E, Hayakawa T: Role of the p70 S6 kinase cascade in neutrophilic differentiation and proliferation of HL-60 cells-a study of transferrin receptor-positive and -negative cells obtained from dimethyl sulfoxide or retinoic acid-treated HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys.* 405, 21-31 (2002)
- 6) 山口照英: ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保について. *ファルマシア*, 38, 523-525 (2002)
- 7) 早川堯夫、山口照英、石井(渡部)明子、押澤 正: 核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリテイスタディ、*医薬品研究*, 33, 275-284 (2002)
- 8) 早川堯夫、山口照英、押澤 正: 日局生

物薬品の品質・安全性確保に関する研究
一ウイルス安全性確保の基本要件
一、医薬品研究日局生物薬品の品質・
安全性確保に関する研究 一ウイルス
安全性確保の基本要件-33、210-230
(2002)

- 9) S. Niimi, T. Oshizawa, T. Yamaguchi, M. Harashima, T. Seki, T. Ariga, T. Kawanishi, T. Hayakawa, Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 770-774 (2003)

2. 学会発表

- 1) 豊田淑江、山口照英、押澤正、早川堯夫：
AC133陽性細胞由来血管内皮前駆細胞
の解析第1回日本再生医療学会。京都、平
成14年4月18
- 2) 豊田淑江、山口照英、押澤正、早川
堯夫：ヒト末梢血におけるAC133陽性

細胞由来血管内皮前駆細胞の解析。第23
回日本炎症・再生医学会。東京、平成14年
7月3日

3) 豊田淑江、押澤正、内田恵理子、早川
堯夫、山口照英：G-CSFによるHL-
60細胞中球分化亢進と増殖促進における
PKC δ の役割。第75回日本生化学大会。
京都、平成14年10月15日

4) 押澤正、山口照英、豊田淑江、内田恵
理子、早川堯夫：HL-60細胞の好中球様細
胞への分化に関与するタンパク質の解析。
第75回日本生化学大会。京都、平成14年
10月15日

5) 豊田淑江、押澤正、鈴木孝昌、早川堯
夫、山口照英：臍帯血におけるAC133陽性
細胞由来血管内皮前駆細胞の解析、第2回
再生医療学会、神戸、平成15年3月11
日

表1. EU及び米国の血液製剤のウイルス NAT ガイドラインの比較

	FDA	CPMP
対象とするウイルス	HCV 及び HIV	HCV
特異性	<ul style="list-style-type: none"> ・ライマー/プローブの選択 遺伝的に保存されている領域 増幅するウイルス遺伝子の GC 含量と長さ 	<ul style="list-style-type: none"> ・ライマー/プローブの選択 遺伝的に保存されている領域 ・析法バリデーションのために少なくとも 100 個の HCVRNA 陰性血漿 プールを用いて陰性となることの 確認を求めている
検出限界	<ul style="list-style-type: none"> ・検出限界 95%の確率で検出されるウイ ルスゲノム量 (定量的な検出での限界と区別) 	<p>陽性カットオフ値</p> <p>95%の確率で検出される検体 中のウイルスゲノムの最低量</p> <p>陽性カットオフ値の算定には陽 性血漿の希釈系列を用いて試験を 行い、統計学的手法を用いて行う こと</p>
試料の調製	<ul style="list-style-type: none"> ・試料中の抗凝固剤や NAT を 阻害する因子の評価を求める ・試料からの抽出効率や逆転写 反応の効率について明らかに しておくこと。試料に既知量 のウイルスゲノムをスパイク することにより確認すること も可 	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプリング方法 ・ミニプールの調製法 ・試験までの保存 ・クロスコンタミネーション防止 策 ・ウイルスゲノムの回収率
標準品	WHO、CBER あるいは AIDS Clinical Trial Group の Virology Quality Assurance の標準パネル あるいはそれを用いて較正された もの	WHO の HCV 国際標準品 (96/790) に対して較正された参照品や標準 品を用いることを推奨
分析法の性能確認	少なくとも 500 人の血液あるい は血漿試料についてアッセイを行 い 特異性等を確認すること	<ul style="list-style-type: none"> ・少なくとも 20 検体の陰性血漿 と少なくとも種々のウイルス濃 度の 20 個の陽性血漿プールを 用いて試験すること ・日内、日差変動、試験担当者に よる変動についても明らかにす ること

