

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

適用する医薬品の脂溶性等とプラスチック製医療器具に使用される
可塑剤の溶出度の相関性に関する研究

「DEHP の臍帯血造血幹細胞エストロゲンレセプター発現に及ぼす影響について」

主任研究者 中澤裕之（星薬科大学）
分担研究者 牧野恒久（東海大学）

研究要旨

DEHP は軟質ポリ塩化ビニル樹脂（polyvinylchloride：PVC）製血液バッグの可塑剤であり、生殖発生毒性、精巣毒性、内分泌攪乱作用に対する疑い等の様々な問題点を持つ。DEHP の溶出報告がある PVC 製血液バッグは、保存血の採取・保存において、その簡便さから汎用されている。今回我々は、本分担研究において、PVC 製血液バッグの血球細胞に対する影響を、臍帯血造血幹細胞を用いて検討した。

近年造血幹細胞移植に応用の試みられている臍帯血造血幹細胞は、その採取から移植に使用されるまでの一部の過程において血液バッグが使用される。一方、臍帯血造血幹細胞は、保存血として用いられる分化の完了した血球細胞とは異なり、その機能は未熟で未知なものである。したがって、臍帯血造血幹細胞が PVC 製血液バッグ処理時に DEHP から何らかの影響を及ぼされることは危惧される。本研究は DEHP の「弱いエストロゲン様作用を持つ」という点に着目し、エストロゲン（E）の核内レセプター（ER）を臍帯血造血幹細胞で同定し、その発現調節への影響を検討した。臍帯血造血幹細胞は、RT-PCR と制限酵素切断法により、ER として 2 種のサブタイプ（ER α と ER β ）が共に発現していることが確認された。その 2 種の ER のサブタイプに対する作用を、MCF-7 ヒト乳癌細胞を用いたタイムコースによる検討したところ DEHP は E とビスフェノール A（BPA）と同様に ER α を up-regulation するが、ER β に対する up-regulation 作用は DEHP のみにおいて認められなかった。

A. 研究目的

高分子化学の著しい進歩に伴い、現代医療においても様々なプラスチック製医療器具が使用されている。人工腎臓用材料（ダイヤライザー、吸着型血液浄化器等）、人工心肺回路、各種カテーテル等のプラスチック製材料、輸血バッグ、血液バッグ、歯科材料等にポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート樹脂、ポリ塩化ビニル（PVC）等の素材が用いられている。特に人工心肺回路、輸液・輸血ルート等の体外血液循環に伴う回路は PVC 製が多く、種々の機能を付与させるために様々な添加剤が使われている。中でも、可塑剤はその利便性から、プラスチック添加剤として最も多く利用される。その作用は、樹脂の分子間に入り込み、硬い網状構造の原因である分子間結合を弱め、柔軟な性質を与えること

にある。このような可塑剤には、フタル酸エステル類、リン酸エステル類、脂肪酸エステル類、アジピン酸エステル類等が挙げられるが、フタル酸エステル類の使用度が最も高く、フタル酸ジエチルヘキシル（DEHP）は、全可塑剤生産量の約 50% 以上を占めている。一方、昨年、厚生労働省は、食品用塩化ビニル手袋や新生児を対象とした玩具等の可塑剤として使用されている DEHP 等について TDI を設定しこれらの製品に対して使用を規制した。輸液バッグや血液バッグ等の医療器具においても、当該可塑剤の濃度は高く、血液や輸液等を介して体内に取り込まれる可能性が危惧される。従って、様々な医療行為を通して、直接ヒト生体内にこれら化学物質が取り込まれる可能性が懸念されることから、そのリスク評価が必須であると考えて「適用する医薬品の

脂溶性等とプラスチック製医療用具に使用される可塑剤の溶出度の相関性に関する研究」を進めている。

DEHP は PVC 製血液バッグの可塑剤であり、生殖発生毒性、精巢毒性、内分泌攪乱作用に対する疑い等の様々な問題点を持つ。PVC 製血液バッグは、DEHP の溶出報告があるが、保存血の採取・保存において、その簡便さから汎用されている。今回我々は、本分担研究において、PVC 製血液バッグの血球細胞に対する影響を、臍帯血造血幹細胞を用いて検討した。

臍帯血造血幹細胞は、近年造血幹細胞移植に応用の試みられており、その採取から移植までの一部の過程において血液バッグが使用される。臍帯血造血幹細胞は、保存血に用いられる分化の完了したの血球細胞とは異なり、その機能は未熟で未知なものである。したがって、臍帯血造血幹細胞が PVC 製血液バッグ保存時に DEHP により何らかの影響を及ぼされることは危惧される。本研究はとくに DEHP の「弱いエストロゲン様作用を持つ」という点に着目し、エストロゲンの核内レセプター (ER) を臍帯血造血幹細胞で同定し、その2種のサブタイプ (ER α と ER β) についての発現変化を mRNA レベルで探究を目的した。

また、現在、エストロゲン自身のその作用発現機構について、ER を介してから作用を発現するまでの間にはブラックボックスと言われるまだ未解明の部分がたくさんある。エストロゲンは女性ホルモン的一种であり、女性の生殖器への作用が主であるが、脳、心血管、骨、皮膚等の生器外作用も示すことが報告されており、骨粗鬆症、心筋梗塞、高血圧症などとの関連も推測されている。エストロゲンの作用発現機構におけるブラックボックスを解明することは、多くの疾患の解明、治療につながると考えられている。また、ビスフェノール A (BPA) のようにエストロゲン様作用を示すと報告されている物質の作用発現機構を解明することも必要である。本研究では、「DEHP のエストロゲン様作用についての遺伝子レベルでの基礎的検討」と共に、E2、BPA を用いて、「ER を介するエストロゲン作用の発現機構解明に対する基礎的検討」を同時に行った。

B. 研究方法

B-1. 実験用造血幹細胞

実験に使用した臍帯血造血幹細胞はインフォームドコンセントにより承諾を得た妊婦の臍帯から出産後に採取し、東海大学の臍帯血バンクに集められたもののうち、移植に使用するためには採取量が過少なため、研究用に提供されたものである。研究用に提供を受ける臍帯血は、臍帯血を用いる研究者による週一回の定例会議で申請が検討され、割り当てられる。血幹細胞の表面には CD34 と呼ばれる糖タンパク質が選択的に発現している。この CD34 をマーカーとして、臍帯血から造血幹細胞を分離する。実際には、臍帯血から Ficoll-Paque PLUS を用いて抽出した単核細胞に CD34 に対する磁気ビーズつき抗体を反応させ、細胞分離システム (MACS) を用いて、造血幹細胞を分離する (Fig.1)。

