

平成16年度厚生労働科学研究費補助金
(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
研究成果報告書

プラスチック製医療用具の
適正使用に関する研究
(H16-医薬-22)

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学
分担研究者	山本 章博	日本医療器材工業会
	荻野 純一	(株)東レリサーチセンター

目次

- I. 総括研究報告書概要
- II. 総括研究報告書
「プラスチック製医療用具の適正使用に関する研究」
中澤 裕之
- III. 分担研究報告書
 - 1. LC/MS/MS を用いた PVC 製医療用具から溶出する DEHP 及び MEHP の同時分析法の構築
中澤 裕之
 - 2. 滅菌処理による PVC 製医療用具中の DEHP に与える影響
中澤 裕之
追加資料 US FDA Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices;
Annex C: Aggregate Safety Assessment for Coexposure to DEHP and MEHP 邦訳
 - 3. 滅菌処理の違いによるポリ塩化ビニル製医療材料の表面状態変化
荻野 純一
 - 4. ポリカーボネート製三方活栓の医薬品によるひび割れの分析
山本 章博
- IV. 研究成果の刊行に関する一覧表
- V. 研究成果の刊行物・別刷り

I. 総括研究報告書概要

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書概要

研究費の名称= 厚生労働科学研究費補助金

研究事業名= 医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

研究課題名= プラスティック製医療用具の適正使用に関する研究

国庫補助金精算所要額(円)= 18,780,000

研究期間(西暦)= 2004-2005

研究年度(西暦)= 2004

主任研究者名= 中澤 裕之 (星薬科大学)

分担研究者名= 山本 章博 (日本医療器材工業会)
荻野 純一 ((株)東レリサーチセンター)

研究目的= フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)及びその代謝物、フタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)について、最新分析機器を駆使した測定法を構築し、PVC 製医療用具からの溶出挙動の解明を目的とした。製品の保存状態、滅菌処理による DEHP 等の溶出挙動の変化についても検討し、安全性評価に資する科学的データの取得を目指した。また、ポリカーボネート(PC)製三方活栓は、接続部で破損(クラック)の発生することが知られており、その発生原因等について検討した。

研究方法= PVC 材質において、滅菌法の種類による DEHP 及び MEHP の溶出量変化を LC/MS/MS を用いて検討し、PVC シート中での深さ方向の DEHP 存在量を加熱脱着 GC-MS 法で測定した。また、透過型電子顕微鏡、フーリエ変換赤外分光法、X 線光電子分光法、原子間顕微鏡を利用し、各種滅菌操作により PVC 材質の表面変化を解析した。

一方、PC 製三方活栓が劣化によるクラックは、医薬品の添加剤成分、接合強度、接合回数および接合時間等の諸条件について検討し、クラック発生の原因を追究した。

結果と考察= 本研究では、PVC チューブから医薬品を介して DEHP だけでなく、滅菌操作により MEHP も溶出することが確認された。本来、DEHP が血中酵素により MEHP に代謝されると考えられてきたが、製品自体に MEHP が含有されているか、代謝酵素以外で MEHP が生成される経路が示唆された。また、市販医療用具が施す滅菌の種類により、DEHP 及び MEHP 溶出量に顕著な差を生じ、PVC 材質の変化が示唆され、表面解析を行ったが、材料表面に顕著な差は見られなかった。しかし、深さ方向での DEHP 存在量を測定したところ、表面付近の DEHP 量が減少していることが判明した。

PC 製三方活栓のクラック発生には、締め付け強度、締め直し回数、使用時間、添加剤濃度等が影響することが明らかとなった。

結論= MEHP は DEHP よりも毒性が強いことが懸念され、今後、PVC 製医療用具からの DEHP や MEHP の溶出量変化を精査すること及びMEHPの毒性等についてを評価する必要がある。また、PC製三方活栓のクラック発生の原因を追究し、発生リスクを低減する対策が求められる。得られる研究成果は、安全性の高い医療用具の開発及び適正使用に寄与するものと期待される。

Ⅱ. 総括研究報告書

プラスチック製医療用具の 適正使用に関する研究

主任研究者 中澤 裕之 星薬科大学 薬品分析化学教室

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金（医薬品医療機器等法「レトリサイエンス」総合研究事業）
総括研究報告書