厚生労働科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)
分担研究報告書

血液製剤の安全確保のための品質管理技術の開発に関する研究
: HBs 抗原検出キットの検出感度表記の統一

分担研究者 竹森利忠
研究協力者 水落利明

HBs 抗原検出キットに関する国際動向について調査研究を行った。HBs 抗原検出キットに関しては、医療機関、臨床検査医学会、ウイルス学会、体外診断用医薬品業界と連携し、各診断薬キット使用状況を調査し現状を把握するとともに、HBV 検査薬の国内での感度表記の標準化とそれに伴う品質管理について、実施の可能性と方策について研究調査することが今後必要と思われる。

A.研究目的

HBs 抗原検出キットはその開発の歴史が比較的長く、初期に開発された感度の低い凝集法から近年の高感度化学発光法まで様々である。2002年現在、国内で販売されている HBs 抗原検出キットは、国内生産および輸入キットを合わせて約40種類に上り、平成13年には市販されている診断薬の品質管理の状況を把握するために、厚生労働省指導の基で国立感染症研究所において感度と特異性について再点検が実施されている。そこで、HBs 抗原検出キットの国際動向について調査研究した。

B.結果及び考察

WHO は 1985 年に、英国内での標準品として定められていた HBs 抗原凍結乾燥品 (100 British units/ampoule) (*Med. Lab. Sci.* 38:335, 1981, *Lancet* 14:391-392, 1982)

を国際標準品として承認した(WHO Tech. Rep. Ser. 745:18, 1987)。それ以来一貫して HBs 抗原量については"IU"表記を推奨してきた。しかし現実には米国はもとより、EU においても HBs 抗原量の表記においては"ng"が official に通用している(EU の CTS: Common Technical Specifications Table 1 には WHO 標準品が available になるまでは、最小検出感度が"0.5ng/ml"と表記されている)。その理由として考えられることは、現在の WHO 国際標準品 (International Standard for HBsAg (subtype ad): 100 IU/ampoule; NIBSC Code 80/549) に対する利用者からの不満がある。ひとつには国際標準品に保存剤として添加されている Na-azide が、キットによっては阻害剤として働くことである。もうひとつは標準品の titer が高い (100 IU/ml) ために、希釈による誤差が生じやすいという危険からである。さらに重要なことは、"IU"と"ng"とがほとんど等価なものと「誤

解」されているために、敢えて"IU"へと移行させる必要を感じないことが挙げられる。

1985年当時においては"1 IU"はほぼ"1 ng" (Abbott)に相当していたが、現時点においては"IU"と"ng"はもはや等価ではなくなっていることがわかってきた。例えばBBI(Boston Biomedica Inc.)のHBsAg Sensitivity Panel (PHA 807)においては、およそ1IU=3-4ngの換算となっている。また米国FDAで用いているLot-Release Panel ("ng"表記)とWHO国際標準品を用いて、国内で販売されている定量性に優れている3種類のキットを使用して測定比較したところ、およそ1IU=6ngという結果が得られた。以前より、HBs抗原量の"ng"表記は、各施設での抗原精製方法が異なることから、信頼性に欠ける恐れが指摘されていた(Vox. Sang. 65:249-250, 1993)。さらに"IU"と"ng"との相関が1:1ではない現状においては、抗原量を「IU表記」へと統一することが望ましいと考える。事実WHOでは現在新規に"WHO reference panel for HBsAg"を作成している。これは0.1IU/mlから25IU/mlまでの濃度範囲(現在世界各国で使用されているキットの最小検出感度をカバーできる範囲)にまたがるパネルで、現在の国際標準品を基準にして値付けされたものである。今後はこの参照パネルを基準にして、少なくともEU内では各キットの検出感度表記が"IU"に統一されていくことが予想される。

一方米国においてもEU各国にキットを輸出する際にはDirective 98/79/ECに従いCE(Conformite Europeenne)マークの表示

が義務づけられる。EUでのCTSに"IU/ml"表記が用いられれば、当然米国のキットでさえも"IU"表記が用いられるようになるだろう。我が国では、HBs抗原検出キットの添付文書で表記されているHBs抗原の最小検出感度は、"IU" (international unit)と"ng"、さらには各社独自の"unit"などが混在しているが、国際的動向にあった品質管理の面から、今後我が国で販売されるHBs抗原検出キットの最小検出感度表記を統一表記する可能性に付いて考慮すべき時期に来ているのではないだろうか。HBs抗原国内標準感度パネル(統一表記)を整備することは、各メーカーにおいて定期的実施されるキットの品質管理(Quality Control)に有用であり、また国内で販売される各キットにおける測定結果を添付文書に反映させることは利用者にとっても有用であると考えられる。HBs抗原検出キットは「定性」キットであり「定量」キットではなく、医療の現場においては「陽性」と「陰性」の判定が重要となる。しかし統一された表記法(IU/ml)を用いることにより、医療および検査の現場においてキットの特性(感度を含めた)を十分に理解し選択使用されることとなるであろう。

