

A. 研究目的

プラスチック製医療用具は、現代医療において診断、治療、医薬品の保存、品質試験等の分野において不可欠の医療品である。多くの人々が安心して医療を受けられるためには、これらの安全性の確保は極めて重要である。新しい医療技術の実用化を図り、より有効かつ安全なプラスチック製医療用具を提供するためには、高度な機器分析を駆使した理化学的分析手法や簡易的評価法を利用した医療用具等の高度なリスク評価法・管理技術等の開発が必要である。また、市販後の安全対策について調査研究を行い、医療行政施策に反映させていくことも必要とされている。更に、プラスチック製医療用具等のリスク評価法においては、国際調和を図ることが重要である。

平成 13 年、米国 FDA は、” Safety assessment of DEHP released from PVC medical device “¹⁾を公表し、各種医療行為によって暴露されるフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) 摂取量を報告した。また、平成 14 年には、カナダ (Health CANADA) ²⁾からも同様に医療用具からの DEHP の安全性について、警告と今後の対策について発表し、その使用に際して注意を喚起している。平成 14 年、厚生労働省は、塩化ビニル (PVC) 製医療用具からの DEHP の溶出について見解を発表した³⁾。この安全性情報においては、感受性の高い乳児等に利用される PVC 製医療用具の使用規制などが盛り込まれているが、それ以外の医薬品や血液製剤においては、

明確な記載はなく、今後の課題としてしている。その一方で、国内で使用されている血液バッグからの可塑剤を含む化学物質の詳細な理化学的分析評価は実施されていない。

そこで、本研究では、GC/MS による残留添加剤・化学物質のスクリーニング評価を実施し、それに基づき最も検出頻度と残留量の多い可塑剤 DEHP に注目した。しかし、米国 CDC による研究を中心に可塑剤は、血液に存在する酵素により加水分解を容易に受け、代謝物のモニタリングを推進することが一般的とされてきている⁴⁾。そこで、新規の分析手法であるオンライン抽出-LC/MS 法を開発し、代謝物の一つである MEHP を包括した一斉分析法を構築した。最終年度として、開発した分析手法を用いて、実試料である血液バッグ保存製剤に溶出する可塑剤の最終目的である安全性評価を実施する。

B. 研究方法

B.1. 試薬・試料

【試薬】

標準品：DEHP 及びフタル酸ジ (2-エチルヘキシル) -d₄(DEHP-d₄)は、関東化学社製を用いた。MEHP 及びフタル酸モノ (2-エチルヘキシル) -d₄(MEHP-d₄)は、林純薬社製を使用した。

【溶媒】

アセトン：ガラス器具の洗浄液として、関東化学社製 (フタル酸エステル試験用) を使用した。

アセトニトリル：移動相として、和光

純薬社製 (HPLC 分析用) を使用した。
メタノール：標準品溶解液として、和光純薬社製 (HPLC 分析用) を使用した。
水：Milli-Q gradient A 10 with EDS polisher (Millipore 社製) で精製したものを用いた。

ギ酸：和光純薬特級を用いた。

B. 2. 分析装置・条件

【カラムスイッチング LC/MS 装置】

LC/MS: Agilent 1100 LC/MSD SL system
(Agilent Technologies 社製)

前処理用ポンプ: Shimadzu LC-10AS
pump (島津社製)

装置図を Fig. 1 に示す。

【測定条件】

分析用カラム: Mightysil RP-18 GP (L)
(100 x 2.0 mm, 5 μ m) (関東化学社製)

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

分析用移動相: 水/アセトニトリル
(0.1%ギ酸) (50/50 [0-6 min] \rightarrow 10/90
[6-25 min])

分析用移動相の流速: 0.2 ml/min

前処理用カラム: Bioptic AV-2 (50 x 4.6
mm, 5 μ m) (GL サイエンス社製)

前処理用移動相: 水 (100%)

前処理用移動相の流速: 0.5 ml/min

注入量: 10 μ L

測定モード: エレクトロスプレーイ
オン化法 (ESI) ポジティブモード SIM
モニタリングイオン $m/z=391$ (DEHP)
 $m/z=395$ (DEHP- d_4), ネガティブモード
SIM モニタリングイオン $m/z=277$
(MEHP) $m/z=281$ (MEHP- d_4)

B. 3. PVC 製血液バック中血液製剤 試料の調製

日本赤十字社より提供された血液

バッグ保存血液製剤試料 (78 検体:
2003 年 1 月採血) は、ポリエチレンフ
タレート製容器に封入され、運搬され
た。保存時は、凍結状態であり、その
後の保存に関しても -80° C とした。分
析前に自然解凍し、DEHP の汚染を確認
したメタノールで 10 倍に希釈したも
のを分析用試料とした。内標準用重水
素安定同位体標準液は、解凍後、すぐ
に添加した。

B. 4. 定量分析

内標準法により、濃度範囲 25~1000
ppb (DEHP) 及び 5~1000 ppb (MEHP) に
おいて、検量線を作成して定量を行っ
た。

C. 研究結果

オンライン抽出-LC/MS を用いて、
DEHP 及び MEHP の同時分析法を用いる
ことで、DEHP (25~1000 ppb) 及び
MEHP (5~1000 ppb) で相関係数 0.999
以上と良好な直線性が得られた。また、
添加回収試験の結果は 90 %以上 (RSD
5 %以下) と良好な結果が得られた。

本研究で構築した分析手法を用い
て、血液バッグ保存の血液製剤 78 検
体中の DEHP 及び MEHP の測定を実施し
た。その結果、いずれの検体からも可
塑剤が検出された。また、血液製剤別
(図 1) 及び保存時間別 (図 2) の検
出値を示す。

D. 考察

構築した分析法により、合計 78 検
体の血液バッグ保存血液製剤中の
DEHP 及び MEHP の分析を実施した。本

結果から、以下の知見を得ることができた。

- 血液製剤内での DEHP から MEHP への代謝率として、約 20%以下であった。つまり、本製剤を投与した場合、その殆どが DEHP として、体内に取り込まれることが、分かった。また、経時的な MEHP への代謝が観察されたが、DEHP 溶出量の方が、多いと推測される。
- DEHP の溶出量の血液製剤種類別に評価した場合、人全血液で最も多く、次いで、赤血球 MAP 及び血小板であった。なお、同一保存容器においても、その溶出量に差が観察された理由の一つとして、採血試料の個体差によるものと考えられる。
- DEHP の溶出量は、保存時間によって、経時的に増加する傾向が観察された。
- 保存容器の材質の違い（PVC 製及びポリオレフィン製）における DEHP 溶出量においては、顕著な差は観察されなかった。検体 No. 55-60, 67-62 のいずれにおいても、DEHP が検出され、経時的に増加している。そのため、ポリオレフィン製についても少量の可塑剤が添加されている可能性が示唆された。