B-2. 造血幹細胞の ER の存在の有無

臍帯血から分離した造血幹細胞から強力なタンパク変性作用を有する Isogen により Total RNA を抽出し、DNase 処理し、逆転写して cDNA を作製する。これを、PCR により、ER α 、ER β の cDNA を増幅させ、2% アガロースゲルを用いた電気泳動法により確認した。

さらに、電気泳動法により得られたバンドが目的とする ER α 、ER β であることを確認するためにバンド部分のゲルを切り出し、制限酵素である Sau96I により、ER α では 151bp のバンドが 99bp、52bp に、ER β では 201bp のバンドが 92bp、74bp、35bp に切れることを確認した (Fig.2、Table 1、2)。

B-3. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System による遺伝子レベルでの解析

175 cm² 組織培養フラスコ 1 枚にサブコンフルエントになった、MCF-7 ヒト乳癌細胞を Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; in phenol red, high glucose) を用いて 10 cm dish に均等になるように播き、24 時間後に DMEM (without phenolred, high glucose) を用いて

Medium 交換を行い、同時に被検物質 (E2: 終濃度 10^{-8} ~ 10^{-10} mol/L、DEHP、BPA: 終濃度 10^{-5} ~ 10^{-6} mol/L) を dish 4 枚ずつに添加した。これは、各被検物質添加後、6 時間、10 時間、24 時間後の Estrogen receptor の発現の変化を見るためである。また、この際、無添加の dish 4 枚を control として用意した (全 dish 数: 24 枚)。被検物質添加時を 0 時間として、6、10、24 時間後に Isogen を用いて各 dish から細胞を剥離して、抽出した mRNA から AGPC 法により cDNA を作製し、試料とした。

被検物質が MCF-7 ヒト乳癌細胞の ER α 、ER β の発現量に及ぼす影響を調べるために、ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems 社製) を用い、定量的リアルタイム RT-PCR 法により検討した。この測定の際、サンプルを β -actin により補正して、用いた (Fig. 3、Fig.4)。

(倫理面への配慮)

医療行為によるプラスチック製医療用具由来化学物質の暴露は、社会的に関心の高い検討課題であるため、事前に充分その意義を説明し、同意の得られた症例のみ実施する。得られた結果の公表についても社会的反響を考慮し、慎重を期す。各業界及び臨床現場の混乱を生じないためにも十分な配慮が必要である。

本分担研究遂行にあたり、ヒト臍帯血造血幹細胞の採取は東海大学血液バンクで実施され、各当該機関における倫理委員会等の承認を得て実施された。当該機関においては、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する利益・不利益等の説明を行い、理解 (インフォームドコンセント)、同意 (署名) を得ている。又、個人の氏名、情報等が漏れないよう万全の配慮をされている。

分析担当の当該機関においては、有害化学物質を研究施設から環境中へ排出しないために、廃液等はすべて回収し、専門処理業者に委託廃棄されている。

C. 研究結果

C-1. ER α 、ER β の存在の有無

臍帯血造血幹細胞から RT-PCR 法により cDNA を合成し、2%アガロースゲルを用いた電気泳動のバンドを切り出して制限酵素により、ER α 、ER β の存在を確認した。その結果、電気泳動により、ER α の長さ 201bp、ER β の長さ 196bp のバンドが見られた。また、そのバンドを、Sau96I という制限酵素で処理をした。ER α では 151bp のバンドが 99bp と 52bp に切れ、ER β では 201bp のバンドが 92bp、74bp、35bp に切られることが遺伝子配列から予想されたように、実際のバンドもその通りであることが確認できた。そのため、そのバンドが ER α 、ER β のものであることが推定でき、臍帯血造血幹細胞には、mRNA レベルで ER α 、ER β が存在することが確認された (Fig.5、Fig.6)。

C-2. ABI PRISM 7700 Sequence Detection System による遺伝子レベルでの解析結果

DEHP、E2、BPA が MCF-7 ヒト乳癌細胞の ER α 、ER β の発現に及ぼす影響をコントロール 6 時間に対する相対発現量として表した。以下の結果の数値はコントロール 6 時間の Threshold Cycle (Ct) 値を 1 とし各試料の Ct 値より換算したものである ($=2^{\text{Control6hr Ct 値} - \text{Sample Ct 値}}$)。

コントロール、DEHP、E2 及び BPA のそれぞれの結果を示し、また、E2 の結果に対する DEHP、BPA の動向について、そして、コントロールの結果に対する DEHP、E2、BPA について以下に述べる。

【DEHP、E2、BPA の結果；コントロール 6 時間値に対する相対発現量】

・ER α の発現について；

コントロールについては、10 時間値が 0.462、24 時間値が 29.897 という結果が得られた。E2 については、 10^{-10} mol/L では、6 時間値が 0.548、10 時間値が 2.039、24 時間値が 37.696、 10^{-9} mol/L では、6 時間値が 0.573、10 時間値が 0.390、24 時間値が 37.581、 10^{-8} mol/L では、6 時間値が 4.535、10 時間値が 1.100、24 時間値が

37.696という結果が得られた。また、DEHPについては、 10^{-6} mol/Lでは、6時間値が2.483、10時間値が0.944、24時間値が37.696、 10^{-5} mol/Lでは、6時間値が1.757、10時間値が4.725、24時間値が0.116という結果が得られた。また、BPAについては、 10^{-6} mol/Lでは、6時間値が0.007、10時間値が2.612、24時間値が37.581、 10^{-5} mol/Lでは、6時間値が0.004、10時間値が0.001、24時間値が37.581という結果が得られた (Table 3)。

・ER β 発現について；

コントロールについては、10時間値が0.027、24時間値が13.581という結果が得られた。E2については、 10^{-10} mol/Lでは、6時間値が0.013、10時間値が0.009、24時間値が172.055、 10^{-9} mol/Lでは、6時間値が0.005、10時間値が0.035、24時間値が11.955、 10^{-8} mol/Lでは、6時間値が0.002、10時間値が0.022、24時間値が29.083という結果が得られた。また、DEHPについては、 10^{-6} mol/Lでは、6時間値が0.069、10時間値が0.317、24時間値が0.001、 10^{-5} mol/Lでは、6時間値が0.095、10時間値が0.128、24時間値が0.008という結果が得られた。また、BPAについては、 10^{-6} mol/Lでは、6時間値が0.010、10時間値が0.305、24時間値が76.899、 10^{-5} mol/Lでは、6時間値が0.149、10時間値が1.834、24時間値が272.592という結果が得られた (Table 4)。

【E2の結果に対するDEHP、BPAの動向について】

ER α の発現について、DEHPでは、 10^{-6} mol/LにおいてE2と類似の動向がみられた。また、BPAでは、 10^{-5} mol/L、 10^{-6} mol/Lの両濃度において、E2と類似の動向がみられた。

