

厚生科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

プラスチック製医療用具に係る溶出物質の曝露量の評価に関する研究

平成13年度 分担研究報告書

1. 輸血バッグから溶出する内分泌攪乱物質の検討—
血液バッグから溶出する可塑剤の検討

分担研究者 佐藤温重

平成14（2002）年4月

厚生科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)
プラスチック製医療用具に係わる溶出物質の曝露量の評価に関する研究
分担研究報告書

血液バッグから溶出する可塑剤の検討

分担研究者	佐藤 温重	昭和大学歯学部歯科理工学教室
研究協力者	宮崎 隆	昭和大学歯学部歯科理工学教室
	玉置 幸道	昭和大学歯学部歯科理工学教室
	岡 秀一郎	昭和大学歯学部麻酔学教室
	本郷 敏雄	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
	諏訪 修司	日本医療機器材工業会
	井口 詔雄	(株)東レリサーチセンター

研究要旨:ポリ塩化ビニル(PVC)製血液バッグ中に保存した血液および血漿を輸血したときのフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)の患者曝露量を評価する目的で、PVC製血液バッグ中に血液、血漿を保存しバッグから溶出したDEHP等を経時的にガスクロマトグラフィー/質量分析法で分析定量した。採血直後の血液中のDEHPは検出限界以下であったが、PVC製血液バッグ中で4°C1週間保存した血液および血漿中(200ml/バッグ)のDEHP濃度はそれぞれ152~2078 ng/mlおよび203ng/mlであった。血液および血漿中にはDEHPから加水分解で生成するフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)が17.4 ng/mlおよび3.9 ng/ml存在した。DEHPの溶出量は保存期間に依存し増加し、血液における1、3週間の累積溶出量はそれぞれ415.6、540 μ g/バッグであった。溶出量から想定される患者のDEHP曝露量は輸血量に依存するが、3週間保存した血液を成人(体重50kg)に2.5L輸血したときのDEHP曝露量は135.0 μ g/kg/day、新生児(体重3kg)に200ml輸血したときのそれは181 μ g/kg/dayで、いずれも厚生労働省の設定した耐容1日摂取量40-140 μ g/kg/dayを超えると推定された。短期に大量輸血を必要とする危機的患者における輸血ではベネフィットを考慮すべきであるが、DEHPに高い感受性を示す患者に対するDEHP曝露量がTDIを超える量の輸血ではDEHP曝露量を低減する方策を検討するべきである。PVCには赤血球膜保護作用がありPVCを血液バッグとして使用することの妥当性については今後も検討が必要である。

A.研究目的

ポリ塩化ビニル(PVC)製医療用具から可塑剤フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)等、生殖毒性の疑いのある化学物質が微量溶出することが報告され、医療行為に伴うリスクとして注目されている¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。特にPVC製血液バッグでは溶出化学物質が直接血液中に移行し、また新生児を含むあらゆる年齢層の患者に短期あるいは長期に渡り適用されるため優

先して研究対象とすべき医療用具である。しかし、我が国においてはPVC製血液バッグ製品を実際に使用した際にどれ位の量のフタル酸エステル類が溶出し、患者が曝露されるかについて十分に調査されていない。

本研究では、国内流通製品のPVC製血液バッグ中にヒト血液および血漿を保存したとき溶出するフタル酸エステル類、すなわちDEHPおよびDEHPの分解産物で活性物質と考え

られているモノ-2-エチルヘキシル(MEHP)の溶出動態について検討した。また、得られた溶出量データから患者のDEHP曝露量の推定を行った。

B. 研究方法

B-1. 血液バッグおよび試薬類

市販のPVC製血液バッグ2製品を使用した。フタル酸エステル類の標準品、DEHP-d4、MEHP-d4は関東化学環境分析用を使用した。ヘキサンは関東化学フタル酸エステル試験用、アセトニトリルおよび精製水は関東化学高速液体クロマトグラフィー用、硫酸ナトリウムは関東化学残留農薬・PCB試験用を用いた。

B-2. 血液、血漿および溶出試験

血液は健康な26歳から31歳の男性5人から各200ml採血したものと、昭和大学病院・輸血部より入手した血液(以下保存血液)1バッグ(輸血用血液は輸血以外の目的に使用できないので、採血後25日間4℃に保存され使用期限切れとなったのものを入手)を使用した。血漿は昭和大学病院・輸血部より入手した凍結血漿5バッグ(採血後約4週間 -80℃にて保管)を使用した。

新鮮血液は採血直後一部を測定試料とし、他は5個の血液バッグAに各200ml注入して4℃に保管し、1および3週間後に測定試料5mlを採取した。保存血液は一部を測定試料とし、他は2個の血液バッグBに各160ml注入して4℃に保管し、1および2週間後に測定試料5mlを採取した。

血漿は解凍後一部を測定試料とし、他は3個の血液バッグBに各150ml注入して4℃に保管した。1、2、および3週後に各血液バッグから測定用に血漿5mlを採取した。

採取した全ての試料は直ちに遠心分離し上清をフタル酸エステル分析用試料とした。各分析点の試料数は3-5とした。分析用試料は凍結し分析を行うまで-80℃にて凍結保管

した。上記の操作は無菌的に行った。実験に用いた全てのガラス製器具はアセトンで2-3回洗浄してから乾熱滅菌(200℃、4時間)したものを使用した。

B-3. 血液、血漿試料中からのフタル酸エステル類回収法

DEHPの測定における前処理を以下のように行った。解凍した各分析用試料1mlにサロゲート物質 50ng、ヘキサン1mlを添加し攪拌しヘキサン層を採取した。水層には再度ヘキサン1mlを添加し操作を反復した。採取した2つのヘキサン層は無水硫酸ナトリウムで脱水した後アセトニトリル1mlを加え攪拌しアセトニトリル層を採取した。ヘキサン層にはアセトニトリル1mlを加え操作を反復した。採取したアセトニトリル層にはヘキサン1mlと蒸留水3mlを加え攪拌した後ヘキサン層を採取し無水硫酸ナトリウムで脱水しsyringe spike 50 ngを加えガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)用サンプルとした。MEHPの前処理を以下のように行った。試料1mlにサロゲート物質 50ng、ヘキサン1mlを添加し攪拌しヘキサン層を採取した。無水硫酸ナトリウムで脱水した後、10%trimethylsilyldiazomethaneヘキサン溶液0.5mlを加えメチル化しGC/MS/SIM試料とした。

操作ブランク試験として分析試料を用いずに、前処理後測定を行い検出されるフタル酸エステル類の濃度を調査した。また、添加回収試験として10ngのフタル酸エステル類標準物質を添加後前処理・測定を実施しそれぞれのフタル酸エステル類濃度を算出し、添加に対する測定値から測定精度を評価した。

B-4. GC/MS測定条件

図1および図2に示したGC/MS測定条件で測定した。

(倫理面への配慮)

血液提供者に対して研究の趣旨を説明し、提供された血液は研究以外の目的に使用しないこと、プライバシーに関してはこれを守秘することを説明した。血液提供者から全員から了解を得た。