本研究から、更なる検討が必要な項目として次の事項が挙げられる。

- DEHP の血液製剤による代謝の解明：MEHP への代謝速度及びフタル酸などへの変化体をモニタリング評価する。
- ポリオレフィン製血液バッグの材質試験：本材質にも可塑剤が利用されているのか材質試験を実施して検討する必要性がある。

なお、血液製剤利用や成分献血等でのリスクアセスメントとして本結果から考察すると次のようなリスク評価ができる。

最も高濃度検出された No. 42 (DEHP: 83.2 $\mu\text{g/ml}$) の 400 mL 採血由来の人全血液約 456 mL (抗凝固剤添加量を考慮) を全量投与すると 37.9 mg の暴露となる。体重 50 kg の成人が本製剤を一回投与された場合、下記の DEHP 暴露量になる。

0.76 mg /kg weight /time

しかし、この暴露量が直接健康被害をもたらすとは、考え難く、今後本製剤を利用するにあたり、リスクとベネフィットを十分に考慮する必要性があると思われる。また、成分献血による供血者に対する DEHP 暴露も同等程度と推測され、今後の更なる調査研究が必要と考えられる。

E. 結論

参考文献及び参考資料

- 1) FDA (<http://www.fda.gov/cdrh/newpg.html>.)
- 2) HEALTH CANADA EXPERT ADVISORY PANEL ON DEHP IN MEDICAL DEVICES 2002 (http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut/zfiles/english/advcomm/eap/dehp/eap-dehp-final-report-2002-jan-11_e.pdf)
- 3) 厚生労働省医薬局「医薬品・医療用具等 安全性情報：2. ポリ塩化ビニル製医療用具の使用について」No.182, 10月 (2002)
- 4) Blount B, Milgram K, Silva M, Malek N, Reidy J, Needham L, Brock J (2000) *Anal Chem* 72:4127-4134

F.研究業績

学会発表

- 1) 日本薬学会第123年会 2003年3月27～29日 (長崎)：医療用ポリ塩化ビニル製チューブの安全性情報・評価. 井之上浩一, 樋口多恵, 川口 研, 小林 直, 吉村吉博, 中澤裕之, 佐藤温重
- 2) 日本薬学会第123年会 2003年3月27～29日 (長崎)：ポリ塩化ビニル製医療用具からの可塑剤 Di(2-ethylhexyl) phthalate 溶出に関する動態評価. 樋口多恵, 井之上浩一, 岡田文雄, 井口博文, 配島由二, 佐藤温重, 吉村吉博, 中澤裕之
- H. Oka, Y. Yoshimura and H. Nakazawa: Characterization of estrogenic compounds in medical polyvinylchloride tubing by gas chromatography - mass spectrometry and estrogen receptor binding assay. *Clin. Chim. Acta* 325, 157-163 (2002)
- 2) K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura and H. Nakazawa: Column-switching high-performance liquid chromatography - electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 527-533 (2003)
- 3) K. Inoue, T. Higuchi, F. Okada, H. Iguchi, Y. Yoshimura, A. Sato and H. Nakazawa: The validation of column-switching LC/MS as a high-throughput approach for direct analysis of di(2-ethylhexyl) phthalate released from PVC medical devices in intravenous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, 1145-1152 (2003)