ER β の発現について、DEHPでは、 10^{-5} mol/L、 10^{-6} mol/Lの両濃度において、E2と逆の動向がみられた。BPAでは、 10^{-5} mol/Lでは類似の動向がみられた。

【コントロールの結果に対するDEHP、E2、BPAについて】

各化学物質を24時間暴露させた後にER α 、ER β の発現に対してははっきりした影響

がみられたため、24時間値についてコントロールと比較した結果を以下に記す。

コントロールの24時間値の結果をそれぞれの化学物質の結果と比較すると、E2、BPAでは、ER α 、ER β の両レセプターの発現を増加させる傾向がみられた。 10^{-6} mol/LのDEHPでは、E2、BPAと同様にER α の発現を増加させる傾向がみられたが、 10^{-5} mol/LのDEHPでは、ER α の発現を減少させる傾向がみられ、また、両濃度のDEHPにおいて、ER β の発現を、E2、BPAとは逆に減少させる傾向がみられた。

D. 考察

臍帯血造血幹細胞が移植時までの一連の過程において使用するバッグには、「血液保存バッグであること」という以外には規定がない。そのため、利便性、経済性に優れている軟質PVC製血液バッグが汎用されている。しかし、軟質PVC製血液バッグには、生体影響が懸念されているDEHPが可塑剤として添加されており、これが溶出することが報告されている。したがって、臍帯血造血幹細胞を軟質PVC製血液バッグに保存した際に、DEHPが溶出し、臍帯血造血幹細胞の分化及び増殖に何らかの影響を及ぼすことを危惧した。臍帯血造血幹細胞がエストロゲン様作用を受ける場合の機序を探るために、ER α 、ER β の存在の有無についてRT-PCR法と電気泳動法により検討した。その結果、臍帯血造血幹細胞には、mRNAレベルでER α 、ER β が発現していることが確認できた。

その2種のERのサブタイプに対する作用を、MCF-7ヒト乳癌細胞を用いたタイムコースによる検討したところDEHPはEとビスフェノールA (BPA)と同様にER α をup-regulationする (Fig7)が、ER β に対するup-regulation作用はDEHPのみにおいて認められなかった (Fig8)。

このようにサブタイプ特異的な作用の性質によって、DEHPのエストロゲン様作用の弱さがもたらされている可能性が示唆された。さらに、mRNAレベルでの検討が必要である。

E. 結論

本研究では、DEHPが臍帯血造血幹細胞に及ぼす影響とそのエストロゲン活性についての検討を行った。

DEHPが臍帯血造血幹細胞に及ぼす影響については、臍帯血造血幹細胞が移植に使用されるまでの過程のうちいくつかの部分において、PVC製バッグが汎用されており、PVC製バッグから様々な問題点を持つDEHPが溶出するという報告があること、また、臍帯血造血幹細胞はその機能が未熟で未知なものであること、の二つを危惧要因として検討を行った。その結果、DEHPはE2添加時と同様に臍帯血造血幹細胞に対して、その増殖を促進させ、また、増殖に従いCFU-GMへの分化を促進し、BFU-Eへの分化を抑制する傾向がみられた。さらに、臍帯血造血幹細胞はmRNAレベルでの検討によりER α 、ER β を持つことを確認できた。以上のことから、DEHPが臍帯血造血幹細胞の分化及び増殖に影響を及ぼすことが分かり、その際には、ERを介した機序が一つの可能性として考えられることが示唆された。

次に、DEHPのエストロゲン活性に対する遺伝子レベルでの基礎的検討として、E2、BPAをポジティブコントロールとして用いた。DEHP、E2、BPAがMCF-7ヒト乳癌細胞のER α 、ER β の発現に及ぼす影響を評価するためには、コントロールの6時間におけるCt値を1としてその相対発現量を比較した。その結果、24時間でのER β の発現において、DEHPでは、E2、BPAの及ぼす影響と異なる傾向を示すこと、また、24時間値のER α の発現において、 10^{-6} mol/LのDEHPでは、E2、BPAと同様に促進傾向を示すが、 10^{-5} mol/LのDEHPでは、逆に抑制傾向を示すことを認めた。DEHPでは、濃度によりER α を介したエストロゲン活性を持つ可能性が示唆され、ERを介する多彩な作用発現機構のブラックボックスを解明する一助となると思われる。

以上の検討により、DEHPの生体影響については、今後も更なる多方面からの研究をしていく必要がある化学物質であると考えられる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表（様式A（4）別紙5参照）

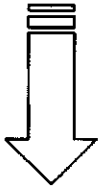
1. 論文発表
投稿中
2. 学会発表
 - ・ポリ塩化ビニル製医療用具の安全性評価（第3報）：コロニーアッセイ法によるフタル酸エステル類の評価
堀田明子、村野孝代、和泉俊一郎、牧野恒久、吉村吉博、中澤裕之
第122年会日本薬学会（3月26～28日 幕張メッセ）
 - ・ヒト造血幹細胞、末梢血リンパ球の増殖とプロラクチン；血液バッグからのフタル酸エステルの効果について
堀田明子、和泉俊一郎、森恵生、村野孝代、吉村吉博、中澤裕之、牧野恒久
日本下垂体研究会第17回学術集会（8月1～3日 東京農工大学）
 - ・内分泌かく乱化学物質の不妊症婦人における測定（その1）：ビスフェノールA、クロルデン関連物質の血中、腹水中分析と子宮内膜症
貴家剛、和泉俊一郎、奥脇伸二、松林秀彦、鈴木隆弘、牧野恒久

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

With the informed consent, cord blood samples were collected from healthy donors.

- ① They placed in sterile tubes and layered on a Ficoll-Paque gradient .
- ② The low-density mononuclear cells were washed twice by PBS and resuspended in IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium).



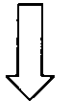
<Separation>

The haemopoietic stem and progenitor cells were isolated using positive selection of CD34-expressing cells.

- ① The cord LD-MNCs were incubated for 10-15 min with the FCR Blocking Reagent (Direct CD34 Isolation Kit).
- ② The cord LD-MNCs were incubated for 30 min CD34 Micro Beads Reagent (Direct CD34 Isolation Kit), washed and filtered through a 50µ m nylon mesh to remove clumps and placed on a column in the midiMACS cell separator .
- ③ The labeled cells were separated using a high-gradient magnetic field, and eluted from the column after their removal from the magnet.
- ④ The positive fraction was then placed on a new column and the magnetic separation step repeated.
- ⑤ At the end of the separation, the cells were counted.

Fig. 1 The separation procedure of CD34⁺ cells from the cord blood

Extraction of total RNA from CD34⁺ cell



CD34⁺ cells were added to Isogen, and mRNA was extracted by the AGPC method.

