

## 国立環境研究所でのベトナム研修生 (Mr. Khanh) の研修報告

2019年12月1日 (本間作成)

1. 研修目的：フーカット医療センターで得られた出産時の血清中の主要ステロイドホルモンを液体クロマト/タンデム質量計 (LC-MS/MS) で一斉分析する。本測定器を所有している協力機関のベトナム国家大学 (ハノイ校) に、測定系を構築する目的で国家大学の職員に技術研修する。
2. 研修期間：2019年10月10日～11月26日
3. 研修場所：つくば環境研究所
4. 研修生：Nguyen Van Khanh
5. 指導者：中山 祥嗣、本間誠次郎、奥山光伸
6. 研修内容：
  - 1) 講義：下記の (1) ～ (5) についてテキストを作成し講義
    - (1) ステロイドホルモン (ステロイド) の生理作用
      - \* ステロイドの分類 (糖質ホルモン、鉱質ホルモン、男性ホルモン、女性ホルモン) とホルモン分泌器官・生体制御の仕組み、
      - \* 分類されたホルモンの生理・薬理作用、
      - \* 生理作用発現の仕組み
    - (2) ステロイドの化学
      - \* ステロイドの分析化学に必要な有機化学
      - \* ステロイドの命名法と立体化学
      - \* 微量定量に必要なステロイドの化学的誘導体作成法
      - \* 安定同位元素 (重水素、 $^{13}\text{C}$ ) 標識体の選定法
    - (3) 化学物質の定量バリデーション
      - \* 生体試料中のステロイド測定値の信頼性を確保する手段
      - \* 再現性試験法による信頼性確保法
      - \* 定量時の検量線、定量下限値の設定、回収率の求め方
      - \* 試料中の安定性と試料の保管法
    - (4) 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC-MS/MS) 理論と応用法
      - \* LC-MS/MS の特徴 (LC-MS および GC-MS との違い)
      - \* イオン源の最適化、プレカーサーイオンおよびプロダクトイオンの最適化
    - (5) 生体試料の扱い法
      - \* 液体クロマトグラフィーの分離法と最適化

- \* カートリッジカラム（逆相、順相、イオン）の特徴と利用法

## 2) 実践1 : LC-MS/MS の扱いと最適化

- \* LC の濃度勾配法による溶媒の設定条件法
- \* 分析用のクロマトカラムの選択
- \* イオン源の温度、ガス圧の最適化
- \* 9 種類のステロイドおよびそれに対応した内部標準品のプレカーサーイオンの探索法とプロダクトイオンのエネルギーの最適化

## 3) 実践2 . 標準品を用いた測定法の研修

- \* プロセス法に準じて 9 種類の検量線、精度管理と標準品の作成
- \* プロトコールに準じて内部標準品添加、抽出、精製、カートリッジカラムによる精製法の駆使
- \* 化学的誘導体作成時の内部標準品の取り扱い法

## 4) 実践3 . 微量測定のための血清の取り扱い法

- \* 研修に倣って自分でプロトコール作成
- \* プロトコールに沿って下記のように分析する血清を処理した。
- \* 血清に 9 種の内部標準品を一定量添加した試料を作成
- \* 試料から有機溶媒で抽出、抽出物を逆相カートリッジカラムで精製の手法。
- \* 精製物を自作のピコリン酸誘導試薬を作成し、誘導体形成の方法。
- \* 誘導体反応物から目的物の精製・単離する手法の取得

## 5) 実践4 : 定量バリデーションの取り組み

- \* 9 種類ステロイドホルモン測定 of 各検量線の作成
- \* 小児血清中の 9 種類ステロイドホルモン測定するために特異性を検索する。\* 0.1、0.2、0.3、0.4mL の血清および標準品の添加血清で定量下限値の検索
- \* 同時再現性試験、日差再現性試験、特異性試験を組み合わせで定量下限値を決定した。

## 6) 実践5 . 小児血清中ホルモン測定と測定データの検討法

- \* 約 150 検体の小児血清中の 9 種類ステロイドの定量分析を、LC-MS/MS で行った。
- \* 血清からの抽出・分離・精製中の操作ミスのため、再検討した。なお、ミスした測定データを測定バリデーションの再現性試験結果から吟味し、再測定することでミスの原因を明らかにした。