国際動向を踏まえ、我が国で市販される診断薬の品質管理の向上を図るために、WHOの標準品に準拠する国内用の標準品を作製し、各キットの測定値及びその感度を一定の基準で表示するための基礎データを作製することが必要である。HBs抗原国内標準感度パネルについては、現在国立感染症研究所において保有/配付している国内標準品(現在のWHO国際

標準品、および前述した新規作成中の WHO 参照パネルとの titer の整合性を確認済み)をもとにして、HBsAg, anti-HBsAb, HCVAb, HIV(1+2)Ab, HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA の全てが陰性の血清で段階希釈した検体パネルを作成することを現在検討中である。

HBs 抗原検出キットに関する調査研究

を行った。医療機関、臨床検査医学会、ウイルス学会、体外診断用医薬品業界と連携し、各診断薬キット使用状況を調査し現状を把握するとともに、HBV 検査薬の国内での感度表記の標準化とそれに伴う品質管理について、実施の可能性と方策について研究調査することが今後必要と思われる。

平成 14 年度 厚生労働科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）

分担研究報告書

安全な血液製剤を確保するための技術の標準化及び
血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

『血液保存バッグ中血液製剤に溶出する可塑剤フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)
の新規分析法の開発』

主任研究者	広島大学医学部	吉澤 浩司
分担研究者	星薬科大学	中澤 裕之
研究協力者	星薬科大学	吉村 吉博
		加藤 嘉代子
		井之上浩一
		川口 研

研究要旨

前年度、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に残留する化学物質をスクリーニングして、リスク評価の順位を決定した。これに基づき、最も使用頻度が高く、残留量も多いフタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP) の新規分析法を構築し、その溶出挙動の解明を目的とした。本法は、DEHP 及びその代謝物である MEHP を同時に測定することが可能であり、その分析時間も前処理を含め、一検体 30 分と短く、有用な分析法である。又、試料前処理の操作過程を出来るだけ軽減させるため、HPLC のオンライン前処理システムを利用した結果、汚染の低減や分析・前処理操作時間を短縮化することができた。本法は、血液保存バッグから溶出する DEHP の挙動解明に有用な精度の高い分析法である。

A. 研究目的

現在の高度医療に用いられる医療用具には、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の時には、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様々な添加剤については、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。

前年度の研究において、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に残留する化学物質をスクリーニングし、リスク評価の順位を決定した。本研究では、最も使用頻度が高く、残留量も多いフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)(DEHP)の測定をカラムスイッチング-液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)を用いることで、分析前処理時間の短縮化することにより、汚染の低減を目指した。さらに、ヒトへの DEHP 暴露を正確に評価するためには、血液中での DEHP 代謝物であるフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)(MEHP)も一斉に分析することが望まれる。本法論的に、両化合物を一括に測定できる新規分析法が必要とされる。本研究では、PVC 製血液バッグから溶出する可塑剤である DEHP の溶出挙動等の解明を行うことを目的として、DEHP 及び MEHP の新規一斉分析法を構築する。

B. 研究方法

B.1. 試薬・試料

【試薬】

標準品：DEHP 及びフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)- d_4 (DEHP- d_4)は、関東化学社製を用いた。MEHP 及びフタル酸モノ(2-エチルヘキシル)- d_4 (MEHP- d_4)は、林純薬社製を使用した。

【溶媒】

アセトン：ガラス器具の洗浄液として、関東化学社製(フタル酸エステル試験用)を使用した。

アセトニトリル：移動相として、和光純薬社製(HPLC分析用)を使用した。

メタノール：標準品溶解液として、和光純薬社製(HPLC分析用)を使用した。

水：Milli-Q gradient A 10 with EDS polisher (Millipore 社製)で精製したものを用いた。

ギ酸：和光純薬特級を用いた。

B.2. 分析装置・条件

【カラムスイッチング LC/MS 装置】

LC/MS:Agilent 1100 LC/MSD SL system (Agilent Technologies 社製)

前処理用ポンプ:Shimadzu LC-10AS pump (島津社製)

装置図を Fig.1 に示す。

【測定条件】

分析用カラム：Mightysil RP-18 GP (L) (100 x 2.0 mm, 5 μ m) (関東化学社製)

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

分析用移動相：水/アセトニトリル (0.1%ギ酸) (50/50[0-6 min]→10/90 [6-25 min])