RT-PCR



Extraction of DNA . . . ①
Reverse transcription of poly(A)-mRNA . . . ②
Polymerase chaine reaction . . . ③

Electrophoresis in 2% agarose-TBE gels



Electrophoresis in 2% agarose-TBE gels after restriction endonuclease Sau96I

Fig. 2 Expression of Estrogen Receptor mRNA

- ① MCF-7 cells were seeded into 10×10 cm dish.
(Medium:DMEM including phenol red
Cells: 24 dish/flask)
- ② This flask was incubated by subconfluent.
- ③ Seeding medium was removed and changed into phenol red-free Medium.And then,cells were incubated for 24 hours.
- ④ Cells were exposed to test compounds for 6, 10 and 24 hours, respectively.
- ⑤ MCF-7 cells were removed from 10×10 cm dish by Isogen, and mRNA was extracted by the AGPC method.

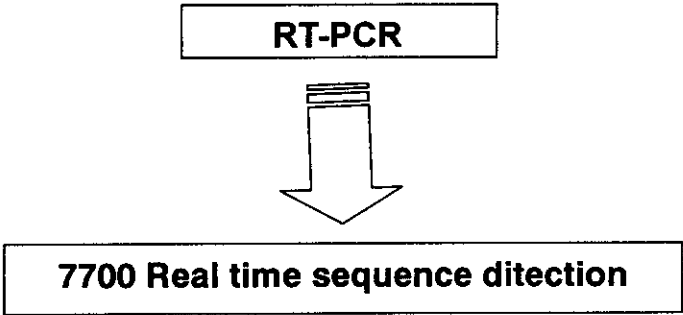


Fig. 3 Procedure of mRNA extraction

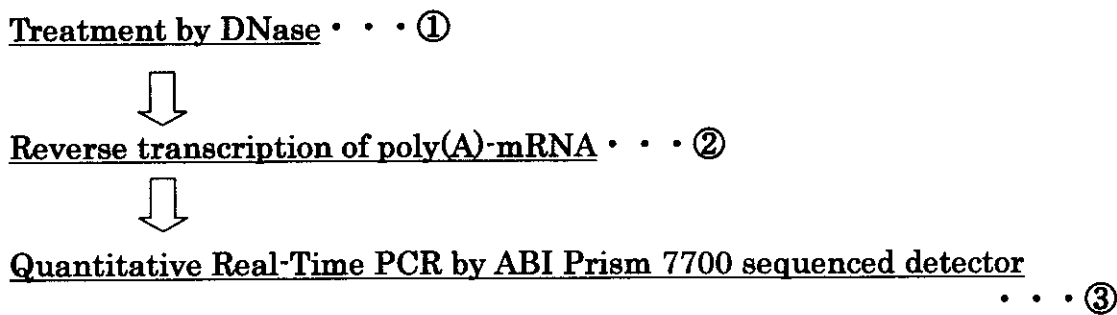


Fig. 4 Procedure of the real time RT-PCR method

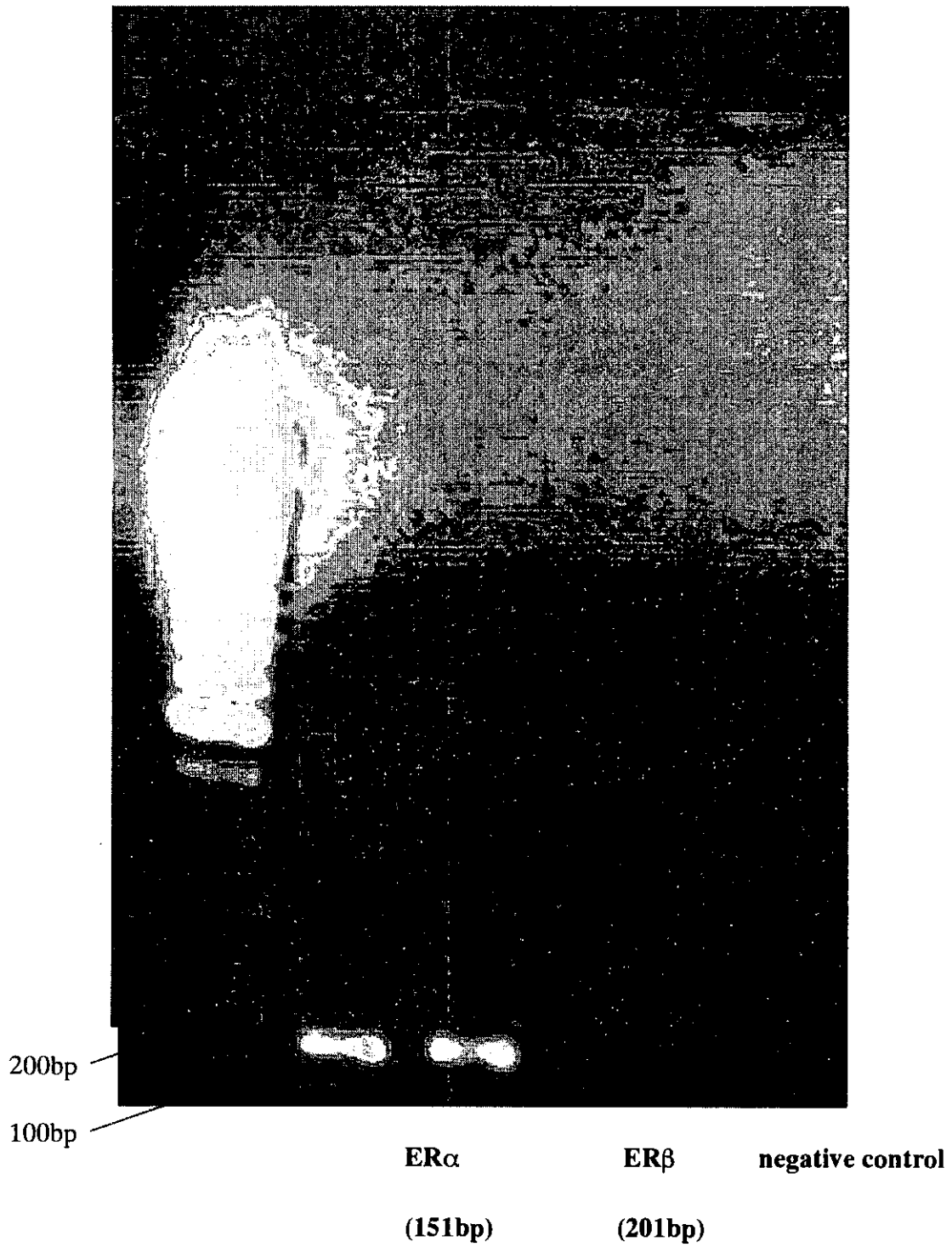


Fig. 5 Existence of ERs checked by electriophoresis after RT-PCR

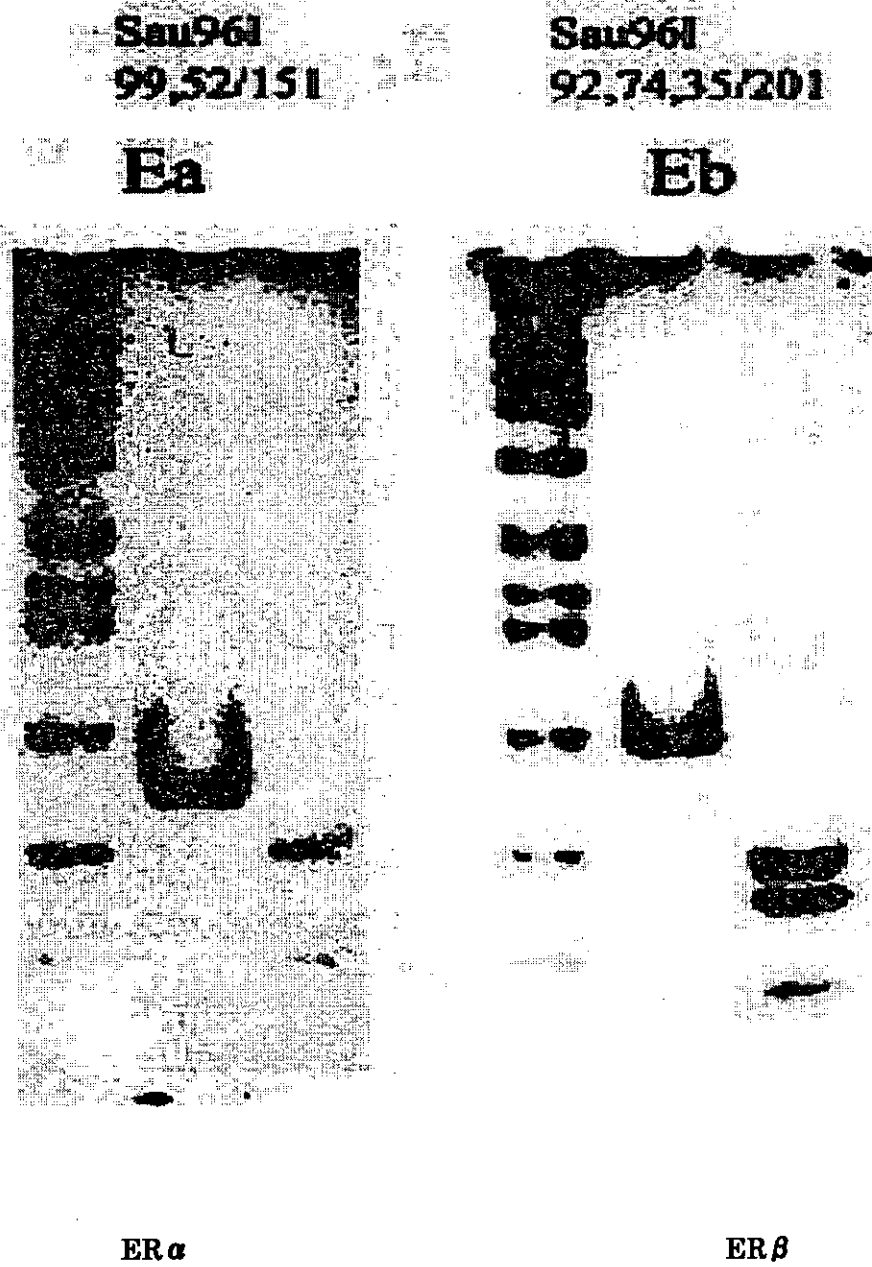


