

## 分担研究報告書

### 油症患者の血液中ダイオキシン類分析におけるナローボアカラムの検討

研究分担者	戸高 尊	公益財団法人北九州生活科学センター	室長
研究協力者	広瀬勇氣	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	上原口奈美	公益財団法人北九州生活科学センター	検査員
	梶原淳睦	公益財団法人北九州生活科学センター	参事
	千々和勝己	公益財団法人北九州生活科学センター	常務理事
	池田光政	公益財団法人北九州生活科学センター	理事長

**研究要旨** 近年、世界各地でヘリウムガスの需要が高まり、日本への供給が制限されています。ヘリウムガスをキャリアーガスとして用いる測定では、その対策として極力消費量を抑える、もしくは代替ガスへの変更などの対策が必要になってきています。高分解能質量分析装置によるダイオキシン類の分析に関しては、代替ガスによる分析は不可能です。今回、昨年検討した分析カラムよりも内径の細いナローボアカラムを用いて分析条件を確立した上で、ダイオキシン類異性体の分離およびS/N比の改善に関して検討を行った。その結果、感度面における大きな改善は見られなかったが、分析時間が40分程度となり、測定時間が20分短縮可能となった。今後もヘリウムガスの供給が制限された場合、本法はヘリウムガスの消費を抑制できるので非常時の対策として有効である。

#### A. 研究目的

油症はポリ塩化ジベンゾダイオキシン(PCDDs)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDFs)、ポリ塩化ビフェニール(PCBs)およびポリ塩化クアテルフェニル(PCQs)が混入したカネミオイルを摂取して発症した複合中毒です。油症の発生から50年以上経過していますが、いまでも何人かの患者が、ダイオキシン類特有の症状に悩まされています。我々は、油症患者のダイオキシン類による人体汚染とその健康影響を把握する目的で、患者の血液中PCDDs、PCDFs、PCBsおよびPCQs濃度の測定を行ってきました。

昨年度、油症患者血液中ダイオキシン類の分析方法に関して、従来測定に使用していた分析カラムと固定相が異なるカラムを検討したことにより、すべてのダ

イオキシン類異性体でピーク強度が向上し、高いS/N比が得られた<sup>1)</sup>。さらに高精度および高感度な分析を行うために、検討した分析カラムよりも内径の細いナローボアカラムを用いて分析条件を確立した上で、ダイオキシン類異性体の分離およびS/N比の改善に関して検討を行う。

#### B. 研究方法

##### 1. 分析カラム

これまで血液中ダイオキシン類の測定に用いていたカラムは、プレカラムとして、BPX5 (5%フェニルポリシルフェニレンシロキサンカラム、7m×0.25 mm)で膜厚0.25 μm、分析カラムとして、BPX系(30m×0.15 mm)を使用してきた(膜厚に関する情報は企業秘密)。昨年度、Agilent TechnologiesのVF-5ms(5%フェニルメチ

ルカラム) を従来使用していたカラムと同じ長さおよび同じ径のサイズで、プレカラムとして膜厚 0.15、0.20 および 0.25  $\mu\text{m}$  の 3 種類と、分析カラムとして膜厚 0.10、0.15 および 0.20  $\mu\text{m}$  の 3 種類を製造依頼して、ダイオキシン類異性体の S/N の改善に関して検討を行った。今回、昨年検討した分析カラムより内径の細かいサイズ(20m $\times$ 0.10mm)で、膜厚 0.05、0.10 および 0.15  $\mu\text{m}$  の 3 種類を製造依頼した。

## 2. 分析方法

ダイオキシン類の分析には、胃袋型インサートを取り付けた PTV 注入口装置 (LVI-S200, アイスティサイエンス社製) と Solvent cut large volume injection system (SCLV, TRAJAN 社製) を装備した高分解能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析装置 (HRGC/HRMS) を使用した (図 1)。HRGC/HRMS に関して、GC 部は Agilent 社製 7890A、MS 部は Micromass 社製 AutoSpec Premier を用い、注入には 100  $\mu\text{l}$  のシリンジを備えたオートサンプラー Combi-PAL (CTC Analytics 社製) を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究の結果においては、個人が特定できるようなデータは存在しない。