分析用移動相の流速：0.2 ml/min

前処理用カラム：Bioptronic AV-2 (50 x 4.6 mm, 5 μ m) (GLサイエンス社製)

前処理用移動相：水(100%)

前処理用移動相の流速：0.5 ml/min

注入量：10 μ L

測定モード：エレクトロスプレーイオン化法(ESI) ポジティブモード SIM モニタリングイオン m/z 391 (DEHP) m/z 395 (DEHP- d_4)、ネガティブモード

SIM モニタリングイオン $m/z=277$
(MEHP) $m/z=281$ (MEHP- d_4)

B.3. ヒト血漿試料の調製

成人の健常人6名のボランティアより提供された全血を遠心分離(3000 rpm, 10 min)し, その上清を分析用試料とした.

B.4. PVC 製血液バッグ中血清試料の調製

日本赤十字より提供された血液バッグ (2 検体製造番号: 020627AT, 020628AT 全量: 300 ml) に封入された血清(-20°Cで保存)を室温で解凍し, 水で10倍に希釈したものを分析用試料とした.

B.5. 定量分析

内標準法により, 濃度範囲 25~1000 ppb(DEHP)及び 5~1000 ppb(MEHP)において, 検量線を作成して定量を行った.

B.6. 添加回収試験

血漿中の DEHP 及び MEHP 最終濃度が, 0.05, 1, 10 ppm となるように標準溶液を検体に添加したものを分析用試料とした.

C. 研究結果

カラムスイッチング LC/MS を用いて, DEHP 及び MEHP の同時分析法の開発を検討した. 測定におけるタイムスケジュールを Table 1 に示す. また, DEHP は, 質量分析計において, 移動相にギ酸を添加することによるイオン化効率を検討した. ギ酸濃度を 0~1.0%(V/V)の範囲でイオン化効率を比較したところ, 0.1%が最適であった

(Fig.2).

本法を用いることで, DEHP(25~1000 ppb)及び MEHP(5~1000 ppb)で相関係数 0.999 以上と良好な直線性が得られた(Table 2). また, 添加回収試験の結果を Table 3 に示す. 回収率は 90%以上(RSD 5%以下)と良好な結果が得られた.

本法を用いて, 6名(成人・健常人)のボランティアより提供された血漿試料を分析した結果を Table 4 に示す. 両化合物共に, 定量限界以下であった. また, 日本赤十字より提供された製造番号の異なる二つの PVC 製血液バッグ中の血清試料を分析した結果及びクロマトグラムを Table 4 と Fig.3 に示す. 製造番号 020627AT において, DEHP 31.7 ppm 及び MEHP 546 ppb, 製造番号 020628AT において, DEHP 31.6 ppm 及び MEHP 613 ppb が検出された.

D. 考察

フタル酸エステル類の分析には, GC/MS による分析法が主流であるが, 外部環境や分析前処理からのコンタミネーションが危惧されている. 本法は, カラムスイッチングを利用したオンライン前処理システムにより, 前処理によるコンタミネーションの危険性を極限まで減少させることが可能となった.

本法を用いて, ヒトの血漿を分析した結果から, ヒト血漿中には, DEHP, MEHP 共に検出されなかった. しかし, PVC 製血液バッグ中に保存された血清では, DEHP 約 30 ppm, MEHP 約 500 ppb

が検出された。この結果、PVC 製血液バッグから DEHP が溶出し、血液製剤が汚染されることが示唆された。また、溶出した DEHP の一部が血清中の酵素等により加水分解され、MEHP が生成されたと考えられる。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。DEHP の代謝物である MEHP は、DEHP より強い毒性があるという報告¹⁾もなされており、早急なモニタリングや生体影響評価を実施する必要がある。

E. 結論

PVC 製医療用具は、血液保存や輸血バッグ等に多く利用されているが、近年、FDA よって PVC から溶出する DEHP のリスクアセスメントが実施された²⁾。又、S.Hill らの報告³⁾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、これらのリスク評価が、十分に行なわれているとは言えない。本法は、保存用血液バッグから溶出する可塑剤のリスク評価へ応用することが可能と思われる。

本研究では、PVC 製血液バッグ中に最も使用頻度が高く、残留量も多い DEHP の測定を、カラムスイッチング LC/MS を利用したオンライン前処理システムによる分析法を構築した。

本法を用いて PVC 製血液バッグ中の保存血液を分析した結果、DEHP が約 30 ppm、MEHP では約 500 ppb 検出された。血液バッグの全量を 300 ml とす

ると、DEHP 及び MEHP が、絶対量として、約 10 mg 含まれていることになる。このような可塑剤に汚染された血液製剤を使用した際のヒトに対する安全性について、今後更なる検討を要する。