Fig. 6 Existence of ERs checked by restriction endonuclease

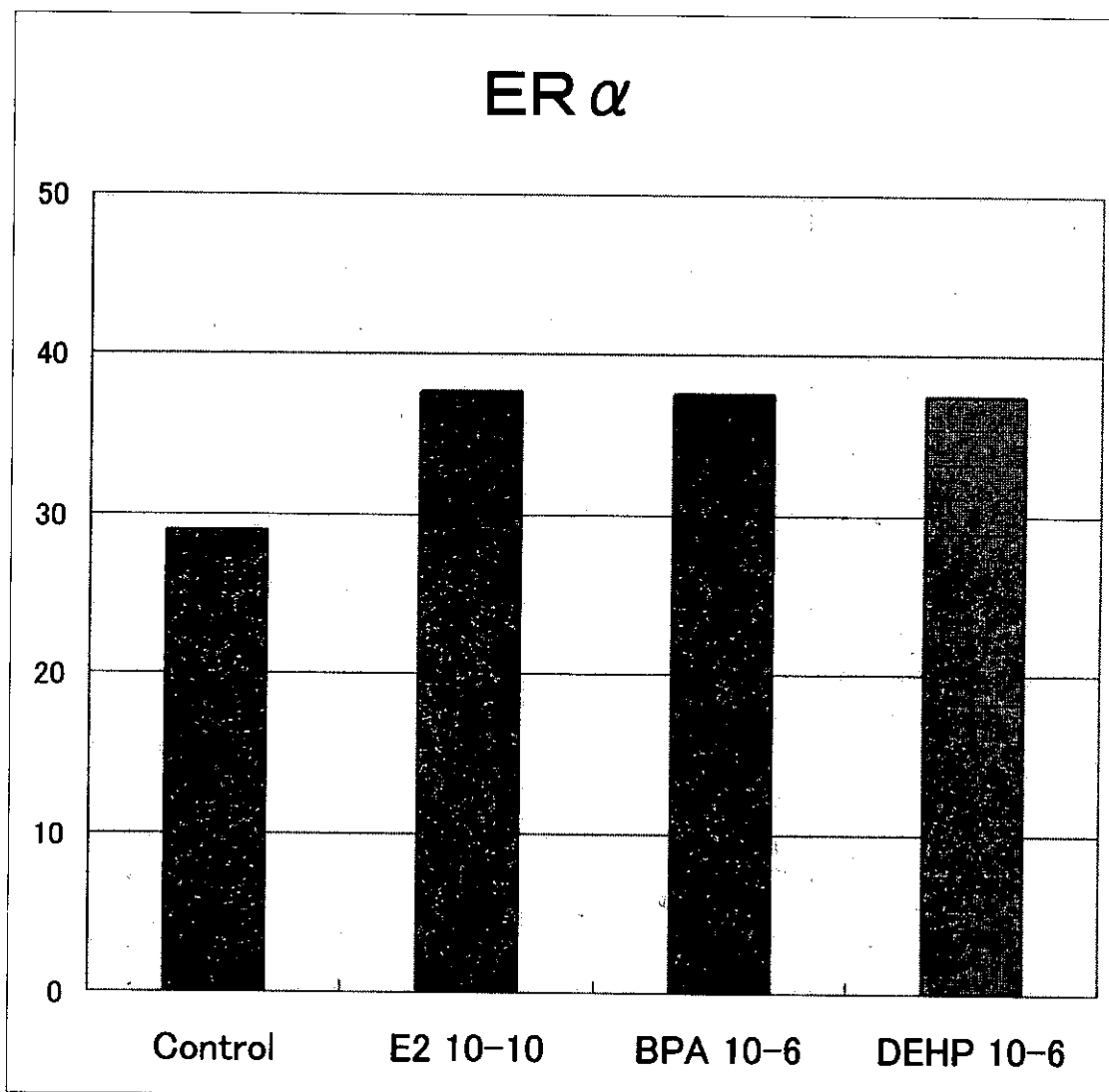


Fig.7 24時間培養後のER α mRNA量

ER β

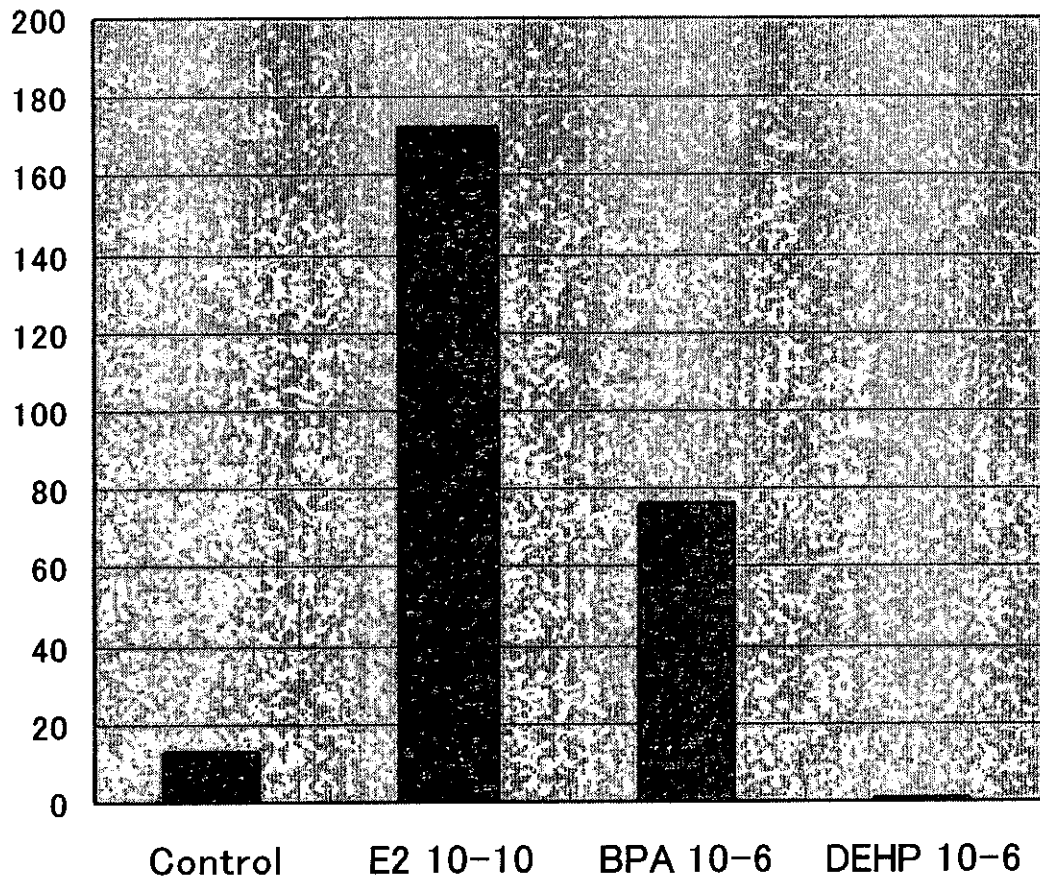


Fig. 8 24 時間培養後の ER β mRNA 量

Table1 RT-PCR

① Treatment by DNase

Reagent	Final concentration (μL)
Total RNA(1μg/μL)	10.000
10×DNase buffer	10.000
RNase inhibitor	1.800
DNase	2.000
DDW (DNase&RNase free)	76.200
Total	100.000

② Reverse transcription of poly (A)-mRNA

Reagent	Final concentration (μL)
Total RNA (0.5μg/μL)	10.000
OligodT 12-18	1.000
5×Buffer	4.000
DTT (0.1 mol/L)	2.000
10 mmol/L dNTP mix	1.000
Super Script II	1.000
RNaseH	1.000
Total	20.000

③ PCR

Reagent	Final concentration (μL)
cDNA (1ng/μL)	0.025
Primer F (10pmol/L)	1.000
Primer R (10pmol/L)	1.000
dNTP (0.2μmol/L)	1.000
10×Buffer	1.000
dH ₂ O	5.975
Enzyme (Ampli Taq Gold™)	0.050
Total	20.100

<PCR amplification>

The amplification conditions for PCR for ER α and ER β were 94°C for 9min, followed by 45 cycles at 94°C and 55°C for 30 s each, respectively, and 74°C for 3 min, followed by 2 min at 20°C.