C. 研究成果

1. 操作ブランク試験および 添加・回収試験

操作ブランク試験の結果、DEHP(平均値=3.8ng/mL)が検出された。そのブランク値の変動は、C.V.=13%であった。DEHPの変動については許容範囲内であると考えられた。

添加・回収試験の結果、DEHPについては、定量精度は130%となったが、操作ブランク値を差し引いた値と比較すると、定量精度はDEHP(13ng/mL-3.8ng/mL= 9.4ng/mL)で94%となり、ブランク値の影響を十分に差し引けていると考えられた。

また、添加・回収試験の結果から推定されるDEHPの検出下限値(標準偏差値の3倍値)は1.3ng/ml(C.V.=1.6)であった。

2. PVC製血液バッグからのフタル酸エステル類の溶出

新鮮血液:5名の男子から採血した直後の血液についてフタル酸エステル類を調査した結果DEHPは4試料で検出されなかった。1試料で 7 ± 2 ng/ml検出されたが、操作中の汚染によるものとし破棄した。血液をPVC製血液バッグに200ml/バッグ注入し4°Cで1および3週間保存した後、血液中にはDEHPが、 2078 ± 592 、および 2700 ± 591 ng/ml、MEHPが 17.4 ± 2.9 、および 15.3 ± 6.8 ng/ml検出された(表1)。DEHP溶出量は4°C1および3週間保存下で 415.6 および 540.0 μ g/バッグであった。また4°C、1および3週間保存した血液中のMEHP量は 3.48 および 3.10 μ g/バッグであった。PVC製血液バッグから血液中へのDEHP総溶出量は、DEHP量と分解産物MEHP量との総

量と考えられるので、4°C、1週間保存で 419.1 μ g/バッグ、3週間保存で 543.1 μ g/バッグとなった。

保存血液: 入手した保存血液中のDEHP濃度は、溶出試験開始前において 378 ± 83 ng/mlであった(表2)。この血液をPVC製血液バッグBに160ml/バッグ注入し4°C下で1および2週間保存した後のDEHP濃度は 569 ± 32 および 654 ± 27 ng/mlであった。実験開始時のDEHPの濃度を差し引いた実験期間中に溶出したDEHPは、1および2週間保存でそれぞれ 190 ± 78 、 275 ± 115 ng/ml で保存期間とともに高くなっていた。PVC製輸血バッグから保存血液中へのDEHP溶出量は4°C、1および2週間保存でそれぞれ 30.4 、および 44.0 μ g/バッグであった(表1)。保存血液についてMEHPは計測しなかった。

血漿: 入手した凍結血漿を解凍した時点でDEHP等が検出された。血漿中のDEHPおよびMEHPの濃度は 103 ± 5 ng/mlおよび 12.5 ± 2.2 ng/mlであった(表3)。この血漿をPVC製血液バッグBに150ml/バッグ移し、4°C 1、2および3週間保存した後のDEHP濃度は、それぞれ 373 ± 102 、 580 ± 90 および 900 ± 216 ng/ml であった。また1および2週間保存後MEHPの濃度は 16.3 ± 2.6 、 22.7 ± 1.2 ng/mlであった。実験開始時のフタル酸エステル類の濃度を差し引いた1、2および3週間後のDEHP濃度は 270 ± 100 、 447 ± 86 および 797 ± 213 ng/ml であった。MEHP濃度は1および2週後に 3.9 ± 2.1 、 10.2 ± 1.1 ng/mlであった(表3)。DEHP、MEHPいずれも 保存期間に従い濃度が増加していた。血液バッグから血漿中への溶出量は4°C 1、2、および3週間保存下で 40.5 、 67.1 、 119.6 μ g/バッグであった(表3)。DEHP量にMEHP量を加えたDEHP総溶出量は1および2週間後で 41.1 および 68.6 μ g/バッグであった。

血漿は凍結して保存するので、その間のD

EHPの溶出は無視できる程度であると考えられるが、未凍結では溶出がある。未凍結血漿におけるPVC製血液バッグからのDEHPの溶出動態は、保存血液のそれに類似していた。

3. 輸血による患者のDEHP曝露量

本研究で得られたDEHP溶出量は、血液バッグA、Bおよび血液の保存期間で異なっていたが、それらの最大値をもとにDEHP曝露量を推定した。

輸血に伴う患者のDEHP曝露量は輸血量に依存するが、厚生労働省の設定した耐容1日摂取量TDI($40\sim 140\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)⁵⁾下限値に達する輸血量を計算すると、3週間保存血の輸血では、成人(体重50kg)の場合約740ml以上、また小児(体重11kg)では約163ml以上の輸血でTDIの下限値に達すると推定された。

成人(体重50kg)外傷患者にPVC製血液バッグ中3週間保存血を2.5L輸血したと仮定すると患者のDEHP曝露量は $135.0\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ となる。新生児(体重3kg)患者に200ml輸血した場合の曝露量は $181.0\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{kg}$ となる。いずれも厚生労働省の設定したTDIと同等のレベルになった。

血漿におけるPVC製血液バッグからのDEHPの溶出動態は、4℃保存では保存血液と類似していた。しかし実際には血漿は凍結して保存するためDEHPの溶出は極めて少ないと考えられる。曝露量評価には解凍直後のDEHP量にMEHP量を加えたDEHP総溶出量 $23\ \mu\text{g}$ /バッグをもとに行うべきである。

MEHPの曝露量の評価は、そのTDIが未決定であり省略した。

D. 考察

本研究で採用したフタル酸エステル類の分析法は、操作ブランク試験・回収試験の結果から細心の注意を払って試験を実施しても、汚染を回避できないフタル酸エステル類もあ

り、測定精度を低下させている原因となっていた。定量精度に関しては、操作ブランク値を差し引くことで、真の定量値を得られることが、今回の精度管理試験から明らかとなった。ただし、操作ブランク値は、大きく変動する可能性があるため、処理単位毎に少なくとも操作ブランク試験を1点実施し、そのブランク値を差し引く事で真の値を得られるものと考えた。

PVC製血液バッグから保存中の血液および血漿へDEHPが溶出した。溶出量は保存期間に依存しており、保存期間の長いものではDEHP含有量が比較的多量であった。DEHPの一部は血液、血漿中で酵素作用等によりモノ体MEHPに分解していた。しかしMEHPは量的には少量で1週間保存で $3.9\sim 17.4\text{ng}/\text{ml}$ であった。MEHPはDEHPの代謝産物と考えられており、その毒性はDEHPより強力である。従ってMEHPの含有量は重要である。

PVC製血液バッグから血液および血液製剤中にDEHPが溶出することはすでに報告されており、それによると全血を4℃、3週間以内の保存した場合DEHP溶出量は $24\sim 110\ \text{mg}/\text{L}$ 、血漿を4℃、1週間保存した場合 $110\ \text{mg}/\text{L}$ 以下、3週間保存した場合は $100\sim 275\ \text{mg}/\text{L}$ 、である。MEHP含有量は全血で $5\text{mg}/\text{L}$ 以下である⁹⁾。本研究で調査した血液バッグに関してはこれらの報告されているDEHP溶出量に比較して少なかった。PVC製血液バッグからDEHP溶出量は、血液バッグ自体の保存状態等により変動すると考えられる。