参考文献及び参考資料

- 1) Mettang T et al. Perit Dial Int 17 (1997) suppl.2
- 2) FDA(<http://www.fda.gov/cdrh/newpg.html>.)
- 3) S.Hill et al. Clinica Chimica Acta 304 (2000) 1-8

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
- 2) PITTCON 2003
“Development of high-throughput analysis of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate using column-switching LC/MS” M, Kawaguchi, T, Higuchi, K, Inoue, Y, Yoshimura, H, Nakazawa

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" K. Inoue, H. Okumura, T. Higuchi, H. Oka, Y. Yoshimura and H. Nakazawa, Clin. Chim. Acta 325, 157-163 (2002)
- 2) "Column-switching high-performance liquid chromatography – electrospray mass spectrometry with on-line coupling of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples" K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura, and H. Nakazawa, Anal. Bioanal. Chem. 375, 527-533 (2003)

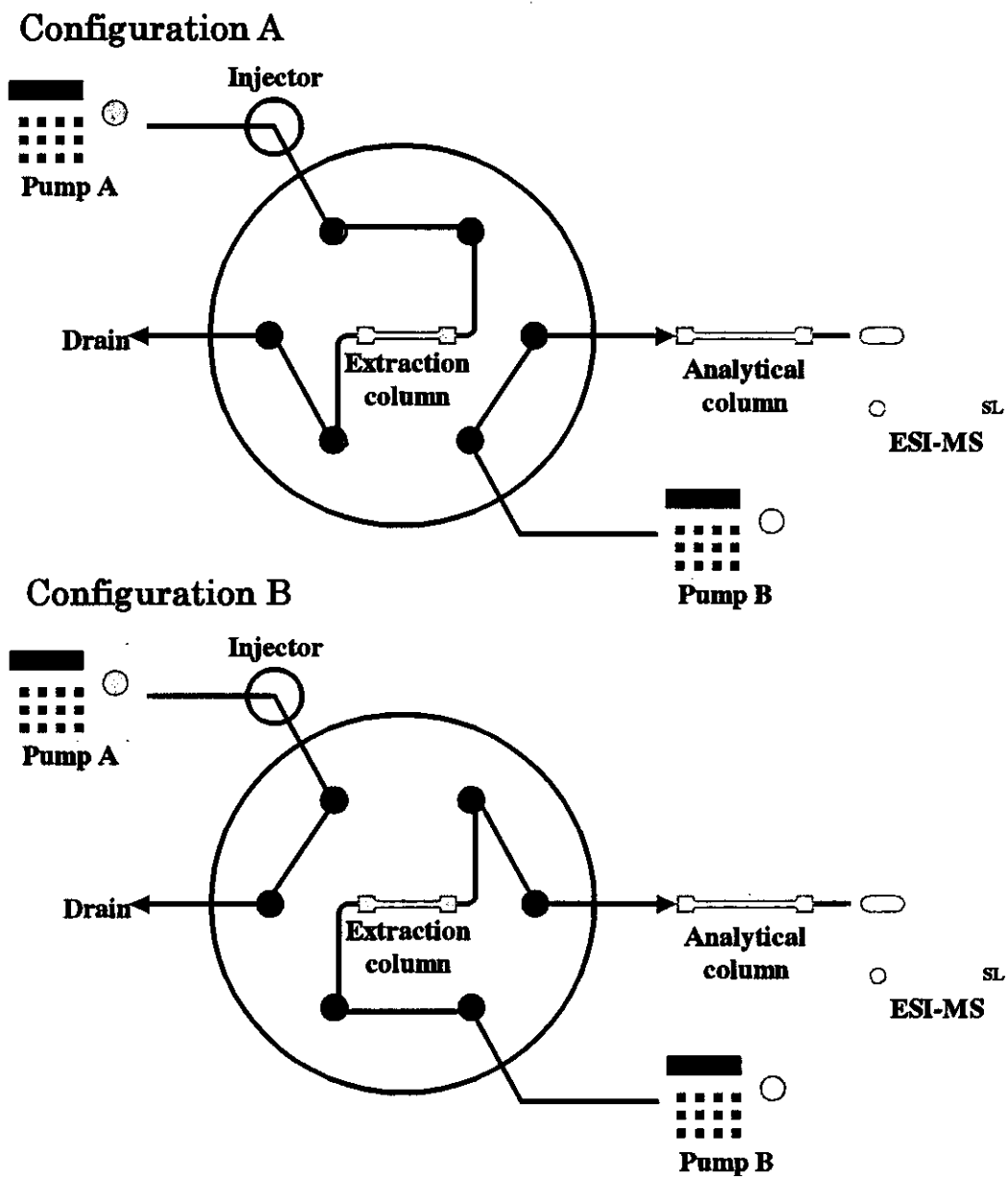


Fig.1 カラムスイッチング LC/MS の装置図

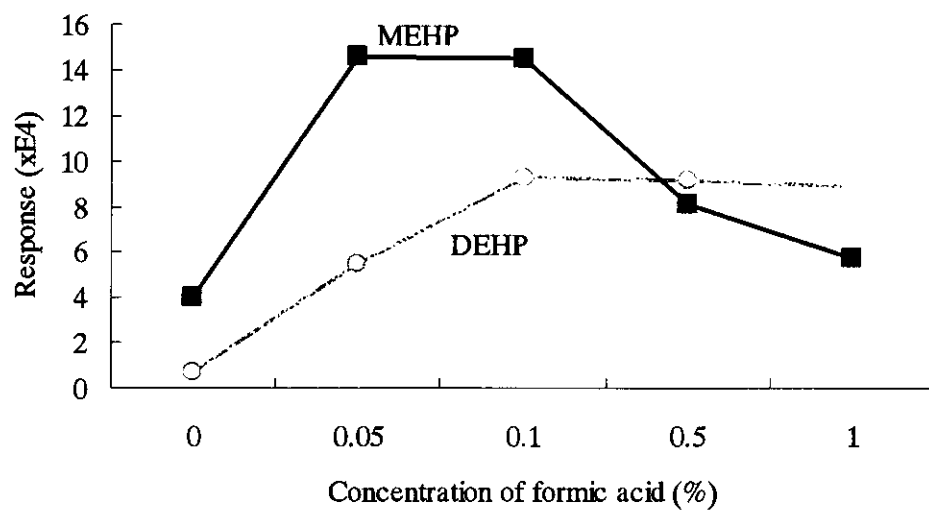


Fig.2 移動相のギ酸濃度の検討

