

油症検診における血液中ポリ塩化クアテルフェニルの分析

芦塚, 由紀
福岡県保健環境研究所

中川, 礼子
福岡県保健環境研究所

平川, 博仙
福岡県保健環境研究所

堀, 就英
福岡県保健環境研究所

他

<https://doi.org/10.15017/19285>

出版情報：福岡醫學雑誌. 96 (5), pp.227-231, 2005-05-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

油症検診における血液中ポリ塩化クアテルフェニルの分析

福岡県保健環境研究所

芦塚由紀, 中川礼子, 平川博仙, 堀 就英, 飯田隆雄

Analysis of Polychlorinated Quaterphenyls in Yusho Diagnosis

Yuki ASHIZUKA, Reiko NAKAGAWA, Hironori HIRAKAWA, Tsuguhide HORI and Takao IIDA

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences, 39,
Mukaizano, Dazaifu-shi, Fukuoka 818-0135*

Abstract The polychlorinated quaterphenyl (PCQ) concentrations in the blood are important discriminative parameters in Yusho patients. In this study, the analytical method of PCQ was improved, and a high speed and precision analysis could be achieved. A recovery test showed satisfactory recoveries of 99.5% (RSD4.8%, n=5). Using this method, the authors analyzed 62 blood samples which were collected from the 2004 annual inspection for Kanemi rice oil poisoning. PCQ was detected in 20 blood samples (ranging from 0.03 to 4.15 ng/g). The average concentration was 2.07 ng/g in the pattern A (typical Yusho patients), 0.76 ng/g in the pattern B, 0.18 ng/g in the pattern BC and 0.01 ng/g in the pattern C, respectively.

ポリ塩化クアテルフェニル (PCQ) は、油症患者が摂取したライスオイル中に高濃度に含まれていたことが報告されており¹⁾, PCDFと同様にPCBを熱媒体として加熱使用中に生成し、ライスオイルに混入した物質であると考えられている²⁾。PCQは酵素誘導能、肝肥大、胸腺萎縮、体重増加抑制などを指標とした動物実験結果から毒性は弱いと考えられたが³⁾, 油症患者の血液に健常者には見られないレベルのPCQが検出されたため⁴⁾, PCQ濃度は油症診断の有用な基準として1976年に追加された。その基準では、血中PCQ濃度は0.1 ppb以上が異常に高い濃度とされ、0.02 ppb以下が通常みられる濃度、0.03~0.09 ppbが境界領域濃度とされている。

健常者の血中のPCQ濃度は平均で0.02 ppb以下であると結論づけられている⁵⁾。そのため、健常者と油症患者の境界領域と考えられている0.03 ppb~0.09 ppbの濃度を精度よく分析を行うことが不可欠である。PCQの分析法は前田ら⁶⁾により、完全塩素化物である18塩化クアテルフェニル(ODCQ)として電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ(ECD/GC)で定量する方法として確立された。そして、飯田ら⁷⁾によりキャピラリーカラムを用いた分析法が開発され、前処理段階で混入する妨害物がクロマトグラム上で除かれるこ

とにより、ECD/GC測定においての精度、感度が向上した。

しかしながら、従来からPCQ分析の前処理は血液4~10gを用いて行われており、その前処理は多くの労力と時間を費やすものであった。さらに現在はPCBとPCQに加えて、新しい診断基準として追加されたPCDFの測定も必要になったため、採血者の負担を減らすためにも、より少ない血液量で分析を行う必要が生じている。我々は、PCQを定量するために血液試料2gから前処理を行い、必要な感度である0.02 ng/gの検出下限値を達成することができた。そして試料量を減らすことにより、アルカリ分解やカラム精製をより小スケールで行うことが可能となり、検査の迅速性を高めることができた。今回は、その分析方法とそれを用いて行った平成16年度油症一斉検診におけるPCQの分析結果について考察し、いくつかの知見が得られたので報告する。