プラスチック製医療用具の適正使用に関する研究

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学
分担研究者	山本 章博	日本医療器材工業会
	荻野 純一	(株)東レリサーチセンター

研究要旨

プラスチック製医療用具には、種々の機能を付与させるために様々な添加剤が利用されている。その中でも、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ている。この様な可塑剤には、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)に代表されるフタル酸エステル類が広く使用されている。これまで塩化ビニル(PVC)製医療用具を対象とした DEHP の溶出量を測定してきた。本研究においては、これらの成果を踏まえ、DEHP 及びその代謝物であるフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)について、液体クロマトグラフ/タンデム質量分析法等のハイブリッドな最新機器を駆使した高精度な測定法を構築し、フィーディングチューブ、輸液チューブ、血液バッグ等の PVC 製医療用具からの DEHP 等の溶出挙動を解明し、その安全性評価に資する科学的データの取得を目的とした。特に、医療行為や使用前の保存・滅菌処理から DEHP の溶出モデルを想定し、輸液の物性（脂溶性など）、保存状態、滅菌処理、光安定性と溶出挙動との関連を検討し、溶出評価法の確立やリスク評価に活用できるデータの取得を目的とした。

また、複数の医薬品を輸液する際に使用されるポリカーボネート(PC)製三方活栓は、まれにそのメスコネクタ部にひび割れ(クラック)を発生することが知られているが、発生条件は十分に解明されていない。そこで本研究では、医薬品の添加成分や三方活栓と接続する医療用具との接合強度等の条件を広範囲に検討し、クラック発生原因追求を行った。

A. 研究目的

現在、医療現場ではプラスチック製ディスプレイ製品が汎用されている。中でも、ポリ塩化ビニル (PVC) 樹脂は、加工性に優れ、滅菌への耐久性も高く、安価で

あるなどの理由から、輸液セット、血液バッグ及びチューブ類をはじめとした主要製品の原材料として多用されている。

一方、PVC 製品に柔軟性を付与するために添加されている可塑剤（フタル酸ジ-2-エ

チルヘキシル, DEHP) は, 齧歯類に対する精巢毒性や発生毒性を示すことが知られている化学物質である¹⁻³⁾. DEHP は, 食品や血液などと接触することによりPVC製品表面から容易に溶出するため, ヒトへの健康影響が危惧されている⁴⁾. 日本では, 厚生労働省が組織した食品衛生調査会・器具容器包装部会合同会において, DEHP の耐用一日摂取量 (Tolerable dairy intake, TDI) が 40~140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ と設定され, 可塑剤としてDEHPを含むPVC製品は乳児用玩具や食品用手袋などとして使用しないように一部規制されている.

このようにPVC製医療用具において, 使用時の条件等に応じて, 可塑剤が溶出することが報告されており, 患者は医療行為を通して比較的多量の暴露を受ける可能性がある. 近年, Center for Devices and Radiological Health, U.S. Food and Drug Administration (FDA)⁵⁾や Health CANADA⁶⁾より, 実際の医療行為による患者へのDEHP暴露に関する詳細な研究が発表された. 日本においても, 我が国で使用されている代表的なPVC製品を使用して実際の医療行為に伴うDEHP曝露量を評価する研究が平成13年度に実施され, 成人患者及びDEHPに対する感受性が比較的高いと危惧されている患者群 (新生児, 乳児, 幼児, 妊婦など) を対象としたリスク・ベネフィット解析が行われている. この成績に基づいて, 厚生労働省医薬局は平成14年10月に『医薬品・医療用具等安全性情報』を通知し, 医療関係者に対してリスク患者群へのPVC製医療用具の適用に関して注意喚起すると共に, 医療機器メーカーに対して代替品の開発を進めるように促している⁷⁾.

PVC製医療用具への関心が高まる中, その詳細な規則や溶出挙動などは解明されているとは言い難く, PVC製医療用具の様々な状態がDEHPの溶出挙動に何らかの影響を与えることは十分考えられる.