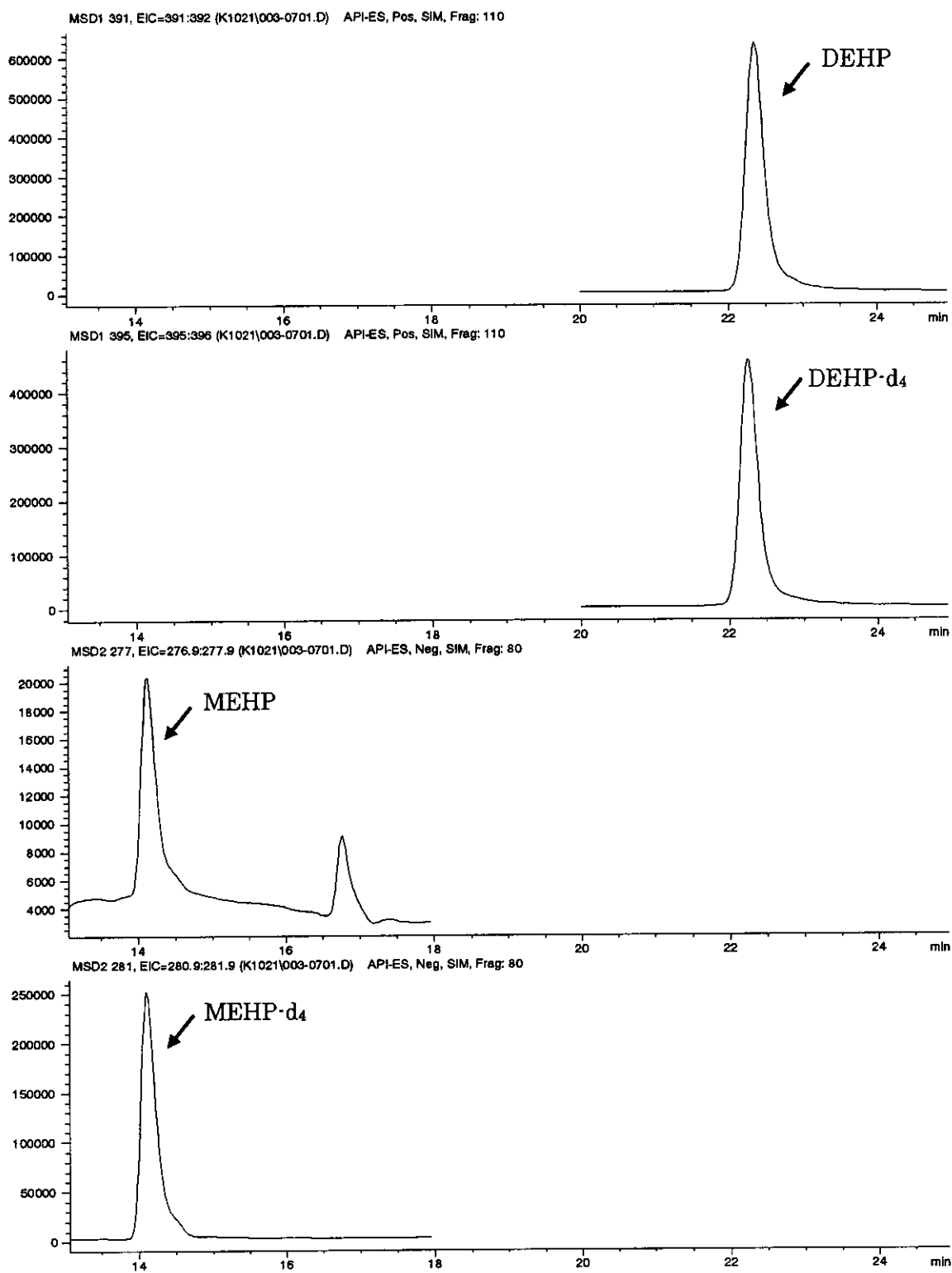


Fig.3 PVC 製血液バック中保存血清のクロマトグラム

Table 1
Time program of analytical method

Time (min)	Event	Column position ^a	Mobile-phase: Water / formic acid in acetonitrile (V/V)
0.0	Sample injection	Configuration A	50 / 50
3.0		Configuration B	
6.0			10 / 90 (stepwise)
25.0	Stop analysis	Configuration A	50 / 50 (stepwise)
28.0	Next analysis ^b		

^aConfigurations A and B are shown in Fig 1.

^bThe mobile phase was switched to water / formic acid in acetonitrile (50/50, V/V) for 3 min to re-equilibrate the column

Table 2
Chromatographic validation for DEHP and MEHP detection

Compound	Retention time (min)	LOD ^a [ng/ml]	LOQ ^b [ng/ml]	r
DEHP	22.1	10	25	0.999
MEHP	14.1	1	5	0.999

^aLOD(limit of detection) = 3 x (detection peak / blank peak + SD0)

^bLOQ(limit of quantification) = 10 x (detection peak / blank peak + SD0)

Table 3
Recoveries of DEHP and MEHP in human plasma samples

Compound	Conc. [μ g/ml]	Recovery (%)	RSD (%)
			n=6
DEHP	0.05	91.2	3.2
	1	105.8	2.1
	10	94.4	3.1
MEHP	0.05	97.6	3.3