材料及び実験方法

1. 血液試料

平成16年度油症一斉検診で、PCQ測定対象62名の受診者血液についてPCQ検査を実施した。N=5の添加回収試験には、健常者1名の血液を使用した。

2. 標準液

PCQ 標準液 (10 ng/ml) を完全塩素化して PCQ 濃度で 5 ng/ml に相当する ODCQ 標準溶液を調製した。この標準溶液を希釈し、0.2~2 ng/ml の検量線溶液を調製した。

3. 試薬・試液

ヘキサン, エタノールはキシダ化学社製の残留農薬・PCB 分析用を用いた。ジエチルエーテル, ジクロロメタンは関東化学社製の残留農薬・PCB 分析用を用いた。水酸化カリウムは和光純薬株式会社製の特級を, 無水硫酸ナトリウムは関東化学社製の残留農薬・PCB 分析用を用いた。硫酸は和光純薬株式会社製の有害金属測定用を, 発煙硫酸はキシダ化学社製を用いた。フロリジルは Floridin 社製のものを 130°C で 3 時間活性化させ, アルミナはメルク社製の Aluminiumoxid (70~230 mesh) を 130°C で 3 時間活性化後, 精製水を 2% 加えてよく混合したものを用いた。

4. 使用機器

ガスクロマトグラフ ECD: Hewlett-Packard 社 HP5890A (⁶³Ni-ECD)

5. 測定条件

キャピラリーカラムカラム: Quadrex 社製 MPS 50 (長さ 25 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.1 μm), カラムヘッド圧: 25psi, 注入口温度: 300°C, 注入方法: スプリットレス, カラム温度: 80°C で 5 分間保持した後, 320°C まで 1 分間に 30°C の割合で昇温後 45 分間保持, 注入量: 3 μl, 検出器温度: 350°C。

6. 分析方法

血液試料をよく混和し, 約 2 g を 10 ml の丸底遠心管に正確に秤量した。1.5 N の水酸化カリウム/エタノールを 3.5 ml 加えてよく混合した後, 90°C で 1 時間還流させた。放冷後, ヘキサンを 2 ml 加えて振とう抽出した。2000 rpm で 5 分間遠心分離した後, ヘキサン層を別の 10 ml スピッチに移した。再度ヘキサン 2 ml を加え, 振とう抽出を行い先のヘキサン層と合わせた。ヘキサン層に精製水 3 ml を加えて水洗した後, 無水硫酸ナトリウム (1.5 g) を充填したパスツールピペットに流し込み, 7 ml のヘキサンで溶出させた。ヘキサ

ン溶液を窒素ガスで約 1 ml に濃縮し, パスツールにフロリジル 0.5 g (130°C で 3 時間活性化させたもの), 無水硫酸ナトリウム 0.2 g を積層させたカラムに負荷し, 5%ジエチルエーテル/ヘキサン 7 ml で溶出させた。窒素ガスで濃縮乾固し, ヘキサン 2 ml を加えた。10%発煙硫酸 1 ml を加えて, 攪拌し, 2000 rpm, 5 min で遠心分離を行った後, 硫酸層を捨てた。この操作を硫酸層が透明になるまで繰り返した。ヘキサン層をガラス製反応管に移し, 0.5 ml ヘキサンで 3 回洗い込んだ後, 窒素ガスで乾固させた。さらに 30 分以上減圧デシケーターに入れて完全に溶媒を留去させた。5 塩化アンチモンを 0.5 ml 加えて封管した後, 200°C で 3 時間加熱し完全塩素化した。反応終了後, 冷却し, 開管した反応管にクロロホルム 2 ml を加えて, 振とうした。次に 20%塩酸を 0.5 ml 加えて十分に振とうした後水冷し, さらに 20%塩酸 2 ml を加えて振とうした。1000 rpm で 5 分遠心分離した後, 上層を捨て, 同様に 20%塩酸 2 ml で 2 回洗浄した。続いて, 蒸留水 2 ml, 5%酒石酸 2 ml, 5%炭酸水素ナトリウム 2 ml, 蒸留水 2 ml の順番で洗浄を行った。無水硫酸ナトリウム (1.5 g) を充填したパスツールピペットに, クロロホルム層を流し込み, 5 ml のクロロホルムで溶出させた。窒素ガスで濃縮を行い, 完全にクロロホルムを留去した後, ヘキサン 0.5 ml に溶解させた。次にパスツールピペットにアルミナ 0.25 g (130°C で 3 時間活性化後, 精製水を 2%加えてよく混合したもの) と無水硫酸ナトリウム 0.2 g を積層したカラムに試料液を負荷し, 2%ジクロロメタン/ヘキサン 6 ml で溶出させた。10 ml 先細スピッチにとり, 窒素ガスで濃縮を行い, 完全に溶媒を留去させた。ヘキサン 0.2 ml を加えて最終検液とした。試料は ECD/GC に 3 μl 注入し, 分析を行った。