国内流通製品におけるDEHP曝露量の上限值は、成人(体重50kg)患者で740ml以下、小児(体重11kg)患者で163ml以下の輸血では厚生労働省の設定したTDI値($40\sim 140\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)の下限値を超えないので比較的少量の輸血では問題がないと考えられる。

輸血療法には短期大量輸血と長期間少量輸血がある。短期の大量輸血には急激な失血、手術中の患者、新生児置換輸血等があるが、いずれもDEHP曝露量は、比較的高い値

となると推定される。白血病、再生不良性貧血等の長期間の少量輸血ではDEHPの曝露量は低いと考えられる。短期間の大量輸血を必要とする患者では、DEHP曝露量がTDIを超えたとしても、患者の危機的状況、また、DEHP被曝期間が短いことを考慮すると、直ちに代替品に切り替えることが必須とは言い難い。

通常の輸血では全血に代えて赤血球、血小板、血漿の輸血が行われている。本研究では血液製剤としては血漿のみを対象とし、PVC製血液容器に保存した濃縮赤血球、血小板についてDEHPの溶出量を計測しなかったが、報告によると濃縮赤血液のDEHP濃度は血漿のDEHP濃度の約5倍である¹⁾。PVC製血液バッグにこれら血液製剤を保存した時の溶出量を調査しておく必要がある。

乳児の交換輸血では血漿と濃縮赤血球が使用されている。交換輸血を受けた新生児のDEHP推定曝露量は比較的多量になるので、曝露量を低下させる処置が検討されるべきである。

注射器を使用しバッグから血液を採取し、患者に注入する場合は、注入セットのPVCチューブからのDEHPの溶出を考慮する必要はないが、注入ポンプを使用して輸血を行う場合には、PVCチューブからのDEHPの溶出量が相当量ある¹⁾。DEHPはPVC製品を使用する種々の医療行為による複合曝露がある。また医療行為だけでなく玩具、建築材、衣服、食物、室内空気等からの複合曝露があるので総合的曝露量評価が必要と考えられる。

DEHPには赤血球保護作用があり、PVCを血液バッグに使用することの有用性が指摘されている。血液および血液製剤の容器としてPVCの有用性を視野に入れつつ、今後ともPVCを使用することの妥当性について検討する必要がある。

E. 結論

国内で流通するPVC製血液バッグからそれ

らの内容物である血液および血漿中に溶出するフタル酸エステル類について調査し以下の結果をえた。

1. PVC製血液バッグから血液、血漿中にDEHPが溶出していた。4℃で1週間保存した血液および血漿中(200ml/バッグ)のDEHP濃度はそれぞれ152~2078 ng/mlおよび203g/mlであった。血液へのDEHPの溶出量は、4℃では保存期間に依存し増加し、血液におけるDEHPの1および3週間後の溶出量の最大値は515.6および540.0 μg/バッグであった。

2. PVC製血液バッグに保存した血液および血漿中にDEHPの分解産物のMEHPが微量検出され、1週間保存後の血液及び血漿中に17.4±2.9および3.9±2.1ng/ml存在した。

3. PVC製血液バッグ保存した血液の輸血によるDEHP推定曝露量は輸血量に依存する。成人(体重50kg)患者に2.5L輸血したときDEHP推定曝露量の上限值は、135.0 μg/kg/day、新生児(体重3kg)患者に200mlの輸血をしたときの曝露量は181 μg/kg/dayで、厚生労働省の設定した耐容1日摂取量(TDI)40~140 μg/kg/day以上となった。

4. 採血直後の血液では、DEHPは検出限界以下であったが、入手した保存血液では、DEHPが378ng/ml、凍結血漿ではDEHPが105 ng/ml、MEHPが12.5 ng/ml含まれていた。

5. 短期の大量輸血を必要とする患者では、TDIを越えたとしても危機的状況を考慮すべきであるが、DEHPに対して高い感受性を示す患者への曝露量がTDIを超える量の輸血については、曝露量低減の方策をとるべきである。DEHPには赤血球保護作用があり、PVCを血液バッグとして使用することの妥当性について今後とも検討する必要がある。

本研究の結果からPVC製血液バッグの国内流通製品使用におけるDEHP曝露に関する安全性と問題点および適正使用に必要なデータが得られた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

該当なし。

I. 参考文献

1) Center for Devices and Radiological Health, U.S. Food and Drug Administration: Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices. 2001.

2) Health Canada:DEHP in Medical Devices. An Exposure and Toxicity Assessment, July 2001, Revised, February,2002.

3) European Chemicals Bureau: Risk Assessment of Bis(2-ethylhexyl)phthalate. Final report, Chapters 4-6, September,2001.

4) Huber, W.W., Grasl-Kraupp, B. and Schulte-Hermann, R.: Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its

implications on human risk. Critical Reviews in Toxicology, 26(4):365-481, 1996.

5) 厚生労働省 : Web at http://www1.mhlw.go.jp/shingi/s0006/txt/s0614-1_13.txt

図1.フタル酸ジ-エチルヘキシルの測定方法

GC		
カラム	SGE社、BPX-5 25m×0.22mm I.D.×0.25 μm Film	
カラム温度	60℃(0.05min)－10℃/min－300℃(3min)	
注入口温度	250℃	
キャリアーガス	He(1.4mL/min)	
インレット温度	260℃	
注入方法	スプリットレス注入法(1 μL)	
MS		
イオン化法	EI	
イオン化電圧	70eV	
イオン源温度	250℃	
検出モード	SIM	
定量イオン		
対象物質の測定イオン		
測定対象物質	定量用イオン	確認用イオン
フタル酸ジエチル	149	177
フタル酸ジ-n-プロピル	149	209
フタル酸ジ-n-ブチル	149	223
フタル酸ジベンチル	149	237
フタル酸ジヘキシル	149	251
フタル酸ブチルベンジル	149	206
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル	149	167
フタル酸ジシクロヘキシル	149	167
サロゲート物質の測定イオン		
サロゲート物質	定量用イオン	確認用イオン
フタル酸ジエチル-d4	153	
フタル酸ジ-n-プロピル-d4	153	
フタル酸ジ-n-ブチル-d4	153	
フタル酸ジベンチル-d4	153	
フタル酸ジ-n-ヘキシル	153	
フタル酸ブチルベンジル-d4	153	
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル-d4	153	
フタル酸ジシクロヘキシル-d4	153	
シリンジスパイク物質の測定イオン		
シリンジスパイク物質	定量用イオン	確認用イオン
フタル酸ジ-n-オクチル-d4	153	

図2.フタル酸モノ-2-エチルヘキシルの測定方法

GC/MS		
GC	Trace(サーモクレスト) Voyager(サーモクレスト)	
GC条件		
カラム	SGE社、BPX-5 25m×0.22mm I.D.×0.25 μm Film	
カラム温度	60℃(2min)→10℃/min→300℃(10min)	
注入方法	スプリットレス	
注入口温度	250℃	
注入量	1 μL	
キャリアーガス	He(1.4mL/min)	
インレット温度	280℃	
MS条件		
イオン化法EI		
イオン化電圧	70eV	
イオン源温度	250℃	
検出モードSIM		
定量イオン		
測定対象物質の測定イオン		
対象物質	定量イオン	確認イオン
Mono-2-ethylhexylphthalate	163	149
内標準物質物質の測定イオン		
内標準物質物質	定量イオン	
Di-n-butylphthalate-d4	153	
シリンジスパイク物質の測定イオン		
シリンジスパイク物質	定量イオン	
Di-n-octylphthalate-d4	153	