論文

- 1) K. Inoue, H. Okumura, T. Higuchi,

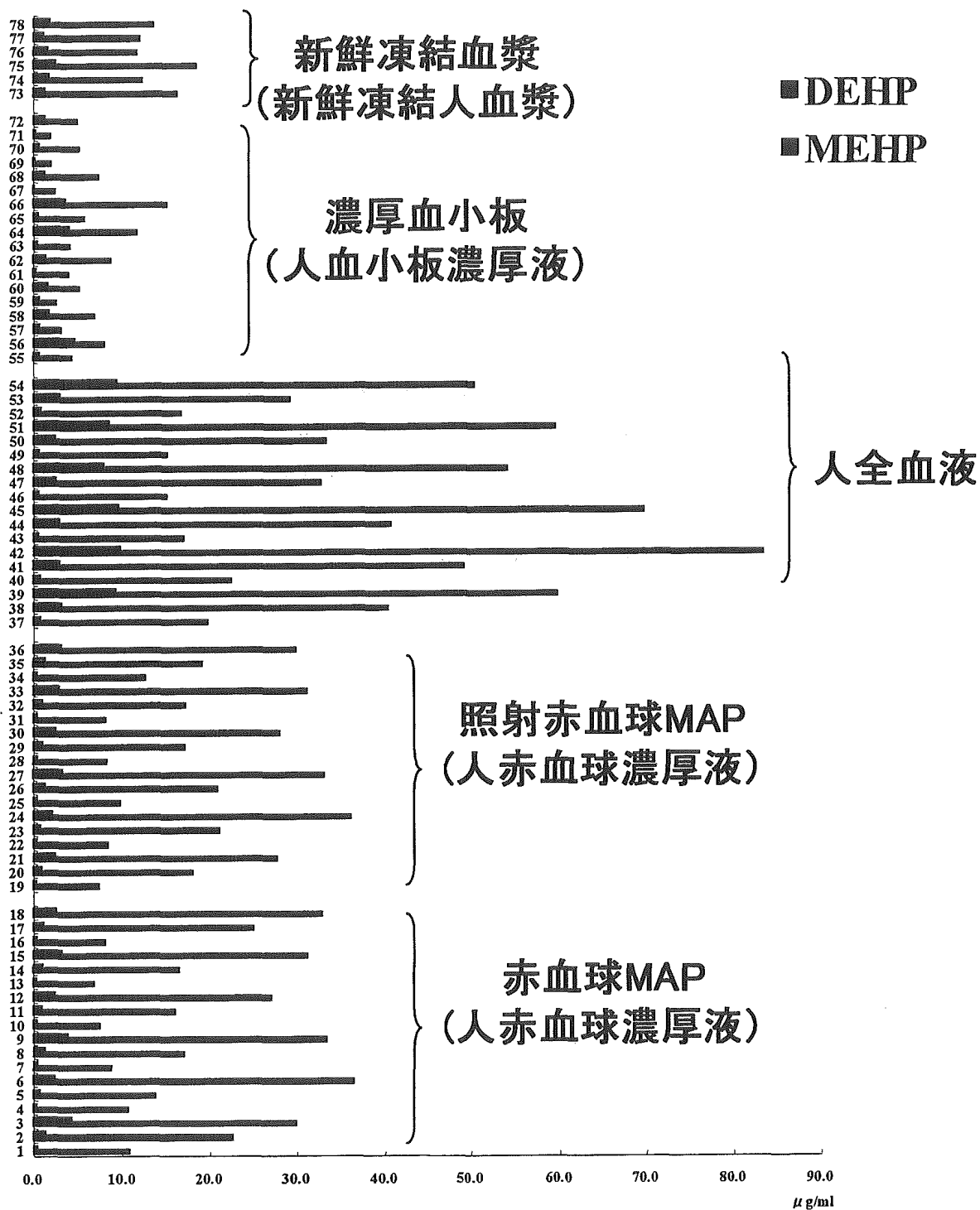


図 1 血液製剤別の DEHP 及び MEHP の含有量(単位: $\mu\text{g/mL}$: ppm)

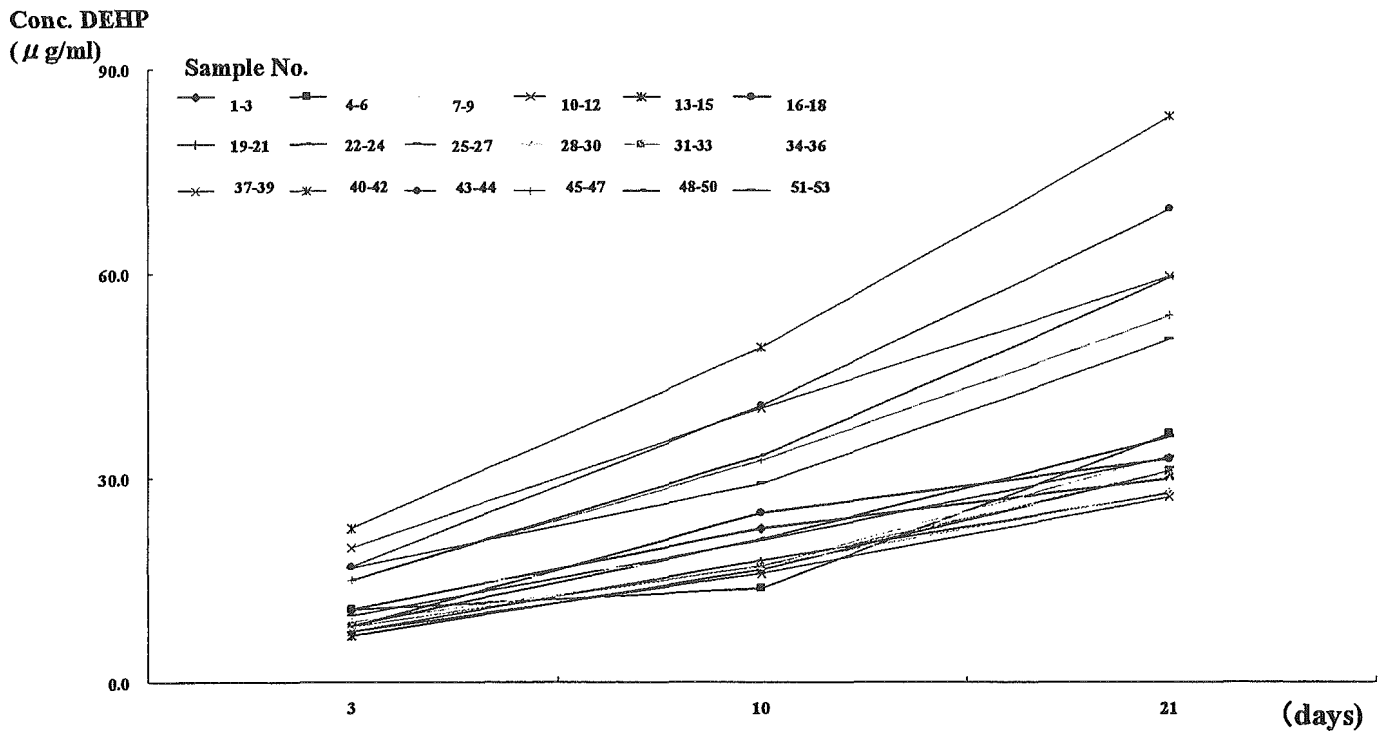


図2 保存時間による血液製剤中の DEHP 及び MEHP の含有量

(単位 : $\mu\text{g/mL}$: ppm)

平成 15 年度厚生科学研究費補助金（医薬品等医療時術リスク評価研究事業）
分担研究報告書

安全な血液製剤を確保するための技術の標準化及び血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

採血基準に関するスクリーニング開発

成分献血キットから溶出する化学物質の調査及び供血者（ドナー）の暴露量評価

| | |
|-------|--|
| 主任研究者 | 吉澤 浩司 広島大学医学部 |
| 分担研究者 | 宮崎 豊 愛知県衛生研究所 |
| 研究協力 | 猪飼 誉友 近藤 文雄 伊藤 裕子 後藤 智美 岡 尚男 松本 浩 富田 伴一 愛知県衛生研究所 井之上浩一 中澤 裕之 星薬科大学 |

要旨

成分献血に使用する成分採血キット（ガンプロ社製コーブスペクトラ用 LRS セット、バクスター社製アミカス アフェレシスキットダブルタイプ、ヘモネティクス社製ディスプレイザブルプラズマコレクションセット LIST No. 792J、同マルチコンポーネントセット LIST No. 995J、テルモ社製アフェレーシスセット BB-AP520HJ 及び同 BB-AP410EJ）を用い、それらから溶出する化学物質に対する供血者（ドナー）の暴露量を調査した。生理食塩水等を用いて実施した溶出実験の結果、上記 6 種類のキットからの溶出液より、