7. 添加回収試験

健常者の血液 2 g に PCQ 標準溶液 10 ng/ml を 40 μl ずつ添加した。(血液試料 1 g 当たり PCQ が 0.2 ng となるように添加した。) 6 に示す分析方法を用いて N=5 で添加回収試験を行った。

結果及び考察

1. 分析方法の簡易化および添加回収試験

一回の分析に用いる血液量を 2 g に減らすにより、アルカリ分解処理、無水硫酸ナトリウムによる脱水、フロリジル、アルミナカラムによる精製を全て小スケールで多検体同時に処理できるようになり、カラムの溶出に用いる溶媒量は 10 ml 以下に減らすことができた。また、溶出液の濃縮はすべて窒素ガスを用いて多検体を同時に行った。それにより分析時間が短縮され、以前は 8 検体の前処理に約 1 週間必要であったが、3～4 日で行うことが可能となった。分析法のフローを Fig. 1 に示す。

PCQ が検出されない健常者の血液を用いて、本法を用いた PCQ の添加回収試験を行ったところ、回収率は平均 99.5% で、RSD が 4.8% と良好な結果が得られた。ECD / GC における検出下限値は 0.2 ng / ml であり、検量線には良好な直線性がみられた。Fig. 2 に 2 ng / ml 標準溶液及びサンプル (受診者 2 名) の ECD / GC クロマトグラムを示す。試料における定量下限値は 0.02 ng / g であった。

分析の精度を確認するために、受診者 62 名の血液試料測定途中に、ポジティブコントロールとして患者 1 名の血液を計 3 回分析した。その結果、1 回目 が 4.15 ng / g, 2 回 が 4.75 ng / g, 3 回目 が 4.43 ng / g であり、平均 4.44 ng / g, RSD 6.8% と良好であった。PCQ 分析の期間、分析の精度が維持されていることが確認できた。

2. 平成 16 年度油症一斉検診における PCQ 分析の結果

平成 16 年度油症一斉検診受診者で PCQ 測定対象者 62 名の血液について PCQ 検査を実施した。PCQ が検出されたのは 20 名で、その濃度は 0.03 ng / g ～ 4.15 ng / g であった。

Table 1, Fig. 3 は今回測定を行った 62 名の血液中 PCQ 濃度を PCB パターン別に示したものである。A パターンの 4 名は PCQ 濃度が 0.7 ～ 4.2 ng / g で他と比べ非常に高濃度であった。B パターンについては 0.1 ～ 1 ng / g の範囲が多く、C パターンでは 38 名中 37 名が ND であった。濃度の平均値は A パターンが 2.07 ng / g, B パターンが 0.76 ng / g, BC パターンが 0.18 ng / g, C パターンが 0.01 ng / g であった。典型的な油症患者の PCB 濃度パターンである A, B