特に, 製造工程で行われる滅菌処理は, 高エネルギーを付与するものであり,

また, ポリカーボネート(PC)は, 耐衝撃性, 耐熱性, 成形での寸法精度が高いことから医療用具において広く用いられており, 市販されている三方活栓のほとんどがPC製である. その一方で, PC製三方活栓は使用中にひび割れ(クラック)を生じることが知られており, 中尾ら⁸⁾は, その原因を脂肪乳剤であると報告した. しかし, 脂肪乳剤以外の添加剤でもクラックが発生することが明らかとなり, この原因を広範囲に検討することとした.

本研究では, 下記の項目別に検討を実施し, 基礎的な情報を収集することにより, 医療用具使用時のリスク・ベネフィットの正確な評価に役立てるものと思われる.

1. LC/MS/MSを用いたPVC製医療用具から溶出するDEHP及びMEHPの同時分析法の構築
2. 滅菌処理によるPVC製医療用具中のDEHPに与える影響
3. 滅菌処理の違いによるポリ塩化ビニル製医療材料の表面状態変化
4. ポリカーボネート製三方活栓の医薬品によるひび割れの分析

B. 研究方法

1. 材料及び試薬

PVC製医療用具のモデルとして, シート

状の製品を用い、次の滅菌処理を実施したものを対象とした。

- ①未処理（滅菌処理していないもの）
- ② γ 線滅菌（ γ 線照射量20～25kGy）
- ③エチレンオキシドガス（EOG）滅菌
- ④高圧蒸気滅菌

詳細については、各分担報告書に記載されている。

2. 可塑剤測定用装置

LC/MS/MSとして、LC部は、アジレント社製 Agilent 1100（バイナリポンプ、G1321A; 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、G1379A）及び質量部はアプライドバイオシステムズ社製 API 4000 を用いた。

断面 TEM 観察には日立社製の透過型電子顕微鏡 H-7100FA、X線光電子分光分析には、

VG Scientific 社製 ESCALAB220iXL を使用した。更に、3次元表面粗さの計測には、KLA-Tencor 社製の触針式3次元表面粗さ計 P-15 を、表面粗さ計測には MTS システムズ社製の Nano Indenter XP を使用した。

PVC シート切削片中の DEHP 含量は、熱脱着 GC/MS 分析で定量した。熱脱着 GC/MS 分析装置は、日本電子製 JMS-AM SUN300 型 GC/MS 分析装置およびフロンティア・ラボ社製 PY-2020D 型ダブルショットパイロライザーである。

3. 実験方法

3.1. LC/MS/MS を用いた PVC 製医療用具から溶出する DEHP 及び MEHP の同時分析法の構築

LC/MS/MS はターボスプレーイオン化法によりイオン化を行った。カラムは関東化学社製 Mightysil® RP-18 GP (5 x 2.0 mm, 5 μ m)、前処理カラムには Waters 社製 OASIS® HLB extraction column (20 x 2.1 mm, 25 μ m) を用いた。データ解析には Analyst 1.3.2 を使用した。HPLC 部にはカラムスイッチングを用いた。MS/MS 測定における MRM 値は次の通りである。

モニタリングイオン (Mode, Precursor ion→Product ion): DEHP (positive, m/z 391→149), DEHP- d_4 (positive, m/z 395→153), MEHP (negative, m/z 277→134), MEHP- d_4 (negative, m/z 281→138)

なお、試験に供した医薬品は、添付文書に従って調製した。

3.2. 滅菌処理による PVC 製医療用具中の DEHP に与える影響

各種滅菌済みの PVC シートを 1 x 3 cm に型取り、各溶出試験用溶液 5 mL が入ったガラス製スピッツ管に浸し、37℃、1 時間抽出した。その後、バイアル瓶に試験溶液 1 mL 及び内標準物質（DEHP- d_4 及び MEHP- d_4 ）を 50 ng 封入し、LC/MS/MS にて分析した。

また、各溶出試験用溶液を PVC チューブに 8 cm 高に封入し、室温下、1 時間緩やかに振とう抽出した。抽出液を適宜希釈し、内標準物質（DEHP- d_4 及び MEHP- d_4 ）と共にバイアルに封入後、直接注入し、LC/MS/MS にて分析した。分析条件は 3.1. と同様である。溶出試験用溶液の詳細は、分担研究報告書に記載されている。