塩化ビニル (PVC) 樹脂の可塑剤であるフタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP) 及びその製造原料である 2-エチルヘキサノール (2-EH)、キットを製造する際に使われた接着剤に由来すると考えられる溶剤類 (酢酸エチル、メチルエチルケトン、テトラヒドロフラン及びシクロヘキサノン) が主な溶出物質として検出された。また、キットのプライミングに使用される生理食塩水、及び、血液凝固を防止する目的で血液に添加される ACD-A 液についても測定を実施した結果、PVC 容器に入った ACD-A 液よりキットからの溶出量を上回る DEHP 等が検出され、これらがドナーの暴露量に大きく影響を与えることが示唆された。さらに、人血液を用いた溶出実験を実施し、その結果を基に 1 回の成分献血におけるドナーの暴露量を推定したところ、DEHP は 81~2190 μg 、2-EH は 15~620 μg 、シクロヘキサノンは 198~9780 μg となり、キットによりドナーの暴露量が大きく異なることが明らかとなった。しかしながら、これらの暴露量は、最も高い値を示したバクスター社製キットでさえ、輸血患者の 1/3 以下であり、DEHP に関しては、FDA の示した TI 値 (体重 60kg) の 1/16 以下であった。

A. 目的

輸血用血液製剤の製造や保存にはポリ塩化ビニル (PVC) 製のチューブや容器が使われており、これらから製剤中に溶出する様々な化学物質の輸血患者への暴露が懸念されている。その一方で、成分献血においても採血キットの随所に PVC 製のチューブやバッグが使われており、この場合には輸血患者のみならず供血者 (ドナー) までもが同様のリスクを負う可能性がある。

これまでの本研究で著者らは、PCV 樹脂に可塑剤として含まれるフタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP) の原料である 2-エチルヘキサノール (2-EH) や、バッグ製造時に接着剤の溶剤として使われるテトラヒドロフラン (THF) などの揮発性物質について、血液中の分析法を確立するとともに、日本赤十字社の協力の基に保

存血液製剤中の消長や残留実態等の調査を実施してきた。また、研究協力者である中澤らのグループは、血液中の DEHP 及びその分解物であるフタル酸-モノ-2-エチルヘキシルの同時分析法を確立し、保存血液製剤等の分析を実施している。このように、保存バッグ等から輸血患者が受ける化学物質の暴露については、ある程度調査が進んでいるが、成分献血のドナーの暴露についてはほとんどデータがなく、リスク評価等が出来ないのが現状である。

このような理由から今年度は、成分献血キットから血液中に溶出される化学物質について調査を実施し、成分献血におけるドナーの暴露量評価を試みた。

B. 研究方法

1. 試薬および材料

DEHP、2-EH、THF、シクロヘキサノン、酢酸エチル及びメチルエチルケトン (MEK) には和光純薬製を、また、内部標準物質として使用したフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)-d4 (DEHP-d4)、2-エチル-1-ヘキサノール-d17 (2-EH-d17)、テトラヒドロフラン-d8 (THF-d8)、シクロヘキサノン-d10 及びメチルエチルケトン-d5 (MEK-d5) には CDN Isotopes 社製 (ケベック、カナダ) を、メタノールには和光純薬製残留農薬分析用を、アセトン、アセトニトリル、エタノール、n-ヘキサン及び塩化ナトリウムには関東化学製フタル酸エステル試験用を、その他の試薬については和光純薬製の特級試薬を使用した。成分採血キットについては、ガンブロ社製コーブスペクトラ用 LRS セット (略称: スペクトラ)、バクスター社製アミカス アフェレシスキットダブルタイプ (略称: アミカス)、ヘモネティクス社製デイスパーザブルプラズマコレクションセット LIST NO. 792J (略称: 792J)、同マルチコンポーネントセット LIST No. 995J (略称: 995J)、テルモ社製アフェレーシスセット 2 種類 BB-AP520HJ (略称: テルモ PPP) 及び BB-AP410EJ (略称: テルモ PC) を、抗凝固剤液には、カワシミ社製 ACD-A 液 (300mL 及び 500mL 容量)、JMS 社製 ACD-A 液 (300mL 及び 500mL) 及びテルモ社製 ACD-A 液 (250mL 及び 500mL) を、生理食塩水については、カワシミ社製カーミパック生理食塩液 (1000mL) を用いた。

2. 試料の調製

2-1. 生理食塩水を用いた予備調査

愛知県赤十字血液センターの献血ルームに設置されている採血装置に成分献血キット及び抗凝固剤液等をセットし、所定のプライミングを行った。血液の代わりに 1L バッグ入りの生理食塩水又は 2% エタノール含有生理食塩水を用い、血漿や血小板を採取しない条件下で採血装置を稼働させた。成分献血における通常の採血量 (2500 又は 1600mL) の生理食塩水等を処理した後に装置を停止し、バッグ内容液をガラス容器に移して冷蔵保存した。

2-2. 人血液による溶出実験

通常の成分採血と同じ手順で各採血キットにボランティア (供血者) の血液を充填した後、採血装置を停止した。装置の停止については、両腕法キット (スペクトラ及びアミカス) は、返血が供血者に戻り始めた時点、片腕法キット (729J、995J、テルモ PPP 及びテルモ PC) については、血漿等の採取が始まった時点とした。装置の停止後、採血 (返血) 針を供血者より外し、採血ライン、返血ライン、ACD 液導入ライン、血漿や血小板液の流出ライン等を溶封した後に、採血装置から採血キットを取り外した。室温下で約 1 時間放置後、キットの要所を切断して内部の血液をガラス容器に移し、密栓して冷蔵保存した。翌日、遠心分離 (3000 rpm、10 分) により血液を血漿および赤血球液に分離し、分取したそれぞれの血液成分

をガラス容器に入れ、測定までの期間冷凍保存した。

3. 試料の分析

3-1. フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)

3-1-1 血漿及び赤血球液

前処理 試料 1g を 10mL 試験管に採り、アセトニトリル 5mL、塩化ナトリウム 0.5g、n-ヘキサン 1mL、内部標準液 (4ppm DEHP-d4-n-ヘキサン溶液) 25 μ L を加え、密栓して 3 分間振とう後、3000rpm で 5 分間遠心分離した。アセトニトリル層をナスフラスコに移し、減圧乾固して得られた残さに、蒸留水 2mL 及び n-ヘキサン 5mL を加えて溶かし、ヘキサン層を分取し、さらに、残った水層に n-ヘキサン 3mL を加えて混和後、ヘキサン層を分取した。ヘキサン層を合わせフロリジル-PSA カラムに負荷し、カラムをヘキサン 3mL で洗浄後、5%アセトン-ヘキサン溶液 10mL でフタル酸エステル類を溶出させた。溶出液を減圧乾固し、残さを n-ヘキサン 1mL に溶解し、GC/MS 分析に供した。