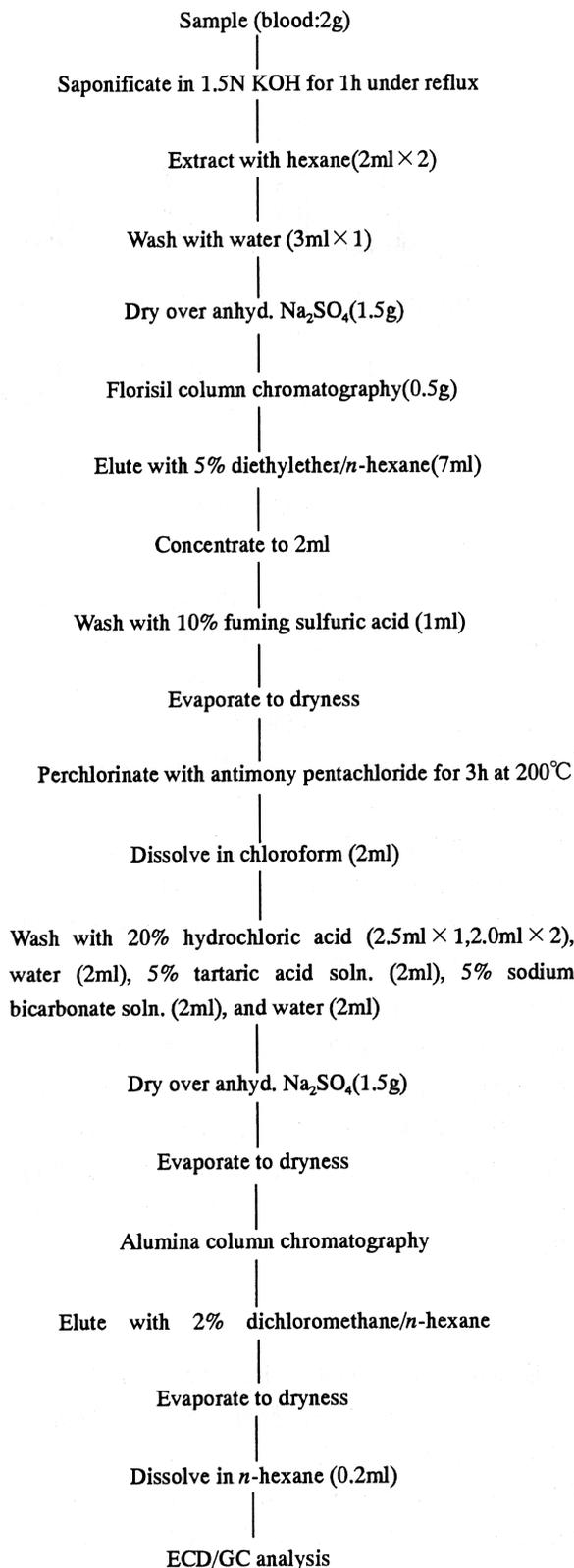


Fig. 1 Analytical scheme for polychlorinated quaterphenyls (PCQs) in blood

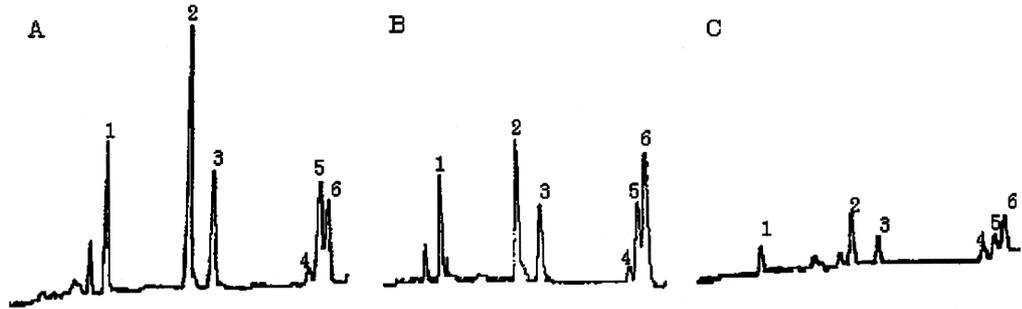


Fig. 2 The ECD / GC chromatograms of six skeletal types of perchlorinated PCQ congener (ODCQ)
 (Peak 1: 2,2'-ODCQ, Peak 2: 2,3'-ODCQ, Peak 3: 2,4'-ODCQ, Peak 4: 4,4'-ODCQ, Peak 5: 3, 3'-ODCQ, Peak 6: 3,4'-ODCQ)
 A: PCQ standard (2 ng/ml)
 B: Sample (pattern A, 4.15 ng / g)
 C: Sample (pattern BC, 0.03 ng / g)

ターンのほとんどは、現在も PCQ が 0.1 以上の高い濃度を示していることがわかる。一方、PCB のパターンが B パターンでも PCQ が ND (< 0.02 ng / g) という例が 4 例、逆に健常者と見分けができない C パターンの人で PCQ が 0.4 ng / g と高い濃度を示す例が 1 例見られた。

Fig. 4 は毎年測定を行っているポジティブコントロール (福岡県内在住の患者) 血液中 PCQ 濃度の経年変化を示している。血中 PCQ 濃度は昭和 60 年から平成 16 年の 19 年間で 8.3 ng / g から 4.15 ng / g と、およそ 1 / 2 の濃度まで減少していることがわかる。