3.3. 滅菌処理の違いによるポリ塩化ビニ

ル製医療材料の表面状態変化

3.3.1 電子顕微鏡(TEM)観察

加速電圧 100 kV の条件とした。観察のための試料調整法として、PMMA 包埋超薄切片法、およびエポキシ包埋 RuO₄ 染色超薄切片法を用いた。

3.3.2 X線光電子分光分析(XPS)分析

励起X線は、monochromatic AlK_{α1,2}線 (1486.6 eV) , X線径を1 mm, 光電子脱出角度 (試料表面に対する検出器の傾き) 90° の条件とした。

3.3.3 3次元表面粗さ計測

視野サイズ: 2 mm角, スキャン速度: 100 μm/s, 探針半径: 2 μm, 荷重: 5 mg, データ数: X=1000ポイント (2 μm間隔), Y=250ライン (8 μm間隔) の条件とした。

3.3.4 表面硬さ計測

ナノインデンテーション法 (連続剛性測定法) により実施した。使用圧子は、ダイヤモンド製正三角錐圧子, 測定雰囲気は21±℃, 60±5 %RH, 最大押し込み深さは約50 μmとした。

3.3.5 切削サンプリングおよび熱脱着GC/MS分析

試料表面を, 厚みを変えて薄く切削し, DEHP の深さ方向分布の変化を分析した。定量に用いた切削試料片は 0.06~0.2 mg, 熱脱着温度は 300 °Cとした。

3.4. ポリカーボネート製三方活栓の医薬品によるひび割れの分析

ひび割れの発生条件として医薬品の添加剤の種類その他, 三方活栓と他の医療用具との締め付け強度 (強さ), 締め付けの回数, 締め付けた状態での時間 (使用時間を想定) を設定し試験を実施した。

3.4.1 医薬品の添加剤の種類及び濃度

各種の添加剤成分を含む医薬品について試験した。対照として生理食塩液を使用し, 全ての医薬品は原液のまま使用した。添加剤成分の詳細は, 分担研究報告書に記載されている。

3.4.2 締め付け強度

締め付け強度は, 15, 30, 40 cN·m (cN·m ; センチニュートン・メートル) で試験した。

3.4.3 締め付け回数

一度締め付けた後に放置する方法と, 観察時間ごとに締め直しを行った方法の 2 種類を検討した。

3.4.4 ひび割れの観察方法

市販の三方活栓のメスコネクタ部に医薬品を数滴滴下し, ロックタイプのオスコネクタを締め付けた。ひび割れの確認は, 圧力 20 kPa のエアで水没試験をし, エアリークが確認されたものをひび割れとした。

初回締め付け直後, 1日後, 2日後, 3日後, 4日後及び7日後に観察した。

4. 倫理面への配慮

各分担研究に従い, 検討及び報告を実施する。

C. 研究結果及び考察

本研究では, 製造工程における滅菌処理が, PVC 製医療用具からの DEHP 及び MEHP の溶出量にどのような影響があるかを中心に可塑剤に関する安全性評価等を検討した。

DEHP 溶出報告がある医薬品を用いたところ, PVC 製シートからは DEHP だけでなく, MEHP の溶出も確認された。こ

れにより本来、DEHP が血中酵素により MEHP に代謝されると考えられてきたが、MEHP が既に含有されている、あるいは代謝酵素以外で MEHP が生成される経路が示唆された。

また、市販医療用具が施す滅菌の種類により、DEHP 及び MEHP 溶出量に顕著な差を生じた。これは適用する医薬品を変化させても同様の差を生じていることより、滅菌操作による PVC 材質の変化が生じていることが示唆された。そこで、表面解析を行った。電子顕微鏡観察の PMMA 包埋超薄切片法では、 γ 線滅菌済みシートで、やや一次粒子が不明瞭であり、 γ 線により何らかの構造影響を受けている可能性が示唆された。また、XPS 分析においては、 γ 線滅菌処理品では、他と比較して、僅かに Cl が少ない傾向にあった。表面硬さ計測において、 γ 線滅菌品では、表面付近（表面からの深さ約 $10\mu\text{m}$ 以下）で、硬さが増していた。