## C. 研究結果・考察

油症患者の血液中ダイオキシン類の分析は、胃袋型インサートを備えた大量注入法と SCLV injection system を連結して行っています<sup>2)</sup>。SCLV システムは圧力バランスによって制御され、適正な圧力バランスを維持することで、注入した試料中の溶媒がほとんどプレカラムにより系外に排出され、分析目的成分もロスなく分析カラムに導入することが可能です。今回、カラム内径や長さの変更に伴

い、SCLV 作動時における圧力バランスの条件を再検討する必要性が生じた。今回使用するカラム接続時における真空状態からヘリウムガス流量を推定し、圧力バランスの確認を行いながら、SCLV 作動時における至適条件を確立した (図 2)。この条件下で膜厚 0.25  $\mu\text{m}$  のプレカラム (7 m $\times$ 0.25mm) を用いて、ダイオキシン類異性体の溶出パターンおよび S/N 比に及ぼす分析カラムの膜厚の影響を調べた。分析カラム (20 m $\times$ 0.10 mm) として膜厚 0.05、0.10 および 0.15  $\mu\text{m}$  を用い、ダイオキシン類標準液 (0.25pg) を注入後に得られた各クロマトグラムから算出した S/N 比を比較した。各異性体の S/N 比に関しては、膜厚が薄いカラムの方が、ピーク強度が高く、高い S/N 比が得られていた。膜厚 0.10 および 0.15  $\mu\text{m}$  の分析カラムを使用した場合、高塩素化体の S/N 比が低く、カラムブリードによるノイズの影響が顕著であった。今回検討した分析カラムの中で、膜厚 0.05  $\mu\text{m}$  の分析カラムを用いた場合に最も良好な結果が得られた。このカラム使用時に得られたダイオキシン類異性体の各 S/N 比の値を昨年検討した分析カラムの値と比較した結果、S/N 比に大きな差は認められなかった (図 3)。

## D. 結論

近年、血液中ダイオキシン類の分析に使用していた分析カラムのカラムブリードによる測定への悪影響が顕著に見られ、昨年度、この問題を解決するために現在使用しているカラムと固定相の極性が類似したカラムを選択して、ダイオキシン類異性体の S/N の改善に関して検討を行った。Agilent Technologies 製のカラムに関する検討を行い、プレカラムとして膜厚 0.25  $\mu\text{m}$  (7 m $\times$ 0.25 mm) および分析カラムとして膜厚 0.20  $\mu\text{m}$  (30 m $\times$ 0.15 mm) のカラムを用いた場合、従来使用してい

たカラムと比較して、低ブリードであること；各異性体のピーク強度が向上していること；すべての異性体で高いS/N比が得られていることから、従来よりも高精度・高感度な分析を行うことが可能となった。今回、昨年検討した分析カラムよりも内径の細いナローボアカラムを用いて分析条件を確立した上で、ダイオキシン類異性体の分離およびS/N比の改善に関して検討を行った。その結果、感度面における大きな改善は見られなかったが、分析時間が40分程度となり、測定時間が20分短縮可能となった。

近年、ヘリウムガスは世界的な需給の逼迫により、日本への供給が制限されています。ヘリウムガスをキャリアーガスとして用いる測定では、その対策として極力消費量を抑える、もしくは代替ガスへの変更などの対策が必要になってきています。高分解能質量分析装置によるダイオキシン類の分析は、超高真空の条件下で測定を行う必要があるため、キャリアーガスとして水素ガスを用いることはできません。一方窒素ガスは安全性の高いガスであります。キャリアーガスとして用いた場合、ダイオキシン類異性体の検出感度が低下し、異性体の分離も良好でないため、これら代替ガスによるダイオキシン類の分析は不可能です。

今後もヘリウムガスの供給が制限された場合、今回行ったナローボアカラムを用いた血液中ダイオキシン類の分析法は測定時間を短縮でき、ヘリウムガスの消費を抑制できるので非常時の対策として有効である。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Todaka T, Hirose Y, Kamiharaguchi N, Kajiwara J, Chijiwa K, Ikeda M, Takao Y, Mitoma C, Furue M. Comparison of the concentrations of

polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in the blood of Yusho patients measured in 2004 with those measured in 2014. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 2019 May; 110(2): 73.