	1	98.5	1.6
	10	96.8	4.6

Table 4
Concentrations of DEHP and MEHP in various blood samples.

ボランティア	DEHP ^a [ng/ml]	MEHP ^b [ng/ml]
A	N.D.	N.D.
B	N.D.	N.D.
C	N.D.	N.D.
D	N.D.	N.D.
E	N.D.	N.D.
F	N.D.	N.D.
PVC製血液バック中保存血清		
020627AT	31.7×10^3	546
020628AT	31.6×10^3	613

^aN.D. indicates DEHP concentrations lower than 10 ng/ml

^bN.D. indicates MEHP concentrations lower than 1 ng/ml

平成 14 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

血液バッグから保存血液中に溶出するテトラヒドロフラン、2-エチル-1-ヘキサノール、トルエンの溶出挙動および血液製剤中の残留実態調査

主任研究者 吉澤 浩司

広島大学医学部

分担研究者 宮崎 豊

愛知県衛生研究所

研究協力 猪飼 誉友

近藤 文雄

伊藤 裕子

後藤 智美

岡 尚男

松本 浩

富田 伴一

愛知県衛生研究所

井之上浩一

中澤 裕之

星薬科大学

要旨

国内メーカー3社(川澄、JMS およびテルモ社)が製造した全血用シングルバッグ(200mL)各2個を用いて、これらバッグから保存血液(赤血球および血漿)中に溶出するテトラヒドロフラン(THF)、2-エチル 1-ヘキサノール(2-EH)、トルエンなどの量を21日間にわたって経時的に測定した。その結果、これら揮発性化合物の保存血液中の濃度は時間とともに増加する傾向が認められ、それぞれの最高濃度は、THFが13.4ppm(川澄/血漿/14日、実験開始時:10.4ppm)、2-EHが3.75ppm(JMS/赤血球/21日、実験開始時:0.13ppm)、トルエンが45ppb(JMS/血漿/14日、実験開始時:13.6ppb)に達した。THFは保存開始時の濃度が高く、その時間的な増加は非常に緩やかであったのに対し、2-EHには低い濃度から時間とともに急激に増加するという特徴が、また、