各試験において、各滅菌済み PVC 製品において表面に差は認められたものの、顕著な差ではなかった。

また、PC 製医療用具において、クラックの発生原因を追究した。脂肪乳剤を含有する医薬品では、締め直しをしない場合、ひび割れは発生しなかったが、締め直しをすることでひび割れが発生し、締め直し回数の増加に従い、ひび割れの発生率は増加した。脂肪乳剤の濃度によるひび割れの発生率では脂肪乳剤の濃度の高い方がひび割れを発生することが確認された。

また、締め付け強度はひび割れに強い影響を与えることが明確になった。

その他の添加剤でも脂肪乳剤と概ね同じ

結果を得た。プロピレングリコールとエチレンジアミンを含有する医薬品を用いた場合には、ひび割れの発生率は高い値を示した。

この結果は、医療現場における安全対策の一助として応用できる可能性が非常に高く、PC 製医療用具の適用使用について大きく貢献できるものと思われる。

PVC 製品の滅菌処理において、表面解析では顕著な差が観察されなかったが、DEHP 及び MEHP 溶出量に顕著な差が見られた。DEHP は精巣毒性等を示すことが知られており、代謝物である MEHP は DEHP よりも毒性が強いことが懸念されている。PVC 製医療用具の保存状態や滅菌における、DEHP や MEHP の溶出量変化を把握すること並びに MEHP の毒性等について評価することは、使用する医療用具の安全性を確保する上で重要である。

D. 結論

医療現場において、PVC 製品が治療のために使用される頻度は非常に高い。また、医療用具業界はトリメリック酸系代替可塑剤 (TOTM) の利用に活路を見出しつつあるが、未だ多くの PVC 製品が可塑剤として DEHP を使用しているのが現状である。しかし、 γ 線滅菌により DEHP のみならず MEHP も高濃度で溶出してくることが明らかとなった。MEHP は DEHP よりも毒性が強いと懸念されており、今後、詳細な検討が要求される。

また、PC 製三方活栓に生じるクラックは、添加剤濃度のみならず、締め直し強度や回数、使用時間に影響を受けることが明らかとなった。これによりクラックの発生リス

クを低減する使用法が推奨できる。

医療用プラスチック製品の材質に残留する化学物質やその安全性評価等の詳細な研究は、稀少である事実は免れず、多岐にわたる情報が必要と考えられる。その情報や研究成果に基づいて、安全な医療行為を早急に設けなければならず、そのスクリーニング測定や技術の開発を研究計画の第一としなければならない。本研究で得られる研究成果は、医療用具の適正使用に大きく寄与するものと期待される。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究成果

- 1) Takatori S, Kitagawa Y, Kitagawa M, Nakazawa H, Hori S.: Determination of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004; 804(2): 397-401.
- 2) Haishima Y, Seshimo F, Higuchi T, Yamazaki H, Hasegawa C, Izumi S, Makino T, Nakahashi K, Ito R, Inoue K, Yoshimura Y, Saito K, Yagami T, Tsuchiya T, Nakazawa H.: Development of the simple method for predicting the levels of di(2-ethylhexyl)phthalate migrated from PVC medical devices to pharmaceutical solutions. *Int. J. Pharm.*, 2005; 288: 177-183.
- 3) R. Ito, F. Seshimo, C. Hasegawa, K. Isama, T. Yagami, T. Tsuchiya, K. Nakahashi, H. Yamazaki, K. Inoue, Y. Yoshimura, K. Saito, Y. Haishima, H. Nakazawa, Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical devices., *Int. J. Phram.*, in press.
- 4) R. Ito, F. Seshimo, N. Miura, M. Kawaguchi, K. Saito, H. Nakazawa, High-throughput determination of mono- and di(2-ethylhexyl)phthalate migration from PVC tubing to drugs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, in press.
- 5) 瀬下文恵, 伊藤里恵, 山崎晴子, 井之上浩一, 小椋哲雄, 斉藤貢一, 中澤裕之. LC/MS/MSによるPVC製医療用具から溶出する可塑剤の分析. 日本分析化学会第53年会(2004年9月・千葉)
- 6) 配島由二, 瀬下文恵, 伊佐間和郎, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江, 中橋敬輔, 井之上浩一, 伊藤里恵, 中澤裕之. PVC製医療機器の光照射・熱処理によるDEHP溶出挙動の解析. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004(2004年11月・茨城)
- 7) 配島由二, 樋口多恵, 瀬下文恵, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江, 中橋敬輔, 井之上浩一, 伊藤里恵, 中澤裕之. PVC製医療機器からのDEHP溶出リスクを予測する簡易分析法の開発. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2004(2004年11月・茨城)
- 8) 瀬下文恵, 配島由二, 伊藤里恵, 伊佐間和郎, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江, 中橋敬輔, 井之上浩一, 斉藤貢一, 中澤裕之. 光照射及び加熱処理を施した