表1. 血液中のPVC製血液バッグ由来のDEHP

	血液 バッグ	保存 期間 w ¹⁾	温度 ℃	DEHP		MEHP		DEHP 総溶出量 ²⁾ i g/bag
				濃度 ng/ml	溶出量 i g/bag	濃度 ng/ml	溶出量 i g/bag	
血液	A	0		0	0	0		
200ml/bag		1	4	2078±592	415.6	17.4±2.9	3.48	419.1
		3	4	2700±591	540.0	15.3±6.8	3.10	543.1
保存血液	B	1	4	190±78	30.4	-	-	-
160ml/bag		2	4	275±115	44.0	-	-	-

¹⁾ w : weeks ²⁾ DEHP+MEHP

表2. 入手時の血液および血漿中のDEHPおよびMEHP

	保存期間	℃	DEHP ng/ml	MEHP ng/ml
保存血液	25 d	4	378±83	-
凍結血漿	4 w	-80	103±5	12.5±2.2
新鮮血液	0 d		0	0

w : weeks , d : days

表3. 血漿中のPVC製血液バッグ由来のDEHPおよびMEHP

	血液 バッグ	保存 期間 w ¹⁾	温度 ℃	DEHP		MEHP		DEHP 総溶出量 ²⁾ i g/bag
				濃度 ng/ml	溶出量 i g/bag	濃度 ng/ml	溶出量 i g/bag	
血漿	B	1	4	270±100	40.5	3.9±2.1	0.58	41.1
150ml/bag		2	4	447±86	67.1	10.2±1.1	1.53	68.6
		3	4	797±213	119.6	-	-	-

¹⁾ w : weeks ²⁾ DEHP+MEHP

厚生科学研究費補助金
医薬安全総合研究事業

プラスチック製医療用具に係る溶出物質の曝露量の評価に関する研究

平成13年度 分担研究報告書

2. 血液接触型プラスチック製医療用具からの可塑剤の溶出評価に関する研究

分担研究者 配島由二

平成14（2002）年4月

プラスチック製医療用具に係わる溶出物質の曝露量の評価に関する研究

分担研究報告書

血液接触型プラスチック製医療用具からの可塑剤の溶出評価に関する研究

分担研究者 萩島由二 国立医薬品食品衛生研究所療品部第一室

研究要旨：本研究では、血液接触型プラスチック製医療用具のうち、可塑剤の溶出が懸念される PVC 製チューブを構成部品としている用具として血液透析回路および人工心肺回路を選択し、臨床の場における実際の使用状況に近似させた条件下においてフタル酸エステル溶出試験を行った。その結果、血液透析回路からの DEHP 溶出は血液循環時間に比例して増大し、一回の血液透析に要する 4 時間循環後の DEHP 総溶出量は 7.3 mg であることが明らかになった。血中に存在する酵素の作用や保存中の加水分解などにより DEHP から誘導される MEHP 量も血液循環時間に比例して増加したが、その検出量は比較的低く、4 時間循環後の総検出量は 324 µg であった。同様に、人工心肺回路からの DEHP 溶出も血液循環時間に比例して増加し、人工心肺回路用ノンコート PVC 製チューブからは 6 時間の血液循環により、総量として 7.5 - 12.1 mg の DEHP が溶出されることが明らかになった。また、同チューブからの DEHP 溶出は、チューブ内面を共有結合的にヘパリンコートすることにより半減できることも確認された。血液透析回路の場合と同様、MEHP の検出量は比較的低く、6 時間循環後の MEHP 総検出量はノンコート製品で 203.5 - 352.3 µg、ヘパリンコート製品で 124.7 µg（共有結合タイプ）および 343.7 µg（イオン結合タイプ）であることが明らかとなった。

A. 研究目的

フタル酸エステルは食料品の包装材および医療器具など多くのプラスチック製品の可塑剤として広く利用されており、中でも、フタル酸ジ 2-エチルヘキシル（DEHP）の使用量が多い。ヒトへの暴露としては、各種食品中、食品包装材からの溶出液中、血液保存バックや血液透析器由来の血清中に検出されている。フタル酸エステルの毒性としては、肝ガンの誘発および生殖・発生毒性が明らかとされており、その活性本体は加水分解物であるフタル酸モノエステルであることが判明している。但し、肝ガ

ンの誘発については、齧歯類で特異的に強く現れる生体影響であり、ヒトに対する発ガン性はないものと考えられている。

フタル酸エステルはエストロゲン様作用を示す内分泌攪乱物質の可能性が指摘されていたが、現段階では、少なくとも *in vivo* おいてエストロゲン様作用は示さないものと考えられている。活性本体であるモノエステル体にもエストロゲン様作用はないと報告されている。しかし、フタル酸エステルは雄ラットに投与した時に抗アンドロゲン様作用が認められ、雌ラットに投与した時には、血中 17β -estradiol 濃度の低下

が引き起こされることが報告されている。また、妊娠後半のラットに投与すると、アンドロゲン受容体を介さない機構で典型的な抗アンドロゲン作用が発現し、この作用は胚致死作用および生殖器官以外の催奇形性作用より低い量で発現することが示されている。これらのことから、一部のフタル酸エステルは齧歯類において内分泌攪乱作用を示すと判断することができる。しかし、生殖器以外の奇形発現に関しては、その機構が不明であり、内分泌攪乱作用によるものと判断できる証拠は得られておらず、そのメカニズムの解明が待たれている。

化学物質のヒトに対するリスク評価を行うためには、化学物質の各種毒性に加え、その暴露量および暴露経路などを明らかにする必要がある。医療用具から溶出する化学物質の暴露量の全体的評価を行うためには、実際の使用条件下において医療用具と接触する体液または血液などを利用した溶出試験を行う必要がある。しかし、これらの事項に関しては、現時点では断片的なデータが報告されているのみであり、不明な点が多い。そこで、本研究では、血液と接触するプラスチック製医療用具のうち、DEHP の溶出が懸念される代表的な製品として塩ビ製チューブを構成部品としている血液透析回路および人工心肺回路を試験対象品として選択し、実際の使用条件に近似させた *in vitro* 試験系において溶出する DEHP 量を評価した。また、DEHP の活性本体は酵素分解や加水分解により生じるモノエステル体であることから、フタル酸モノ 2-エチルヘキシル (MEHP) の定量も合わせて行った。