GC/MS 条件 装置：AUTO MASS SYSTEM II (日本電子) カラム：SPB-5 (0.25 mm i. d. x 30m、膜厚：1.0 μ m、スペルコ) カラム温度：70°C で 1.5 分間保持し、毎分 30°C で 140°C まで昇温後、毎分 5°C で 280°C まで昇温し 4 分間保持した。イオン源温度：210°C イオン化：EI、イオン化電圧：70 eV、検出方法：SIM 法、モニターイオン：DEHP (m/z 149)、DEHP-d4 (m/z 153)。

3-1-2. 血液以外の試料

前処理 試料 40mL を 50mL 比色管に採り、内部標準液 (20ppm DHHP-d4-アセトン溶液) 10 μ L 及び n-ヘキサン 4mL を加え、密栓して 10 分間激しく振とうした。30 分間静置した後、n-ヘキサン層を分取し、GC/MS 分析に供した。

GC/MS 条件 血漿及び赤血球液に同じ。

3-2. 揮発性有機化合物

前処理 飽和食塩水 10mL が入ったヘッドスペースバイアルに、試料 (血漿及び赤血球液の場合は 0.5mL、それら以外の試料は 1mL) 及び内部標準溶液 (100ppm MEK-d5、100ppm 酢酸エチル-d8、100ppm THF-d8、100ppm 2-EH-d17、および 1000ppm シクロヘキサノン-d10 の混合メタノール溶液) 1 μ L を加えた後、テフロン張りのシリコンゴムセプタムおよびアルミシールで密封し、ヘッドスペース-GC/MS 分析に供した。

ヘッドスペース条件 装置：Tekmer 7000 (Tekmer)、バイアル容量：22mL (Chromacol, CV-22)、バイアル加熱条件：85°C (20 分)、バイアル振とう機能：使用 (Power 5：10 分)、サンプルループ容量：1mL、サンプルループ温度：150°C、トランスファーライン温度：160°C。

GC/MS 条件 装置：AUTO MASS SYSTEM II (日本電子) カラム：SPB-1 (0.25 mm i. d. x 60m、膜厚：1.0 μ m、スペルコ) カラム温度：40°C で 4 分間保持し、230°C まで毎分 10°C で昇温後、230°C で 5 分間保持。イオン源温度：210°C イオン化：EI、イオン化電圧：70 eV、検出方法：スキャン法 (m/z 41-260) または SIM 法、モニタ

一イオン：MEK (m/z 72)、酢酸エチル (m/z 70)、THF (m/z 72)、2-EH (m/z 70)、シクロヘキサノン (m/z 98)、MEK-d5 (m/z 77)、酢酸エチル-d8 (m/z 76)、THF-d8 (m/z 80)、2-EH-d17 (m/z 80)、シクロヘキサノン-d10 (m/z 108)。

C. 結果と考察

1. 予備調査

今回の測定対象試料である血漿や赤血球液などの血液成分は、非常に多くのマトリックスを含むため、前処理が煩雑で効率的な測定が難しいと考えられた。そこで、予備調査として人血液の代わりに一定量の生理食塩水あるいはエタノールを添加した生理食塩水を用い、これらの溶液が成分採血キット内を循環するような条件下で成分採血装置を稼働させ、各キットの溶出液を調製した。表 1 に今回実験に使用した成分採血キットの採血方式や抗凝固剤液 (ACD-A 液) の添加割合等の仕様を、表 2 に溶出液調整時の条件等を示した。生理食塩水にエタノールを添加した理由は、生理食塩水の極性を脂質が含まれる血液に近づけるためであり、その添加濃度は、1Lにつき 20mL (約 2%) とした。アミカスにおいて採取量が他のキットより少ないのは、溶出液の一部が血漿等の採取ラインに流れ出たことが原因である。

上述の溶液を n-ヘキサン抽出-GC/MS 分析及びヘッドスペース-GC/MS 分析し、それぞれのキットから血液中に溶出する可

能性のある化学物質を検索した結果、DEHP、2-EH、シクロヘキサノン、酢酸エチル、THF 及び MEK が主な化学物質として検出 (全ての試料で $1 \mu\text{g/L}$ 以上) された。DEHP は PVC の可塑剤であり、2-EH はその製造原料である。その他の化合物については、キットに使われている針やチューブ、バッグなど様々な部品を接合するために使われた接着剤の溶剤であると推定される。

上述した 6 種類の化学物質を、それぞれの安定同位体を内部標準物質として用いて定量し、結果を表 3 に示した。DEHP に関してはばらつきが大きく、キット間や溶出液の種類に規則性を見出すことができなかった。その他の測定化合物は、キット間での濃度の違いはあったが、溶出液による濃度の違いは認められなかった。各キット間の濃度を比較したところ、アミカス及びスペクトラ溶出液中の 2-EH (アミカスのみ)、シクロヘキサノン及び酢酸エチルが他のキットよりも 2-10 倍程度高いという傾向が認められた。その理由として、これら両腕法キットは、他の片腕法キットと比べ構造が複雑で使用されているチューブなどの部品がはるかに多く、溶出面積が大きいためであると考えられる。

2. 生理食塩水及び ACD-A 液の分析

成分献血には、血液凝固を防ぐための抗凝固剤液 (ACD-A 液) が、またさらに、スペクトラ及びアミカスのような両腕法キットには生理食塩水によるプライミン

グ（キット内を満たす操作）が必要である。上述した予備調査の溶出実験にもこれらの薬剤液が使用され、これらに含まれる化学物質も溶出物質として測定されることから、使用した全ての製品について、前述と同様の測定を実施した。今回使用した生理食塩水（川澄製）の容器はエチレンビニルアセテート共重合体（EVA）製バッグであったが、ACD-A 液（川澄及び JMS 製）の容器は軟質 PVC 製バッグであり、そこからは DEHP や 2-EH の溶出が予想された。そこで、これらの比較対照として、EVA 製バッグを採用しているテルモ製の ACD-A 液についても測定を実施した。