Table 2 Primers

Primer	Sequence
Estrogen Receptorα(151-bp product)	
ER α -1883F	5'- AAG AAC GTG GTG CCC CTC TA -3'
ER α -2033R	5'- TTC ATC GCA TTC CTT GCAAA -3'
Estrogen Receptorβ(201-bp product)	
ER β -1459F	5'- CCT GGC TAA CCT CCT GAT G -3'
ER β -1659R	5'- GGC AGA GGA CAG TAA AAG CA -3'

Table3 Expression of ER α gene under the exposure of DEHP,E2,BPA

(mol/L)	6hour	10hour	24hour
control	1.000	0.462	29.897
E2 10 ⁻¹⁰	0.548	2.039	37.696
E2 10 ⁻⁹	0.573	0.390	37.581
E2 10 ⁻⁸	4.535	1.100	37.696
DEHP 10 ⁻⁶	2.483	0.944	37.696
DEHP 10 ⁻⁵	1.757	4.725	0.116
BPA 10 ⁻⁶	0.007	2.612	37.581
BPA 10 ⁻⁵	0.004	0.001	37.581

* relative amounts of expression = 2^{Control 3hour Ct value / Sample Ct value}

Table 4 Expression of ER β gene under the exposure of DEHP,E2,BPA

(mol/L)	6hour	10hour	24hour
control	1.000	0.027	13.581
E2 10 ⁻¹⁰	0.013	0.009	172.055
E2 10 ⁻⁹	0.005	0.035	11.955
E2 10 ⁻⁸	0.002	0.022	29.083
DEHP 10 ⁻⁶	0.069	0.317	0.001
DEHP 10 ⁻⁵	0.095	0.128	0.008
BPA 10 ⁻⁶	0.010	0.305	76.899
BPA 10 ⁻⁵	0.149	1.834	272.592