B. 研究方法

1. 循環溶媒、試薬および器具類

血液透析回路および人工心肺回路からのフタル酸エステル溶出実験は実験前日に採取したヘパリン添加牛血液 (10,000 単位/L) を使用して行った。DEHP、DEHP-d₄ およびフルオランテン-d₁₀ (F-d₁₀) 標準品は関東化学、MEHP および MEHP-d₄ 標準品は林純薬から購入した。ヘキサン、およびメタノールはフタル酸エステル分析用グレード (関東化学)、ジエチルエーテルはダイオキシソニ分析用グレード (和光純薬)、また、血液希釈用の蒸留水としては HPLC グレード (和光純薬) を使用した。脱水用試薬としては、PCB・フタル酸試験用無水硫酸ナトリウム (和光純薬) を用いた。食塩および実験に用いた全てのテフロン製、ガラス製、金属製器具類は 250°C で 10 時間以上焼成した後に使用した。

2. 試験対象製品および溶出実験

図 1 に示したように、血液透析回路は、A 社製人工腎臓用血液回路 (PVC 製: 内径 3.5 mm) に B 社製血液透析器 (中空糸材質 = ポリエーテルスルホン, ハウジング材質 = ポリカーボネート, 膜面積 = 1.5 m²) を接続して構築した (回路内血液充填量 = 約 140 ml, PVC 製品内表面積 = 約 950 cm²)。同回路に B 社製透析装置を使用し、37°C の恒温槽を経由して 5L の牛血液 (Htc. = 30%, TP = 5.7 - 5.9 g/dL) を 200 ml/min の流速で循環させた。透析液としては、生理食塩水を使用し、500 ml/min の流速で循環させた。この際、実際の使用条件に合致させるため、15 ml/min の割

合にて除水を行うと共に、循環血液のヘマトクリット値を調整するため同量の補液を行った。また、フタル酸エステル溶出に関する除水の効果を評価するため、除水を行わない抽出試験を対照として行った。循環血液の採取は0, 30, 60, 120 および 240 分毎に行った。抽出実験はサンプル数 $n = 3$ で行った。

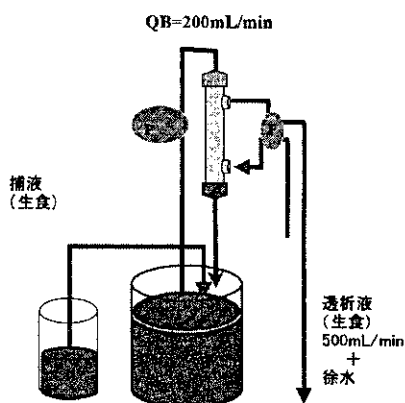


図1. 血液透析回路からの DEHP 抽出実験

図2に示したように、人工心肺回路はポリカーボネート製貯血槽、Sarns 8000 ローラーポンプ、冷温水循環装置/キャピオックス SX10 人工肺熱交換器および PVC 製チューブ2本 (インレット側 = 2 m, アウトレット側 = 1 m) により構築した。PVC 製チューブとしては、C社製およびD社製のノンコート製品 (C社製: 内径 x 外径 = 6 x 9 m, D社製: 内径 x 肉厚 = 3/8 x 3/32) とヘパリンコート製品 (C社製 = 共有結合タイプ, D社製 = イオン結合タイプ) を使用した。回路への血液循環は、貯血槽に 500 ml の牛血液 (Htc. = 36 ± 3%) を入れ、37°C で 1.5 L/min (体重 11–12 kg の小児に適用する際の流速) の流速で行った。抽出実験は各 PVC 製チューブ毎に $n = 3$ のサンプル数で行った。循環血液の採取

は 0, 1, 3, 6 時間毎に行った。

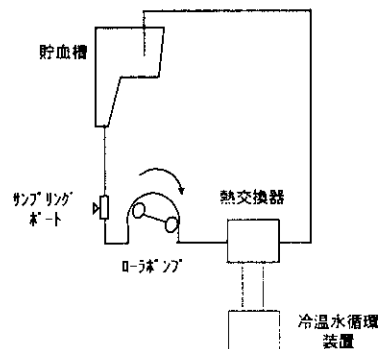


図2. 人工心肺回路からの DEHP 抽出実験

3. 血液からのフタル酸エステル回収法

図3に示したように、DEHPの回収は、まず、循環血液 20 μ l (人工心肺回路試料) または 100 μ l (血液透析回路試料) をサンプリングし、最終容量 1 ml になるように蒸留水を加え、内部標準物質 (DEHP-d₄) および食塩を添加した後、良く攪拌し 30 分間放置した。次いで、ヘキサンを添加し、20 分間振とう抽出し、遠心分離 (3,000 rpm x 10 min) 後、ヘキサン層を採取し、無水硫酸ナトリウムで脱水して GC-MS 用サンプルを調製した。

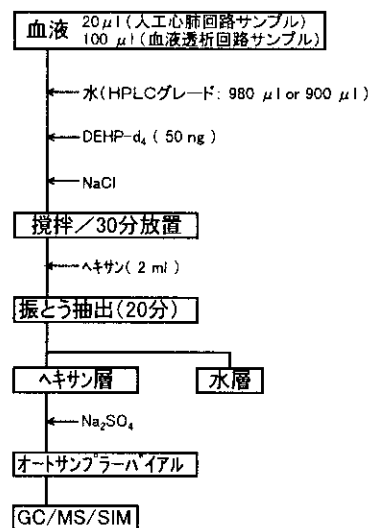


図3. 血液からの DEHP 回収方法

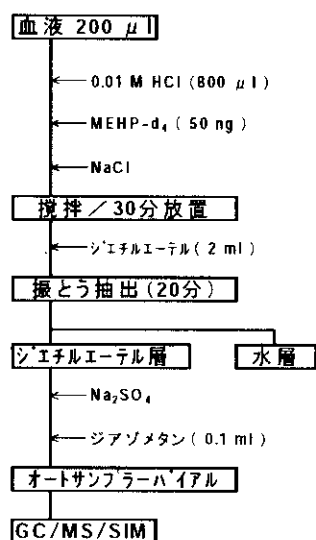


図 4. 血液からの MEHP 回収方法

MEHP の回収は、いずれの試料ともに 200 µl の血液を使用し、0.01M HCl により最終容量 1 ml に希釈後、食塩および内部標準物質 (MEHP-d₄) を加え、良く攪拌し、30 分放置した。次いで、ジエチルエーテルを加えて 20 分間振とう抽出し、遠心分離後、有機層を採取し、無水硫酸ナトリウムによる脱水およびジアゾメタンによるメチル化を行い GC-MS 用サンプルを調製した (図 4)。

GC-MS	
GC	HP 8890 Series GC System
検出器	HP 8921 Series detector
MS	JFO1 JM5700 (質量比電圧分解質量分析計)
GC条件	
カラム	GC EBPX 5 (0.22 mm × 25 m)
カラム温度	320°C - 2 分間 - 10°C / 分間 - 300°C
注入方式	プログラムリニア
注入口温度	250°C
検出器	Zn
キャリアガス	ヘリウム 1 ml / min
GC 検出器温度	280°C
MS条件	
イオン化法	CI positive
イオン化電圧	70 eV
イオン化電流	100 µA
イオン源温度	250°C
検出器	SEM
検出器温度	50 °C
待ち時間	20 ms
検出器温度	20 °C
測定対象物質の測定条件	
DEHP	質量比電圧 148.0240
DEHP-d ₄	163.0492
MEHP	163.0395 (標準物質)
MEHP-d ₄	167.0643 (標準物質)
PFK	212.1410
PFK	168.9888
データ解析ソフト	
	TOCO