PVC 製医療機器からの DEHP 溶出に対する影響. 日本薬学会第 125 年会 (2005 年 3 月・東京)

- 9) 配島由二, 瀬下文恵, 長谷川千恵, 矢上健, 土屋利江, 中橋敬輔, 伊藤里恵, 井之上浩一, 斉藤貢一, 中澤裕之. PVC 製医療機器からの DEHP 溶出リスクを予測する簡易分析法の有用性評価. 日本薬学会第 125 年会 (2005 年 3 月・東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

UV 照射を利用した表面加工処理による軟質プラスチック製品からの可塑剤溶出制御 (特許出願準備中)

【参考文献】

- 1) Poon R., Lecavalier P., Mueller R., Valli V.E., Procter B.G., Chu I., *Food Chem. Toxicol.*, 35, 225-239 (1997)
- 2) Lamb J.C.: Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 88, 255-269 (1987)
- 3) Tyl R.W., Price C.J., Marr M.C., Kimmel C.A., *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10, 395-412 (1988)
- 4) 厚生省 生活衛生局食品化学課長通知: 塩化ビニル製手袋の食品への使用について 衛化第 31 号 (2000.6.14)
- 5) Center for Devices and Radiological Health, U.S. Food and Drug Administration (FDA), September 4th (2001)
- 6) Health Canada Expert Advisory Panel on DEHP in Medical Devices, January 11 (2002)
- 7) 厚生労働省医薬局 医薬品・医療用具等安全性情報 No. 182, 平成 14 年 10 月
- 8) 中尾正和 他, *麻醉* 49, (7), 802-805 (1998)

Ⅲ. 分担研究報告書

1. LC/MS/MS を用いた PVC 製医療用具から 溶出する DEHP 及び MEHP の同時分析法 の構築

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学	薬品分析化学教室
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	井之上浩一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学	薬品分析化学教室
	瀬下 文恵	星薬科大学	薬品分析化学教室

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) 研究報告書

LC/MS/MS を用いた PVC 製医療用具から溶出する DEHP 及び MEHP の同時分析法の構築

主任研究者	中澤 裕之	星薬科大学	薬品分析化学教室
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	井之上浩一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学	薬品分析化学教室
	瀬下 文恵	星薬科大学	薬品分析化学教室

研究要旨

ポリ塩化ビニル (PVC) 製医療用具中の可塑剤 (フタル酸ジ-2-エチルヘキシル ; DEHP) は、血液や脂溶性医薬品、経口・経腸栄養剤などに溶出することから、医療行為に伴う DEHP 暴露が懸念されており、そのリスク評価が求められている。本研究では、PVC 製医療用具から溶出する 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 (MEHP) の簡便かつ迅速な分析法の構築を目的とした。

DEHP は生活環境中に広く存在する化学物質であり、分析値の信頼性確保には実験操作過程におけるコンタミネーションを最小限にする必要がある。そこで、本研究では、試料前処理操作を閉鎖系で行うためにカラムスイッチングによるオンライン固相抽出法を構築し、液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) の最適測定条件を検討し、脂溶性医薬品への移行量を測定した。

A. 研究目的

医療現場では、プラスチック製ディスプレイ製品が広く用いられており、ポリ塩化ビニル (PVC) 樹脂は、輸液セット、血液バッグ及びチューブ類をはじめとした主要製品の原材料として多用されている。一方、PVC 製品中の可塑剤として用いられるフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) は生殖・発生毒性を示す^{1,3)}ことから、厚生労働省では一般毒性化学物質として捉え、食品や乳幼児用玩具への DEHP の使用を規制している⁴⁾。また、食品衛生調査会毒性・