* relative amounts of expression = 2^{Control 3hour Ct value / Sample Ct value}

Ⅲ. 分担研究報告書

3. LC/MS/MS を用いたプラスチック製医療器具 に使用される可塑剤の動態解析

分担研究者	掘 伸二郎	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	北川 陽子	大阪府立公衆衛生研究所
	高取 聡	大阪府立公衆衛生研究所

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

適用する医薬品の脂溶性等とプラスチック製医療用具に使用される

可塑剤の溶出度の相関性に関する研究

主任研究者：中澤裕之 星薬科大学薬品分析学教室教授

LC/MS/MS を用いたプラスチック製医療用具に

使用される可塑剤の動態解析

分担研究者：堀 伸二郎

大阪府立公衆衛生研究所

研究協力者：北川陽子

大阪府立公衆衛生研究所

高取 聡

大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨

DEHP は、測定環境中に広く存在するため、コンタミネーションによって測定値の信頼性が損なわれる可能性がある。そこで抽出及びクリンナップを簡略化し、高度な選択性を有する LC/MS/MS を活用して血漿又は血清中の DEHP 及び MEHP の分析方法を開発した。DEHP 及び MEHP のコンタミネーションを排除した条件下で調製した血清中の DEHP 及び MEHP の濃度は、定量限界以下 (DEHP, 10 ppb; MEHP, 5 ppb) であった。一方、輸血バッグ中に保存されていた血漿からは、DEHP 及び MEHP がそれぞれ、14000 及び 770 ppb の濃度で検出された。

A. 研究目的

医療行為によってフタル酸ジ (2-エチルヘキシル; DEHP) が生体内に取り込まれる可能性が指摘されている¹⁾³⁾。すなわち、塩化ビニル製樹脂を用いた医療器具から溶出した DEHP に輸液や透析を介して DEHP に曝露されるケースなどが危惧されている。新生児が体外循環酸化装置の回路から高濃度の DEHP の曝露を受けたことが原因と思われる壊死性の小児結

腸炎⁴⁾や肺障害⁵⁾の発症の例の報告がある。また、透析によって血中の DEHP の濃度が上昇するとの指摘⁶⁾ならびに透析と嚢胞腎との関連性が疑われる⁷⁾との報告もある。現在、このリスク評価が求められている。正しく評価を行うためには、DEHP の医療用具からの溶出挙動及び分解等の動態を高い精度で把握する必要がある。しかし、DEHP は測定環境中に広く存在し、コンタミネーションによって測定値の信

頼性が損なわれる可能性がある。すなわち、分析対象試料から測定試料に到るまでの抽出及びクリンナップに用いる器具、溶媒、固相及び誘導体化試薬等中に混在する DEHP のコンタミネーションによって、測定値が歪められる。このコンタミネーションは、器具の高度な洗浄と試薬を厳選することによって低下させることは可能であるが限界がある。さらに DEHP のコンタミネーションを低減化するためには、抽出及びクリンナップを簡略化することが有効であると考えられる。しかしながら、クリンナップの簡略化は、測定試料中のマトリックスの増加を意味する。そのため、分析機器に測定対象物質に対する高度な選択性を有することが要求される。タンデム型質量分析計付液体クロマトグラフ (LC/MS/MS) は、測定対象物質に由来するイオン (precursor ion) を選別した後、さらに窒素分子等との衝撃を与えて得たイオン (daughter ion) をさらに選別してモニタリングするという高い選択性を有している。我々は、この LC/MS/MS の特性を DEHP の測定に応用し、高い精度を保った測定値を得ることを目指した。また、DEHP は、生体試料中に存在するエステラーゼ/リパーゼ活性によってフタル酸モノ (2-エチルヘキシル) (MEHP) に分解される (図 1)。このため、DEHP の動態解析においては、DEHP と共に MEHP も測定する必要がある。MEHP は、極性が高いため GC/MS

の分析では誘導体化が必要となり、コンタミネーションの機会が増える。LC では誘導体化の必要がなく、この点において LC/MS/MS は、GC/MS よりも有利である。

本研究を遂行することによって医療行為によってもたらされる DEHP の曝露によるリスク評価を行ううえで有用な情報を提供できる。

B. 研究方法

B-1. 試薬等

試薬：アセトン、ヘキサン及びアセトニトリルは、和光純薬製 (環境分析用) を用いた。DEHP (関東化学製)、 d_4 -DEHP (ケンブリッジアイソトープラボラトリー社製)、MEHP (林純薬製) 及び d_4 -MEHP (ケンブリッジアイソトープラボラトリー社製) を購入した。ガラス及びステンレス製の器具は、溶媒で洗浄後、 200°C で 2 時間以上加熱し、清浄な場所で冷却して用いた。血清は、清浄なガラス器具及びステンレス製採血針を用いて研究所内ボランティア (男性、20 歳代) から得た。輸血バッグ中に保存した血漿は、使用期限が越えたものを日本赤十字社からいただいた。臨床検査標準用プール血清 (コンセーラ N) は、日水製薬から購入した。ヘキサン洗浄水は、milli Q 水をヘキサンで洗浄することによって調製した。その中に含まれる MEHP 及び DEHP の濃度は、それぞれ、1 ppb 未満

及び 1 ppb であった。

B-2. 機器

LC: Agilent 1100 シリーズ; バイナリポンプ、G1312A; ウェルプレートオートサンプラ、G1367A; カラム恒温槽、G1316A; デガッサー、G1379A

MS/MS: API 3000 (アプライドバイオシステムズ)

B-3. 測定試料の調製

血清 (血漿) 0.5 g にサロゲート (50 ng) を 10°C 以下で添加攪拌後、アセトン 4 mL を加えて 5 分間振とう攪拌し、遠心分離により上清を得た。沈殿物に対してアセトン 1 mL を加えて超音波を 2 分間照射後 5 分間振とう攪拌し、遠心分離により上清を得た。この上清と先の上清を併せて窒素気流下で乾固させた。次にヘキサン洗浄水 0.5 mL 及び酢酸 4 µL を加えて、超音波を 2 分間照射した。ヘキサン 1 mL を加えて 5 分間振とう攪拌し、遠心分離後、ヘキサン層を回収した。同様にヘキサン抽出を 3 回くり返した。ヘキサン抽出物を窒素気流下、乾燥させ、アセトニトリル 0.5 mL に再溶解して測定試料とした (スキーム 1)。

B-4. 分析条件

LC 条件: カラム, Wakosil-II 3C18, 2.0 x 150 mm; 溶出液, 0.05% 酢酸水溶液 (A) 及びアセトニトリル (B); 溶出条件、