図 5. GC-MS 分析条件一覧

4. GC-MS 分析条件

図 5 に GC-MS 分析条件を示した。質量

分析装置としては磁場型高分解能質量分析計 (分解能 5,000) を使用した。得られた SIM クロマトは、テキスト変換後、FUMI (Function of Mutual Information) 理論を実践するプログラム TOCO (Total Optimization of Chemical Operations) を使用して解析した。

5. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト由来の組織、臓器、細胞および血液などを使用していないため、特段、倫理面に配慮していない。

C. 研究成果

1. 検量線の作成と分析精度

DEHP および MEHP 定量用検量線として、0 - 200 ppb の濃度範囲において DEHP-d₄ および MEHP-d₄ を内部標準物質

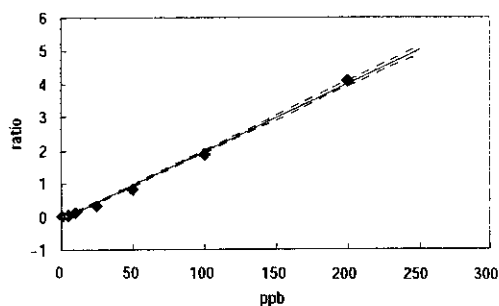


図 6. DEHP/DEHP-d₄ 検量線 (0 - 200 ppb)

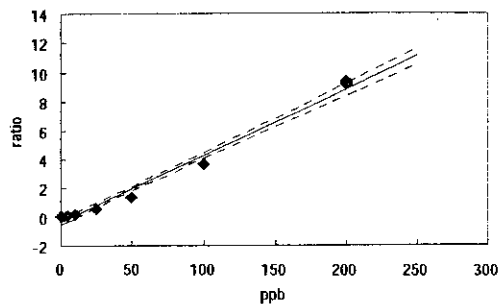


図 7. MEHP/MEHP-d₄ 検量線 (0 - 200 ppb)

とした検量線を作製した。図 6 および図 7 に示したように、DEHP/DEHP-d₄ および MEHP/MEHP-d₄ 検量線ともに、低濃度領域で検量線の傾きが低下する傾向が認められた。両検量線を 0 – 200 ppb の濃度範囲で作製した場合の相関係数は、DEHP/DEHP-d₄ 検量線が 0.998、MEHP/MEHP-d₄ 検量線が 0.992 であった。また、両検量線の 95%信頼区間（波線表示部分）も比較的広く、精度に問題があることが認め

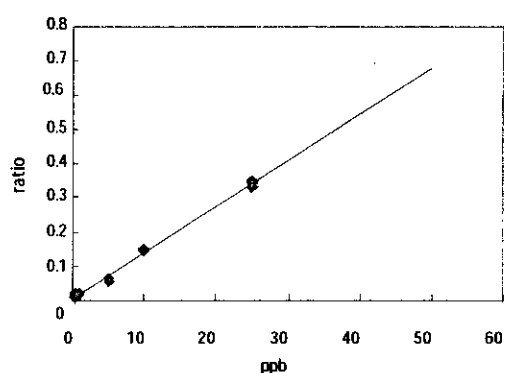


図 8. DEHP/DEHP-d₄ 検量線 (0 – 25 ppb)

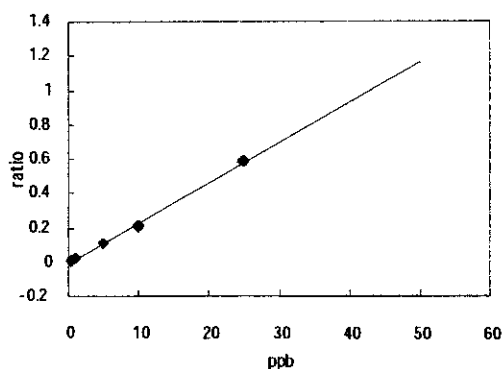


図 9. MEHP/MEHP-d₄ 検量線 (0 – 25 ppb)

られたことから、両検量線ともに低濃度領域 (0 – 25 ppb) と高濃度領域 (25 – 200 ppb) に分けて作製した。その結果、低濃度領域用検量線の相関係数は DEHP/

DEHP-d₄ 検量線および MEHP/MEHP-d₄ 検量線ともに 0.999 となり、また、95%信頼区間も十分狭く、定量精度が大きく改善された (図 8, 9)。また、高濃度領域用検量線の精度も十分高いことが確認された。これらのデータから、FUMI 理論により計算した機械的な検出限界 (LOD) は DEHP が 0.2024 ppb、MEHP が 0.0380 ppb であった。また、両物質の定量限界 (LOQ) は、それぞれ 0.6748 ppb (DEHP) および 0.1266 ppb (MEHP) であった。

絶対検量線を利用して装置由来のバックグラウンドを含んだ溶媒バックグラウンドを測定した結果、血液からの DEHP 回収に使用したヘキサンからは 0.71 ppb の DEHP が検出された。また、50 ppb の DEHP-d₄ ヘキサン溶液からは、2.4 ± 0.54% の DEHP が検出された (図 10)。このバックグラウンドは装置バックグラウンド、溶媒バックグラウンドおよび DEHP-d₄ 標準品に含まれている DEHP 量を反映していることから、同値を利用して、各実験における定量値のブランク補正を行うこととした。また、50 ppb の DEHP-d₄ を内部標準物質として使用した際の DEHP の実質的な LOD および LOQ を本バックグラウンド値から算出すると、それぞれ 2.01 ppb および 3.90 ppb となる。

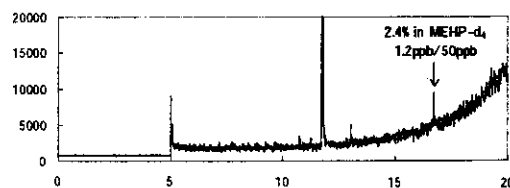


図 10. DEHP 分析に関するバックグラウンド

一方、MEHP の回収に使用したジエチルエーテルからは 1.59 ppb の DEHP が検出されたが、MEHP は殆ど検出されな

った。50 ppb の MEHP-d₄ ジエチルエーテル溶液からは 0.16 ± 0.046% の MEHP が検出されたことから、50 ppb の MEHP-d₄ を内部標準物質として使用した際の MEHP の実質的な LOD は 0.149 ppb、LOQ は 0.31 ppb と算出された (図 11)。また、DEHP と同様、本バックグラウンド値を利用して各実験における定量値のブランク補正を行うこととした。

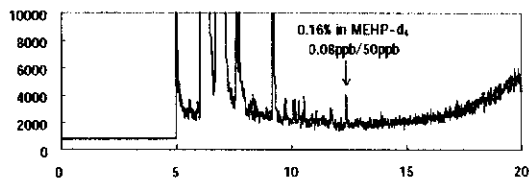


図 11. MEHP 分析に関するバックグラウンド

血液からの DEHP および MEHP 回収率を評価するため、F-d₁₀ を内部標準物質として、0 - 200 ppb の濃度範囲において DEHP-d₄/F-d₁₀ および MEHP-d₄/F-d₁₀ 検量線を作製した。DEHP-d₄/F-d₁₀ 検量線の相関係数は、0 - 200 ppb の濃度範囲で 0.999 であった。一方、MEHP-d₄/F-d₁₀ 検量線は低濃度領域で傾きの低下が認められたことから、先と同様、低濃度領域用検量線と高濃度領域用検量線を分けて作製し、定量精度を高めた (相関係数 0.999)。