表 4 に示したように、EVA 製バッグを採用している生理食塩水及びテルモ製 ACD-A 液からは、今回の測定対象物質はほとんど検出されなかった。それらとは対照的に、PVC 製バッグを採用している川澄及び JMS 製 ACD-A 液からは、今回の測定対象化合物がキットからの溶出液を上回る濃度で検出された。表 1 に示した ACD-A 液の添加割合から計算したところ、上述した溶出液に含まれる化学物質量の数% から多いものでは 100% 近くが、ACD-A 液に由来することが明らかとなり、これらの薬剤液がドナーの化学物質暴露に大きく関与する可能性が示唆された。また、DEHP 濃度に関しては、同一試料間でもばらつきが非常に大きいという傾向が認められた。本報告中にデータ等は示していないが、バッグから試料をサンプリング

する際に内容液を均質化する目的でバッグを揉む等の攪拌操作を加えたところ、DEHP 濃度が表 4 に示した濃度の 10 倍近くに達することもあった。これは、バッグ内壁から漏出した DEHP が内容液に完全に溶けきらない状態で内壁付近に局在していることを示唆しており、また、表 3 に示した DEHP 濃度ばらつきの原因となっていると考えられる。

3. 人血液中への溶出量調査

成分採血キットから人血液中に溶出する化学物質を調査するための試料調製法として、次のような方法が考えられた。

- ①成分献血を受けるボランティアの献血前と献血後の血液を採取する。
- ②成分献血を受けるボランティアの返血、またはその一部を別容器に採取する。
- ③一定量のボランティア血液がキット内を循環するようにして成分採血装置を稼働した後、キット内の血液を採取する。

これらのうち、①については返血が人体内の血液で希釈される、あるいは、溶出した化学物質が代謝等を受けるため、低濃度の物質については測定が難しい。②については返血を全て採取することは、ボランティアに生命の危険があるため不可能であり、返血の一部を定量的に採取するにはキットの改造等が必要であるため難しい。以上の理由により、予備調査でも採用した③の方法で試料調製をする予定を立てた。しかしながら、採血装置が誤動作する可能性があるという理由から、③の方法の一部を変更、すなわち、血液は循環させ

ずに、充填した状態で一定時間放置するという方式に切り替えて試料を調製することにした。表 2 に、試料調製を実施した際の条件等を示した。スペクトラの赤血球液の割合が他のキットと比較して極端に低いのは、プライミングに用いた生理食塩水が試料に混入し、血漿部分の容積が増えたためである。

上述の試料調製により得られた赤血球液と血漿の測定結果を表 5 に示した。DEHP、2-EH 及びシクロヘキサノンの 3 物質に関しては、両腕法キット（スペクトラ及びアミカス）からの溶出濃度が、片腕法のキットよりも 1.5 倍以上高かった。この理由として、前述したようなキット間の溶出面積の違いが考えられた。酢酸エチルは血液中の酵素等により加水分解されたため、ほとんど検出されなかったものと推測される。その他の物質については、濃度が低く、明確な傾向が見いだせなかった。赤血球液と血漿中の濃度を比較したところ、DEHP 及び 2-EH については、全てのキットで赤血球液よりも血漿中の濃度の方が数倍高い傾向が認められた。一方、シクロヘキサノンに関しては、スペクトラとアミカスでは血漿の濃度が高かったが、その他のキットでは同等か赤血球液の方がやや高く、キット間あるいは濃度レベルで違いが認められた。以上のように、測定物質により多少挙動は異なるものの、全体的には、赤血球液よりも血漿中の方が濃度が高い傾向にあることが認められた。

4. ドナーの暴露量評価

成分献血における返血の主成分は赤血球液であることから、ドナーの暴露量は、赤血球液の量とそこに含まれる各化学物質の濃度から算出できる。表 6 に、今回の実験でキットに充填した血液中の赤血球液量（表 1 及び 2 に示した諸データより算出）、そこに含まれる各化学物質量の計算値、及び、これらを通常の成分献血（処理量：2500 ないし 1600mL）を行った場合に換算した値を示した。この換算値は、溶出率（速度）が血液処理量に関係なく常に一定であると仮定して算出したが、実際には処理量が増えるに伴って溶出率は低下するものと推察される。したがって、表 6 の換算値は今回の実験結果から見積られる溶出量、即ち、ドナーが受ける暴露量の上限値であると考えられる。

それぞれの最小及び最大値は、DEHP が 81 μg （テルモ PPP）及び 2190 μg （アミカス）、2-EH が 15 μg （995 J）及び 620 μg （アミカス）、シクロヘキサノンが 198 μg （995 J）及び 9780 μg （アミカス）であり、これら化学物質全てにおいてアミカスが最高値を示した。しかしながら、以上の結果は、各キットにつきボランティア 1 人での調査であること、PCV 容器入りの ACD-A 液を用いたことに加えて、限定された条件下での実験結果より算出された数値あることなどの理由から、信頼性の面で十分とは言い難い。今後、被験者数を増やし、より実際に則した条件下で

追試を行う必要があると考える。

輸血用保存血液製剤中の DEHP 濃度 (40-50 $\mu\text{g/mL}$)¹⁾ 及び FDA の示した DEHP 許容摂取量 (TI、非経口ルート: 600-800 $\mu\text{g/kg/day}$ 、経口ルート: 40 $\mu\text{g/kg/day}$)²⁾ から上述した暴露量の評価を試みた。その結果、1 回の成分献血でドナーが暴露される可能性のある DEHP の量は、最も高いアミカスでさえ、200mL の輸血を受ける患者の 1/4 以下、非経口ルートでの TI (体重 60kg) 値の 1/16-1/22 であり、また、経口ルートでの TI (体重 60kg) 値も超えないという結果を得た。これより、DEHP に関しては成分献血のドナーが受ける暴露量は問題ないと評価される。

2-EH については、輸血患者の暴露量 (昨年本研究で調査した保存赤血球製剤中の平均濃度: 1.07 $\mu\text{g/mL}$ 、 $n=43$ より算出) との比較を試みたところ、アミカスの暴露量は 200mL の輸血患者のその 1/3 以下であった。一方、シクロヘキサノンの暴露量に関しては、比較すべきデータがほとんどないが、イヌの静脈注射による最小致死量 (LDL_0) 630mg/kg³⁾ より計算すると、アミカスの暴露量は標準体重 (60kg) に対しての最小致死量の約 1/4000 となり、ほとんど問題のないレベルであると推察される。