トルエンには両者の中間的な増加挙動が認められるとともに、THF 濃度に関してはメーカー間に大きな差が存在することが明らかとなった。

一方、バッグの保存場所に使用した愛知県赤十字血液センターの血液製剤冷蔵保管庫の室内環境調査を実施したところ、高い濃度の THF ($775 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、2-EH ($21.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、およびトルエン ($417 \mu\text{g}/\text{m}^3$) が検出された。しかしながら、同庫内に設置した活性炭デシケータを用いての保存実験より、これら保存環境中に存在する化合物が血液製剤に移行する量は、バッグからの溶出量に比べると格段に少ないことが示唆された。

また、同センターで期限切れのため廃棄処分となった血液製剤 113 試料(赤血球 43、血漿 47 および血小板 23)の分与を受け、これら製剤中に残留する上記化合物の濃度を測定した。その結果、THF が 0.007~76.9ppm、2-EH が 0.18~39.9ppm、トルエンが ND~92.2ppb と 21 日間の保存実験での最高値を超えた値を含む非常に広い範囲で検出された。以上の結果から、これら化合物の血液中の残留には、血液製剤の種類や保存期間だけでなく、メーカーやバッグの材質、構造による違いが大きく関わっていることが示唆された。

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。

昨年度の本研究で著者らは、血液バッグから溶出する恐れがあ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) について、血液試料中の分析法を確立するとともに、予備実験として、国内メーカー 2 社の血液バッグに直接採取した後、冷蔵保存したヒト血液の分析を実施した。その結果として、これらの化合物が血液バッグから保存血液中に溶出する

ことが強く示唆された。そこで今回、上記 2 種類の化合物にトルエンを加えた 3 種類の揮発性有機化合物 (VOC) を対象に、血液バッグからの溶出挙動等についてより詳細な調査を行なうとともに、愛知県赤十字血液センターより期限切れのため廃棄処分となった赤血球、血漿、および血小板製剤の分与を受け、これら保存血液製剤中に残留する 3 種類の VOC 濃度を測定し、検討を加えた。

B. 研究方法

1. 試薬および材料

THF、2-EH、およびトルエンには和光純薬製を、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)、2-エチル-1-ヘキサノール-d17 (2-EH-d17)、およびトルエン-d8 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、川澄製 カーミC液、JMS社製S-200、およびテルモ社製テルモ血液バッグ CPD(各バッグとも200mL 採血用、CPD 液 28mL 入)の3種類を用いた。

2. 溶出挙動および残留実態調査

2-1. 試料の調製

愛知県赤十字血液センターにおいて献血と同様の手順で3種類の血液バッグ各2個に被験者(3名)の血液約200mLを採取し、各1個を同センターの冷蔵保存庫に、別の各1個を同保存庫内に設置した活性炭デシケータ内に保存した。採取当日(0日、約3時間後)、7、14、および21日後に、各バッグから血液20mL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。

血液製剤については、同センターの実験室内で、10mL試験管3本に約7mLずつ分注し、スクリューキャップで密栓後、測定までの間、衛生研究所の冷凍庫(-40℃)に保存した。

2-2. 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℃ (20分)、バイアル振とう機能: 使用 (Power 5: 10分)、サンプルループ容量: 1mL、サンプルループ温度: 150℃、トランスファーライン温度: 160℃。

GC/MS条件 装置: AUTO MASS SYSTEM II (日本電子) カラム: SPB-1 (0.25 mm i.d. x 60m、膜厚: 1.0 μm、Sperco) カラム温度: 40℃で4分間保持し、230℃まで毎分10℃で昇温後、230℃で5分間保持。イオン源温度: 210℃ 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)、トルエン (m/z 91)、THF-d8 (m/z 80)、2-EH-d17 (m/z 128)、トルエン-d8 (m/z 98)。

2-3. 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 (250ppm THF-d8、250ppm 2-EH-d17、および25ppm トルエン-d8 のメタノール溶液) 1 μL 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、2-EH、およびトルエンのメタノール溶液、濃度: 50 または 1000ppm) 1-10 μL、および内部標準溶液 1 μL 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℃で5時間加熱処理した塩化ナトリウムと MilliQ 水とで調製した飽和溶液に対し、高純度ヘリウムを 60℃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。

3. 保存環境調査

3-1. 試料の調製および測定