2. 血液からの回収率

水で 10 倍希釈した牛血液に 40 ng の DEHP-d₄ を添加し、ヘキサン (2 ml) で抽出後、F-d₁₀ をスパイク物質として回収率を検討した結果、DEHP-d₄ の回収率は比較的良好であり、90.1 ± 6.8% であった。また、ヘキサンの代わりにジエチルエーテルを使用しても高回収率が得られることも確認されたが、DEHP 検出量に関するジ

エチルエーテルのバックグラウンドはヘキサンの 2 倍以上であることから、血液からの DEHP 回収にはヘキサンを使用することにした。一方、水または 0.01M HCl を使用して調製した 10 倍希釈血液に 40 ng の MEHP-d₄ を添加して同様の実験を行った結果、ヘキサン抽出では水希釈および 0.01M HCl 希釈時ともに、MEHP-d₄ は殆ど回収されなかった。しかし、0.01M HCl 酸性下、ジエチルエーテルを使用して抽出すると回収率の飛躍的な改善が見られ、その際の MEHP-d₄ 回収率は 72.4 ± 2.47% であった。それ故、血液からの MEHP 回収は 0.01M HCl 酸性下、ジエチルエーテルを使用して行うこととした。

3. 血液透析回路からの可塑剤溶出評価

血液透析回路からの DEHP 溶出実験は、臨床の場合における同装置の代表的な使用条件と合致させて行った (図 1)。実験に使用した牛血液はバックグラウンドとして、150 - 400 ppb 程度の DEHP を含み、血液ロット毎に DEHP 含有量に相違が認められた。図 12 に除水処理を施した条件で血液透析回路に牛血液 (5L) を循環させた際の DEHP 溶出曲線を示した。同図中、横軸

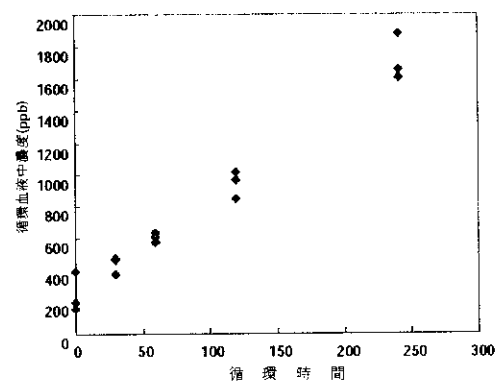


図 12. 血液透析回路からの DEHP 溶出曲線 (1)

は循環時間（分）、縦軸は循環血液中の DEHP 濃度を ppb 単位で表示している。

血液透析回路からの DEHP 溶出は循環時間に比例して増加し、30, 60, 120 および 240 分循環時、循環血液からは、それぞれ 441.1 ± 55.5 ppb、 606.2 ± 28.4 ppb、 949.9 ± 85.3 ppb および $1,717.8 \pm 147.4$ ppb の DEHP が検出された（図 12）。通常の血液透析に要する 240 分循環時の DEHP 検出量から血液バックグラウンド（ 248.9 ± 123.6 ppb）を差し引き、使用した血液量（5 L）を乗じて循環血液中に溶出した DEHP の絶対量を算出すると平均値で 7.3 mg となる。同様の条件下において循環実験を行った際の MEHP 検出動態を図 13 に示した。

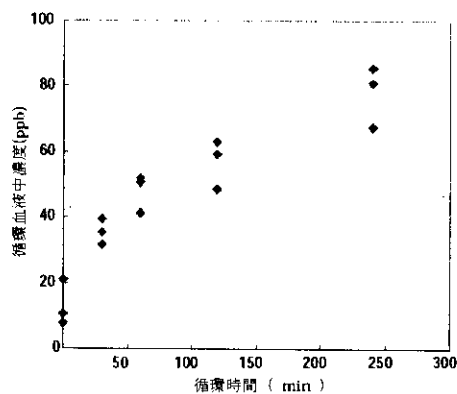


図 13. 血液透析回路循環血液からの MEHP 検出動態 (1)

本実験において検出される MEHP 量は、可塑剤として使用されている DEHP の不純物として PVC 製品から溶出する MEHP 量と血液中において酵素分解や加水分解により生じた MEHP 量の総和と考えられる。DEHP と同様、MEHP 検出量も循環時間に比例して増加し、循環開始後 30, 60, 120 および 240 分における循環血液中の MEHP 濃度は、それぞれ 35.6 ± 4.0 ppb、 48.1 ± 4.8

ppb、 57.2 ± 7.5 ppb および 78.1 ± 9.2 ppb であった（血液バックグラウンド 13.3 ± 6.9 ppb）。循環血液中濃度から換算すると、240 分循環時における MEHP の総検出量は平均値 $324 \mu\text{g}$ である。

血液透析回路からのフタル酸エステル溶出に対する除水の効果を検討するため、除水処理を行わない条件下において循環実験を行った際の DEHP 溶出挙動および MEHP 検出動態を追跡した。その結果、図 14 および図 15 に示したように、240 分循環時における循環血液中 DEHP 濃度および MEHP 濃度は、それぞれ $1,741.8 \pm 65.1$ ppb および 81.5 ± 6.0 ppb であり、除

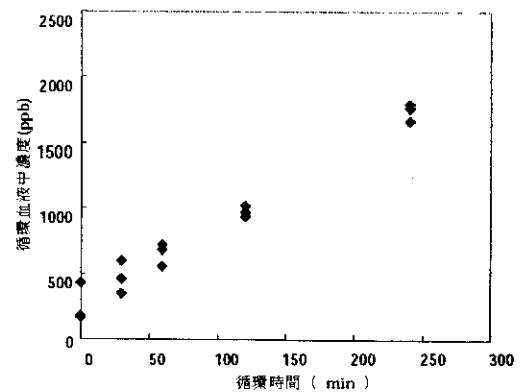


図 14. 血液透析回路からの DEHP 溶出曲線 (2)

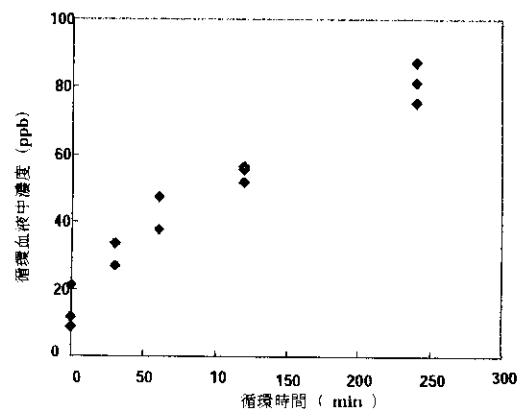


図 15. 血液透析回路循環血液からの MEHP 検出動態 (2)