A/B (2/8), イソクラテック; 流速、2 µL/min; カラム温度、50°C; インジェクト量、5 µL

モニターイオンの選択は、1000 ppb の MEHP または DEHP を MS/MS に直接導入し、Analyst Software (v. 1.2) を用いて条件を最適化した。

MS/MS 条件: インターフェイス; ターボイオンスプレー™ (electrospray ionization; ESI); イオン化電圧, ±4000 V; 温度, 500°C; モニターイオン (Mode, Precursor ion/ Daughter ion); DEHP (Positive, 391/149), MEHP (Negative, 277/134), d₄-DEHP (Positive, 395/153), d₄-MEHP (Negative, 281/138)

定量: 絶対検量線法で定量した。

B-6. 倫理面への配慮

分析方法の開発には、臨床検査用標準プール血清及び使用期限が切れた輸血用血漿を利用した。また、対照とした血清は、倫理規定に則って文書及び口頭で研究の主旨を説明し、同意を得た大阪府立公衆衛生研究所内のボランティアから提供された。また、研究に使用した試薬等は環境中に排出されないよう回収を徹底した。

C. 研究結果

C-1. モニターイオン及び検出限界値

図 2 に MEHP 及び DEHP のマススペクトラムを示した。それぞれ、m/z 277 及

び 391 に [M-H]⁻ 及び [M+H]⁺ イオンピークが認められた。これらを precursor ion として得られる、それぞれ、m/z 134 及び 149 を daughter ion としてモニタリングした。

MEHP 及び DEHP の検出限界値を MRM (Multiple Reaction Monitoring) において S/N 比が 3 以上となる 1 ppb とした (図 3)。

C-2. 添加回収試験

コンタミネーションを極力排除した条件下で調製したヒト血清 (以下、血清) に d₄-MEHP 及び d₄-DEHP を 100 または 20 ppb 添加して回収率を評価した結果、d₄-MEHP 及び d₄-DEHP 共に 93~103% の範囲になった (表 1)。

C-3. 操作ブランク値

ヘキサン洗浄水 (MEHP, 1 ppb 未満; DEHP, 1 ppb 含有) に対して前記の方法に従って測定試料を調製した。そのときのクロマトグラフを図 4 に示した。MEHP 及び DEHP の測定値は、それぞれ、1 ppb 未満及び 4.8±0.9 ppb であった。この値は、ヘキサン洗浄水中の濃度を含んでいる。よって、本法の MEHP 及び DEHP の操作ブランク値は、それぞれ、1 ppb 未満及び 5 ppb とした。

C-4. 検量線及び定量下限値

MEHP 及び DEHP の検量線を図 5 に

示した。それぞれ、5~1000 ppb の範囲で直線性を示した。MEHP 及び DEHP の定量下限値は、それぞれの検量線が直線性を示し、かつ前記の操作ブランク値の 2 倍の濃度以上となる、5 及び 10 ppb とした。

C-5. 血清、プール血清 (臨床検査標準用) 及び血漿 (輸血バッグ中保存) の分析

予備実験から臨床検査標準用プール血清 (以下、標準用プール血清) 及び輸血バッグ中に保存した血漿 (以下、輸血バッグ中保存血漿) 中に高濃度で MEHP 及び DEHP が存在していることが認められた。従って、これら試料については、ヘキサン洗浄水で 10 倍に希釈して測定した。図 6 にスキャンモードのクロマトグラムを示した。MEHP 及び DEHP のコンタミネーションが無い条件で採取及び調製した血清には、MEHP 及び DEHP が認められなかった。一方、輸血バッグ中保存血漿からは、DEHP のピークが認められた。また、標準用プール血清からは、MEHP 及び DEHP の存在が認められた。

図 7 に MRM でのクロマトグラムを示した。また、表 2 に定量値を示した。血清では MEHP 及び DEHP の濃度は操作ブランク値に近似した値となった。定量限界値以下であるが、検量線を外挿して算出した結果、それぞれ、3.7±1.5 及び 7.0±2.6 ppb であった。これらの数値

には操作ブランク値を含んでおり、実際の血清中の濃度は、共に 5 ppb 未満となる。ヘキサン洗浄水で 10 倍に希釈した輸血バッグ中保存血漿からは、MEHP 及び DEHP が、それぞれ、76.6±1.5 及び 1410±10 ppb の濃度で検出された。従って、実際の MEHP 及び DEHP の濃度は、770 及び 14000 ppb となる。また、同様にヘキサン洗浄水で 10 倍に希釈した標準用プール血清からは、MEHP 及び DEHP が、それぞれ、2154±64 及び 2200±46 ppb の濃度で検出された。従って、実際の MEHP 及び DEHP の濃度は、共に 22000 ppb となる。

C-6. MEHP の代謝物の探索

図 8 に MEHP (2×10^{-3} M) をラット S-9 で 37°C で 1 h 処理し、酢酸エチルで抽出したものをネガティブスキャンモードで分析した結果、代謝物 (Metabolite 1) のピークが認められた。マススペクトラムを調べた結果、m/z 293 にベースピークが認められた。

D. 考察

DEHP 及び MEHP は、精巣、肺、腎臓に対して毒性を有することが報告されている。DEHP を可塑剤として使用したポリ塩化ビニル樹脂製の医療器具が多く存在することから、医療行為からの DEHP の暴露評価が求められている。輸液または透析等の医療行為からの DEHP の暴露

リスク評価においては、直接的に患者の体内に導入されることから DEHP のみならず、その分解物である MEHP も併せて測定する必要がある。GC/MS では、MEHP は誘導体化する必要がある。この誘導体化の過程で DEHP が分解する可能性があるため、予め DEHP と MEHP とを分画した後、誘導体化しなくてはならない。このため、操作が煩雑化し、測定環境からのコンタミネーションによって測定値の信頼性が損なわれることが指摘されていた。今回、我々は、LC/MS/MS を活用して、DEHP 及び MEHP を同時に定量できる方法を開発した。分離に LC を用いるため、MEHP を誘導体化する必要がなく、また、高度な選択性を有する MS/MS を検出に配することによって抽出及びクリンナップを簡略化することが可能となった。従って、LC/MS/MS は、DEHP 及び MEHP の分析に有用であるといえる。

MEHP 及び DEHP のコンタミネーションを排除した条件下で採取及び調製された血清からは、それぞれ、5 ppb 未満の濃度でしか検出されなかった。一方、輸血バッグ中に保存されていた血漿中からは、それぞれ、770 及び 14000 ppb 濃度で検出された。これらの差異から、採血から血漿の調製過程、保存液の添加及び保存の過程において使用された樹脂製品から血漿に DEHP 及び MEHP が溶出した可能性も考えられる。仮にこの血漿