## 2. 学会発表

- 1) 広瀬勇氣, 戸高尊, 上原口奈美, 千々和勝己, 池田光政, 三苦千景, 古江増隆: 血液中ダイオキシン類分析におけるナローボアカラムの検討、第28回環境化学討論会(埼玉)、2019年6月12-14日。
- 2) Todaka T, Hirose Y, Kamiharaguchi N, Kajiwara J, Chijiwa K, Ikeda M, Takao Y, Mitoma C, Furue M: The changes in the concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in the blood of Yusho patients from 2004 to 2014, *Dioxin 2019 KYOTO*, August 25-30, 2019.

## F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 参考文献

- 1) 広瀬勇氣, 戸高尊, 上原口奈美, 福島直, 今地政美, 三苦千景, 古江増隆. 血液中ダイオキシン類分析における分析カラムの検討. 第27回環境化学討論会(沖縄). 2018年5月22-25.
- 2) Todaka T, *et al.* Development of a Newly Large-Volume Injection System for Dioxin Determinations in Blood of Yusho Patients. *Fukuoka Acta Medica* 2013; 104(4).

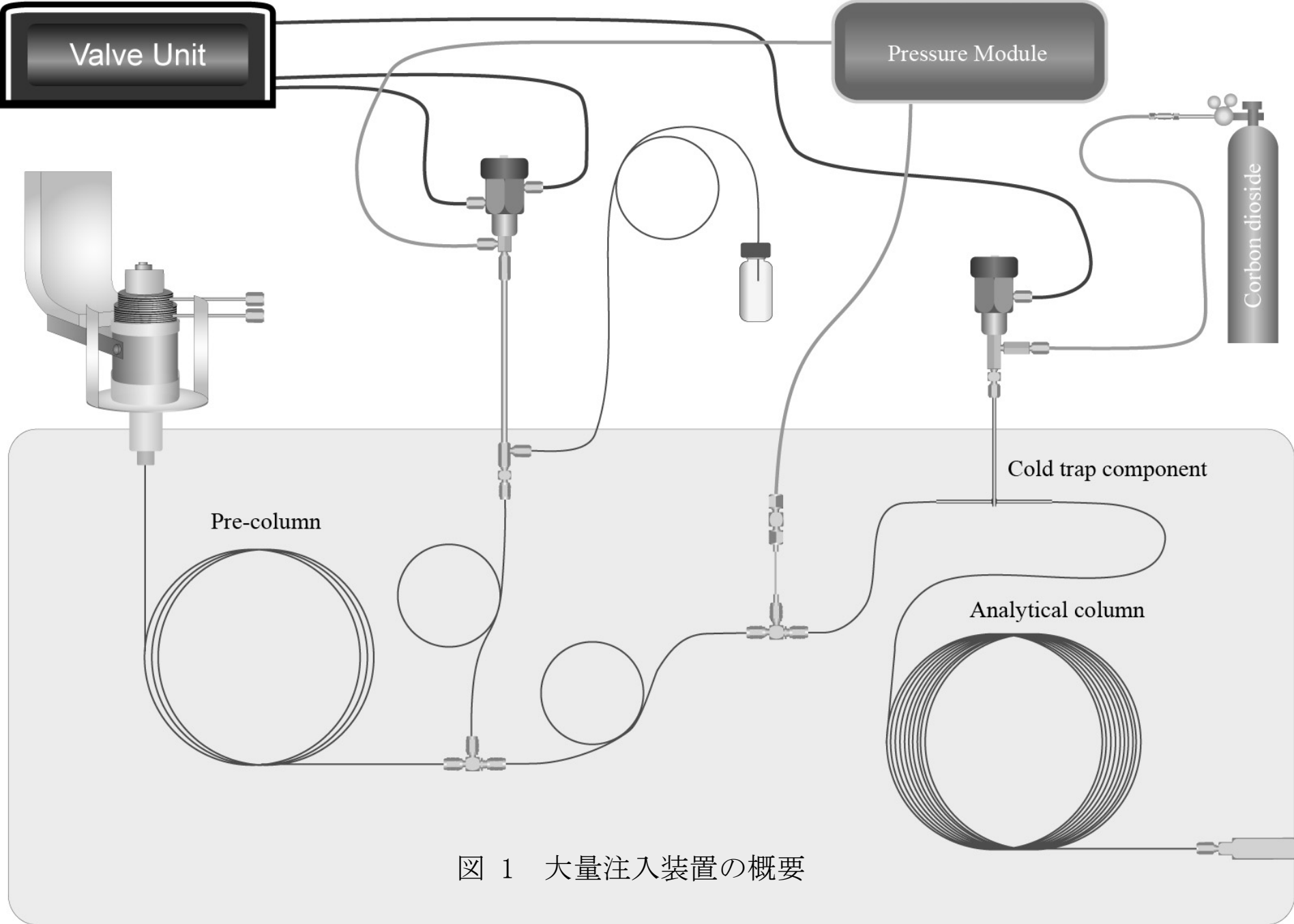


図 1 大量注入装置の概要

図2 ガスクロマトグラフィーの測定条件

Pre-column	VF-5ms (7m×0.25mm I.D., 0.25 μm, Agilent Technologies)			
Analytical column	VF-5ms (20m×0.10mm I.D., 0.05 μm, Agilent Technologies)			
	Rate (°C/min)	Temperature (°C)	Hold (min)	Total (min)
Oven temperature				
		160	3.75	3.75
1st	40	300	11.00	18.25
2nd	100	200	0.50	19.75
3rd	3	260	0.50	40.25
	Rate (kPa/min)	Pressure (kPa)	Hold (min)	Total (min)
Inlet pressure				
		469	3.75	3.75
1st	440	689	14.00	18.25
2nd	678	350	1.00	19.75
3rd	2.4	398	0.50	40.25
	Rate (kPa/min)	Pressure (kPa)	Hold (min)	Total (min)
Auxiliary pressre #1				
		460	3.75	3.75
1st	424	672	14.00	18.25
2nd	694	325	1.00	19.75