水処理を施した際の検出量と比較して有意差が認められなかった。このことから、本実験系における除水処理は循環血液からのフタル酸エステル除去に大きな影響を与えないことが判明した。

4. 人工心肺回路からの可塑剤溶出評価

人工心肺回路からのフタル酸エステル溶出はPVC製チューブからの溶出量として評価した(図2)。また、同チューブの内面をヘパリンコートした製品とノンコート製品からの可塑剤溶出状況を比較することにより、フタル酸エステル溶出に対するヘパリンコーティングの影響についても検討した。図16に示したように、人工心肺回

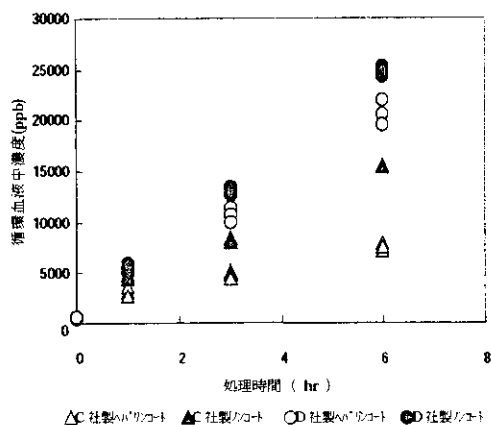


図16. 人工心肺回路からのDEHP溶出曲線

路からのDEHP溶出は、いずれの製品ともに牛血液の循環時間に比例して増加した。1, 3および6時間循環時、C社製ノンコートPVCチューブから溶出するDEHP量は循環血液中濃度として、それぞれ4,528.4 ± 194.0 ppb、8,240.1 ± 193.0 ppb および15,503.0 ± 88.5 ppbであった。また、D社製ノンコート製品に牛血液を循環させた際の各時間における血中DEHP濃度は、そ

れぞれ5,626.2 ± 266.3 ppb、13,062.6 ± 335.2 ppb および24,792.9 ± 530.7 ppbであった。これらの値から血液バックグラウンド(503.3 ± 69.2 ppb)を差し引き、循環血液量(0.5 L)を乗じて曝露量を算出すると、これらのPVC製チューブを接続した人工心肺装置を6時間使用した場合、絶対量として、C社製品では7.5 mg、D社製品では12.1 mgのDEHPが溶出されることになる。

人工心肺回路からのDEHP溶出に対するヘパリンコーティングの影響を検討した。その結果、C社製共有結合型ヘパリンコートPVCチューブからのDEHP溶出量は同社製ノンコート製品と比較して顕著に低下し、1, 3および6時間後に検出される循環血液中DEHP濃度は、それぞれ3,140.4 ± 429.7 ppb、4,734.0 ± 365.1 ppb および7,480.3 ± 376.2 ppbであった(図16)。6時間循環時の溶出量から曝露量を算出するとDEHPの総溶出量は3.5 mgとなり、C社製ノンコート製品と比較して、その曝露量は半減されることが明らかになった。一方、D社製イオン結合型ヘパリンコートPVCチューブからは、同社製ノンコート製品とほぼ同量のDEHPが溶出することが確認された(6時間後の循環血液中濃度 = 20,683.2 ± 1,212.2 ppb)(図16)。

人工心肺回路に牛血液を循環させた際に検出されるMEHP量の動態を図17に示した。DEHP溶出量と同様、MEHP検出量も循環時間に比例して増加し、C社製ノンコート製品を試料とした際に検出された1, 3および6時間後の循環血液中MEHP濃度は、それぞれ221.3 ± 31.4 ppb、302.0 ± 22.6 ppb および416.1 ± 26.3 ppbであっ

た。また、D社製ノンコート製品の場合、各時間における循環血液中 MEHP 濃度は、それぞれ 303.4 ± 27.9 ppb、 497.7 ± 37.6 ppb および 713.6 ppb であった。これらの検出値（血液バックグラウンド = 9.1 ± 1.0 ppb）から、人工心肺回路を 6 時間使用した際の MEHP 総検出量を算出すると、C社製製品では 203.5 μ g、D社製製品では 352.3 μ g となる。

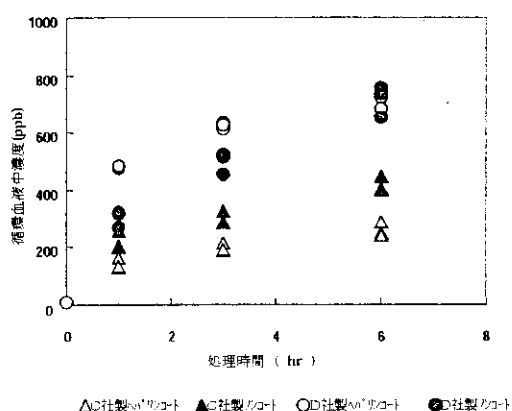


図 17. 人工心肺回路循環血液からの MEHP 検出動態

また、C社製 PVC チューブに牛血液を循環させた際に検出される MEHP 量は、DEHP 溶出量と同様、ヘパリンコーティングにより抑制される傾向が認められ、1, 3 および 6 時間循環時に検出される血液中 MEHP 濃度は、それぞれ 142.8 ± 19.0 ppb、 199.6 ± 13.1 ppb および 258.5 ± 24.3 ppb であった（6 時間循環後総検出量 = 124.7 μ g）（図 17）。一方、D社製製品の場合、MEHP 検出量についてはノンコート製品およびヘパリンコート製品ともに相違は認められず、D社製イオン結合型ヘパリンコートチューブに牛血液を 6 時間循環させた際の MEHP 検出量は 696.5 ± 21.7 ppb（6 時間循環後総検出量 = 343.7 μ g）であった（図 17）。

D. 考 察

現在、血液透析器は腎機能障害患者をはじめとして国内だけでも 145,000 人に及ぶ患者の治療に使用されており、救命的な役割を果たしている。また、人工心肺装置も心肺バイパス術などを行うために欠くことのできない用具のひとつである。その一方、これらの装置の構成部品である PVC 製チューブは、内分泌攪乱化学物質の疑いが持たれている可塑剤 (DEHP) の溶出に関して、その安全性が問題視されている。これを受けて、近年、*trioctyl trimellitate* (TOTM) をはじめとした新しい可塑剤を利用した医療用具の開発研究が行われているが、現時点で有用性が認められ広く用いられている器具の安全レベルを保証するための研究を行うことも非常に重要である。

本研究では、現在日本において使用されている血液透析回路および人工心肺回路の代表的製品を試料として選択し、臨床の場における一般的な使用状況に近似させた条件下においてフタル酸エステル溶出試験を行った。特に、血液透析回路からの溶出実験は、実際に使用される透析装置を用い、システム構成 (PVC 製チューブサイズや血液透析器など)、循環血液量、透析液、流速、温度および除水処理など血液透析に関する各種因子を実際の使用条件と同一になるよう再構築して行った。また、人工心肺回路からの溶出実験は、PVC 製チューブサイズ、血液流速および温度などに関して、体重約 11 - 12 kg（生後 1.5 - 2 歳）の小児に同装置を適用する際の条件に合致させて試験を行った。

本研究において、血液透析回路からの DEHP 溶出は血液循環時間に比例して増大