PCQ は体内残留性が高く皮下脂肪組織中に蓄積していると考えられるが⁸⁾、血液中の PCQ 濃度と皮下脂肪組織中 PCQ の間に有意な相関あることから⁸⁾⁹⁾、油症患者体内の PCQ は徐々にではあるが排泄され、減少していることが推測される。

総 括

油症検診における血液中 PCQ の分析において、一回の分析に用いる血液試料量を減らし、分析の小スケール化を行うことによって、分析時間の大幅な短縮が可能となった。この方法による PCQ の回収率は平均 99.5 %、RSD 4.8 % と良好であり、また必要な感度である 0.02 ng / g の定量下限値を達成することが可能であることが確認された。この方法を用いて平成 16 年度油症一斉検診受診者 62 名の血液中における PCQ 濃度を分析した結果、20 名の血液から PCQ が検出された。典型的

Table 1 The blood PCQ levels of subjects classified to each PCB pattern in the 2004 annual inspection

PCQ concentration (ng / g)	PCB pattern			
	A	B	BC	C
1 ~	2	5	0	0
0.1 ~ 1	2	8	1	1
ND (<0.02) ~ 0.1	0	0	1	0
ND (<0.02)	0	4	1	37
Total	4	17	3	38

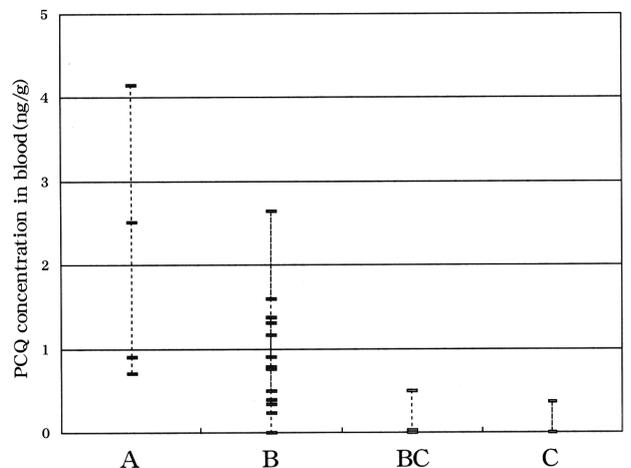


Fig. 3 The blood PCQ levels of subjects classified to each PCB pattern in the 2004 annual inspection