D. 結論

6 種類の成分採血キットを用いて、それらから溶出する化学物質に対する供血者 (ドナー) の暴露量調査を実施し、以下

の結論を得た。

1. 6 種類の成分採血キットから溶出する主な化学物質は、DEHP、2-EH、シクロヘキサノン、酢酸エチル、THF 及び MEK であり、それらの溶出濃度は、両腕法キット (スペクトラ及びアミカス) の方が片腕法キット (792J、995J、テルモ PPP 及びテルモ PC) よりも高い傾向にあった。
2. 生理食塩水及び ACD-A 液を分析した結果、PVC 製バッグを容器に使用した 2 社 (川澄及び JMS) の ACD-A 液より、キットからの溶出量を凌ぐ DEHP 等が検出され、ドナーへの暴露量に大きな影響を与える可能性が示唆された。
3. 人血液を用いた溶出実験により、1 回の成分献血におけるドナーの暴露量を推定した結果、DEHP は 81-2190 μg 、2-EH は 15-620 μg 、シクロヘキサノンは 198-9780 μg という数値が得られ、これら 3 種類の化学物質量においてはアミカスが最も高い値を示した。しかしながら、これらの暴露量は、輸血患者の 1/3 以下であり、DEHP に関しては、FDA が示した TI 値の 1/16 以下であった。

E. 参考文献

- 1) 三富ら, 日本輸血学会雑誌, 23, 90-96 (1977)
- 2) Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices, Center for Devices and Radiological Health (CDRH), FDA (2001)

3) 産業中毒便覧 (増補版)、医歯薬出版
(1977)

F. 研究業績

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

ヘッドスペース-GC/MS を用いた血液中の揮発性有機化合物測定法の開発；猪飼誉友、近藤文雄、伊藤裕子、後藤智美、岡尚男、松本 浩、宮崎 豊；日本薬学会第 123 年会；2003. 3. 27；長崎市

謝辞

本研究を行なうにあたり、採血装置や実験場所の提供など全面的な協力をいただきました愛知県赤十字血液センター、また、採血装置の操作や情報の提供に協力下さいました、ガンプロ株式会社、バクスター株式会社、ヘモネティクスジャパン株式会社及びテルモ株式会社に深謝いたします。

表1 成分採血キットの仕様等

| キット略称 | 採血・分離方式 | 採血成分 | 通常の血液処理量 | ACD-A液添加割合 |
|--------|-----------|--------|-----------|------------|
| スペクトラ | 両腕法 (二針法) | 血漿、血小板 | 約 2500 mL | 10 : 1 |
| アミカス | 両腕法 (二針法) | 血漿、血小板 | 約 2500 mL | 9 : 1 |
| 792J | 片腕法 (単針法) | 血漿 | 約 1600 mL | 10 : 1 |
| 995J | 片腕法 (単針法) | 血漿、血小板 | 約 1600 mL | 10 : 1 |
| テルモPPP | 片腕法 (単針法) | 血漿 | 約 1600 mL | 10 : 1 |
| テルモPC | 片腕法 (単針法) | 血漿、血小板 | 約 1600 mL | 10 : 1 |

表2 サンプル調製時の条件等

| 採血キット | 生理食塩水 | | 2% エタノール含有生理食塩水 | | 血液 | |
|--------|--------|--------|-----------------|--------|--------|---------------|
| | 処理量※1 | 採取量※2 | ACD-A液 (容量) | 処理量※1 | 採取量※2 | ACD-A液 (容量) |
| スペクトラ | 2500mL | 950mL | 川澄製 (500mL) | 2500mL | 1070mL | 川澄製 (500mL) |
| アミカス | 2500mL | 500mL | JM S製 (500mL) | 2500mL | 810mL | JM S製 (500mL) |
| 792J | 1600mL | 1150mL | JM S製 (300mL) | 1600mL | 1130mL | JM S製 (300mL) |
| 995J | 1600mL | 940mL | JM S製 (300mL) | 1600mL | 1050mL | JM S製 (300mL) |
| テルモPPP | 1600mL | 970mL | 川澄製 (300mL) | 1600mL | 1020mL | 川澄製 (300mL) |
| テルモPC | 1600mL | 1080mL | 川澄製 (300mL) | 1600mL | 1020mL | 川澄製 (300mL) |

※1 成分採血キット内を循環させた生理食塩水等の延べ容量

※2 溶出操作が終了した時点で1Lバッグ内に残った生理食塩水等の量

※3 成分採血キットに充填した血液量

※4 成分採血キットから回収した血液量

表3 生理食塩水及び2%エタノール含有生理食塩水による溶出液の測定結果

| 採血キット | 生理食塩水 (n=1) | | | | | 2%エタノール含有生理食塩水 (n=1) | | | | | | |
|--------|-------------|------|----------|-------|-----|----------------------|------|------|----------|-------|-----|-----|
| | DEHP | 2-EH | シクロヘキサノン | 酢酸エチル | THF | MEK | DEHP | 2-EH | シクロヘキサノン | 酢酸エチル | THF | MEK |
| スペクトラ | 208 | 75 | 3620 | 100 | 6 | 11 | 550 | 60 | 2900 | 110 | 7 | 10 |
| アミカス | 239 | 441 | 3680 | 110 | 2 | 21 | 76 | 443 | 3300 | 97 | 4 | 12 |
| 792J | 790 | 51 | 1560 | 33 | 2 | 11 | 665 | 52 | 1710 | 39 | 8 | 14 |
| 995J | 188 | 45 | 836 | 64 | 2 | 12 | 120 | 42 | 962 | 55 | 27 | 13 |
| テルモPPP | 315 | 61 | 1370 | 20 | 8 | 5 | 88 | 55 | 1100 | 15 | 10 | 6 |
| テルモPC | 453 | 46 | 400 | 21 | 9 | 4 | 134 | 48 | 392 | 23 | 13 | 5 |