3rd	2.4	373	0.50	40.25
	Rate (kPa/min)	Pressure (kPa)	Hold (min)	Total (min)
Auxiliary pressre #2				
		411	18.75	18.75
1st	141	270	0.50	20.25
2nd	2.4	318	0.00	40.25
3rd	1.0	318	0.00	40.25

図3 ダイオキシン類標準液10fg注入時における各異性体のS/N比

内径	0.15mm	0.10mm	0.10mm	0.10mm
長さ	30m	20m	20m	20m
膜厚	0.20 $\mu$ m	0.05 $\mu$ m	0.10 $\mu$ m	0.15 $\mu$ m
2, 3, 7, 8-TetraCDD	27.9	28.8	19.6	23.8
1, 2, 3, 7, 8-PentaCDD	18.9	19.2	12.2	7.7
1, 2, 3, 4, 7, 8-HexaCDD	8.9	6.1	5.9	2.7
1, 2, 3, 6, 7, 8-HexaCDD	9.7	6.7	6.8	3.2
1, 2, 3, 7, 8, 9-HexaCDD	9.3	5.5	5.7	2.5
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HeptaCDD	19.0	10.1	8.3	5.9
OctaCDD	7.6	7.9	4.1	2.7
2, 3, 7, 8-TetraCDF	26.1	31.5	21.3	19.7
1, 2, 3, 7, 8-PentaCDF	35.9	26.1	19.9	13.8
2, 3, 4, 7, 8-PentaCDF	35.7	22.6	18.3	12.6
1, 2, 3, 4, 7, 8-HexaCDF	13.8	10.0	11.7	7.9
1, 2, 3, 6, 7, 8-HexaCDF	13.9	10.3	11.4	8.2
2, 3, 4, 6, 7, 8-HexaCDF	12.1	9.7	10.6	6.9
1, 2, 3, 7, 8, 9-HexaCDF	8.6	5.7	6.7	3.6
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HeptaCDF	19.7	16.3	8.2	6.2
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HeptaCDF	13.0	7.8	4.2	3.0
OctaCDF	8.8	4.4	2.8	2.8
344' 5-TetraCB(#81)	45.0	58.6	24.9	33.7
33' 4' 4' -TetraCB(#77)	48.6	59.6	25.1	34.9
33' 44' 5-PentaCB(#126)	48.9	54.3	38.2	27.7
33' 44' 55' -HexaCB(#169)	67.9	39.8	29.7	46.7

標準液 (250fg) を3回注入し平均値を算出

CDD : chlorinated dibenzo-*p*-dioxin.

CDF : chlorinated dibenzofuran.

CB : chlorinated biphenyl.