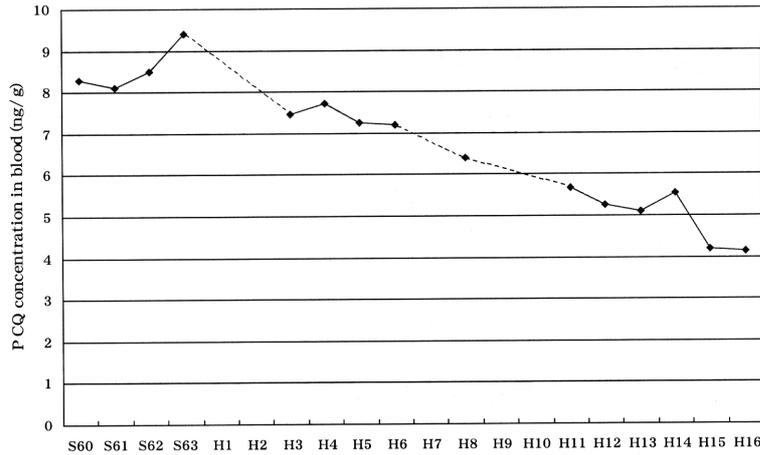


Fig. 4 Time trend of PCQ concentration in the positive control blood

な油症患者の濃度パターンである A, B パターンのほとんどは、現在も PCQ が 0.1 ng / g 以上の高い濃度を示していることがわかった。しかしながら、PCB のパターンが B パターンであっても PCQ が検出されない例や、逆に健常者と見分けができない C パターンの人で PCQ が高濃度 (0.4 ng / g) で検出された例が見られた。患者血液中 PCQ 濃度は油症発生から 30 年以上経過した現在、代謝や排泄等により明らかに減少しているが、油症診断基準としての有用性は不変であり、油症検診において PCB, PCDF 濃度とともに PCQ 濃度についても継続的な追跡調査が重要であると思われる。

謝 辞

本研究は平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金に負うものである。ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) 飯田隆雄, 深町和美, 高橋克巳, 増田義人: 油症原因油および油症患者血液中の PCB, PCQ および PCT, 福岡医誌 76:126-131, 1985.
- 2) 増田義人, 倉恒匡徳: 油症を起こしたライスオイル中の毒性物質, 福岡医誌 70:229-237, 1979.
- 3) Takenaka S, Iida T, Nagase M, Takata S,

- Masuda Y, Koga N, Kuroki J, Hokama Y and Yoshimura H: Accumulation, excretion and effects on hepatic enzymes of polychlorinated quaterphenyl congeners in rats, J. Pharmacobio. Dyn., 8: 571-577, 1985.
- 4) Kashimoto T, Miyata H and Kunita N: The presence of polychlorinated quaterphenyls in the tissues of Yusho victims. Fd. Cosmet. Toxicol., 19: 335-340, 1981.
- 5) 飯田隆雄, 竹中重幸, 中川礼子, 深町和美, 高橋克巳, 旭 正一: 正常者の血液中ポリ塩化クアテルフェニル濃度, 福岡医誌 78, 305-308, 1987.
- 6) 前田浩一郎, 樫本 隆: 大阪府立公衆衛生研究所報告 食品衛生編 9:89, 1978.
- 7) 飯田隆雄, 深町和美, 竹中重幸, 中川礼子, 高橋克巳: ポリ塩化クアテルフェニルのキャピラリーガスクロマトグラフィーによる定量, 分析化学 37:230-235, 1988.
- 8) 大神太郎, 野中薫雄, 吉田彦太郎, 村山史男, 山下和徳, 益田宣弘: 油症患者の血液および皮脂脂肪組織中の polychlorinated biphenyls (PCB), polychlorinated quaterphenyls(PCQ) の濃度と性状について, 福岡医誌 78: 337-342, 1987.
- 9) 中川礼子, 高橋克巳: PCB 及びその関連化合物体内残留濃度の油症診断への適用に関する研究, 福岡医誌 82:280-294, 1991.
(受付 2005-4-5)