単位：μg/L

表4 生理食塩水及びACD-A液中の測定結果

| 試料 | メーカー | 容量 | 平均濃度 (μg/L, n=3) (濃度範囲) | | | | | |
|--------|------|-------|-------------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------|---------------|
| | | | DEHP | 2-EH | シクロヘキサノン | 酢酸エチル | THF | MEK |
| 生理食塩水 | 川澄 | 1L | <10 (-) | <1 (-) | 10 (-) | 2 (1-4) | 3 (2-3) | 4 (3-4) |
| | | 300mL | 900 (460-1470) | 298 (255-316) | 10 (-) | 206 (188-215) | 56 (54-60) | 9 (8-12) |
| ACD-A液 | JMS | 500mL | 780 (710-800) | 288 (260-316) | 10 (-) | 212 (198-240) | 42 (40-46) | 7 (7-8) |
| | | 300mL | 930 (750-1100) | 449 (409-473) | 7400 (6150-8630) | 440 (355-526) | 1 (-) | 72 (65-77) |
| テルモ | | 500mL | 780 (700-810) | 389 (383-400) | 4310 (4040-4650) | 884 (768-1050) | <1 (-) | 26 (12-40) |
| | | 250mL | <10 (-) | 8 (7-10) | 13 (8-21) | 10 (10-11) | <1 (-) | 9 (8-9) |
| | | 500mL | <10 (-) | 3 (-) | <10 (-) | 4 (-) | <1 (-) | 4 (3-7) |

単位：μg/L

表5 血液成分中の化学物質濃度

| 採血キット | 赤血球 (n=1) | | | | | 血漿 (n=1) | | | | | | |
|--------|-----------|------|----------|-------|-----|----------|------|------|----------|-------|-----|-----|
| | DEHP | 2-EH | シクロヘキサノン | 酢酸エチル | THF | MEK | DEHP | 2-EH | シクロヘキサノン | 酢酸エチル | THF | MEK |
| スペクトラ | 1280 | 116 | 3200 | 1 | 12 | 6 | 3600 | 500 | 17000 | 5 | 21 | 4 |
| アマカス | 1880 | 530 | 8400 | 2 | 2 | 8 | 6300 | 1010 | 13500 | 2 | 1 | 5 |
| 792J | 121 | 26 | 2000 | <1 | 3 | 30 | 860 | 83 | 1370 | 1 | 4 | 5 |
| 995J | 220 | 20 | 260 | <1 | 3 | 9 | 900 | 50 | 100 | 1 | 3 | 7 |
| テルモPPP | 102 | 26 | 1020 | <1 | 4 | 11 | 880 | 76 | 1200 | <1 | 5 | 8 |
| テルモPC | 240 | 31 | 1500 | <1 | 2 | 6 | 1000 | 100 | 1400 | <1 | 3 | 9 |

単位：μg/L

表6 赤血球液（返血中）の化学物質の量

| 採血キット | 赤血球液量 (μL) | 化学物質の量 (μg) (通常の血液量を処理した場合の換算値) | | | | | |
|--------|---------------|---------------------------------|------------|------------|----------|------------|------------|
| | | DEHP | 2-EH | シクロヘキサノン | 酢酸エチル | THF | MEK |
| スペクトラ | 55.4 | 70.9 (1480) | 6.4 (133) | 117 (2440) | <0.1 (-) | 0.7 (14.6) | 0.3 (6.3) |
| アマカス | 48.5 | 91.2 (2190) | 25.8 (620) | 407 (9780) | <0.1 (-) | <0.1 (-) | 0.4 (9.6) |
| 792J | 120.5 | 14.6 (83) | 3.1 (18) | 241 (1370) | <0.1 (-) | 0.4 (2.3) | 3.6 (20.5) |
| 995J | 101.6 | 22.5 (171) | 2.0 (15) | 26 (198) | <0.1 (-) | 0.3 (2.3) | 0.9 (6.9) |
| テルモPPP | 118.8 | 12.1 (81) | 3.1 (21) | 121 (807) | <0.1 (-) | 0.5 (3.3) | 1.3 (8.7) |
| テルモPC | 108.3 | 26.0 (161) | 3.4 (21) | 162 (1000) | <0.1 (-) | 0.2 (1.2) | 0.6 (3.7) |

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|-------------------------------------|-----|-----------|------|
| 1) Kurbanov F, Konndo M, Tanaka Y, Zalaliev M, Mizokami M, <u>Imai M</u> | Human Immunodeficiency Virus in Uzbekistan: Epidemiological and Genetic Analyses | AIDS Res and Hum Retroviruses | 19 | 731-738 | 2003 |
| 2) 市川正孝、三 田村敬子、山 崎雅彦、川上 千春、清水英 明、渡邊寿美、 <u>今井光信</u> 、他 | イムノクロマトグラフィー法 と酵素免疫法を組み合わせた 原理による新しいインフルエ ンザ迅速診断キット（エスプ ライン インフルエンザ A&B）の検討 | 医学と薬学 | 49 | 467-478 | 2003 |
| 3) <u>今井光信</u> 、須 藤弘二、嶋貴 子、西澤雅子、 近藤真規子 | 日本の HIV 感染の Epidemiology と検査体制 | 泌尿器外科 | 別冊 | 156-162 | 2003 |
| 4) Kanayasu- Toyoda T, <u>Yamaguchi</u> T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T | The role of c-Myc on granulocyte colony- stimulating factor- dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells | Biochem. Pharmacol. | 66 | 133-140 | 2003 |
| 5) Iwata A, Satoh K, Murata M, Hikata M, Hayakawa T, <u>Yamaguchi T</u> | Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests | Biol. Pharm. Bull. | 26 | 1065-1069 | 2003 |
| 6) Kanayasu- Toyoda T, <u>Yamaguchi</u> T, Oshizawa T, Hayakawa T | CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133- positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells | J Cell. Physiol. | 195 | 119-129 | 2003 |
| 7) Niimi S, Oshizawa T, <u>Yamaguchi</u> T, Harashima M, Seki T, Ariga T, Kawanishi T, Hayakawa T | Specific expression of annexin III in rat-small- hepatocytes | Biochem. Biophys. Res. Comm. | 300 | 770-774 | 2003 |
| 8) Iwata A, Satoh K, <u>Yamaguchi</u> T, Tomoda A | Antiviral activity of 2- amino-4,4a-dihydro-4a-7- dimethyl-3H-phenoxazine- 3-one on polyiovirus | Tohoku J. Exp. Med. | 200 | 161-165 | 2003 |