器具容器包装合同部会では、DEHP の耐容一日摂取量 (TDI : Tolerable Daily Intake) を 40~140 µg/kg/day と設定した⁴⁾。

医療分野においては、医療用具が恒常的に使用されるわけではないこと、また、治療は生命、身体に切迫した危険を排除するための緊急手段であり、その治療行為をより安全に行うことが優先されるべきであるとのリスクベネフィットの考え方から、これまで PVC 製品から溶出する DEHP について特段、規制が設けられてこなかった。しかしながら、DEHP に関する研究及び代替

品の開発が進められてきたことを受け、米国 FDA (Food and Drug Administration) や Health Canada は、治療行為に伴う患者の DEHP 暴露量を検討するため、治療法別にリスク評価を行い、注意を喚起している⁵⁻⁶⁾。

我が国では、平成 13 年度厚生科学研究医薬安全総合研究事業において、実際に使用される条件下での個々の医療用具（国内市場流通品）からの DEHP 溶出量を検討した。その結果を踏まえ、平成 14 年 10 月厚生労働省は、DEHP 含有 PVC 製医療用具に関する知見を紹介すると共に、医療関係者及び医療用具メーカー等に対し、临床上使用される PVC 製医療用具について必要な注意を喚起した⁷⁾。また、代替品への切り替えが進められているが、未だ DEHP 含有 PVC 製品の使用頻度は高い。また、代替品においても DEHP より溶出量は少ないとはいえ、同等の柔軟性を与えるために可塑剤の添加量が多量となる点や、代替品自体の安全性が十分に究明されていないこと、医薬品成分の吸着による含量低下等の問題点も多い。このため、PVC 製医療用具の安全性に関しては、詳細な研究が引き続き必要である。

また、生体内で DEHP は、膵臓から分泌されたりパーゼや血中の各種エステラーゼによりエステルが加水分解を受け、フタル酸モノ-2-エチルヘキシル (MEHP) を生成することが知られている。毒性に関しては、親化合物である DEHP よりも MEHP の毒性発現の方が強いとの報告があり^{8,9)}、PVC 製医療用具から溶出する DEHP のリスク評価においては、MEHP の同時測定も要求されている。そこで、本研究では選択性の高いタンデム質量分析法 (MS/MS) を利用し、高感度かつハイスループットな同時分析法

を構築し、脂溶性医薬品へ移行する DEHP 及び MEHP 量を測定した。

B. 研究方法

B-1. 材料及び試薬

PVC 製チューブは、異なるメーカー製の輸液用延長チューブ 2 種類を用いた。これらは研究用に提供されたもので、いずれも未滅菌品である。

PVC 製品からの DEHP 溶出試験用医薬品としては、既に DEHP 溶出報告のあるプログラフ[®]注 (タクロリムス水和物：藤沢薬品工業株式会社製)、フロリード F 注 (ミコナゾール：持田製薬株式会社製)、ラステット[®]注 (エトポシド製剤：日本化薬株式会社製) を用いた。いずれの医薬品も添付文書を参考に、実際の使用濃度となるよう 5 %ブドウ糖液を用いて希釈した (Table 1)。

DEHP 及び DEHP-d₄ (内標準物質) 標準品は関東化学社製 (環境分析用) を、MEHP 及び MEHP-d₄ (内標準物質) 標準品は林純薬社製を用いた。LC/MS/MS 用移動相に用いたアセトニトリル及び器具洗浄に用いたアセトンは、関東化学社製 (フタル酸エステル試験用)、メタノールは和光純薬工業社製 (残留農薬・PCB 試験用) を用いた。精製水は Millipore 社製の Milli-Q gradient-A10 EDS ポリッシャー付き精製水装置を用いて調製した。

実験に用いた全てのガラス製器具及び金属製器具類は、フタル酸エステル試験用アセトンにて洗浄してから実験に用いた。さらに、加熱可能な器具については 240℃で 2 時間以上焼成処理を行った後に使用した。

B-2. LC/MS/MS 測定条件

B-2-1 分析装置

分析用ポンプとして Agilent 社製 1100 シリーズ、送液用ポンプとして島津製作所製 LC-10AS を用いた。質量分析器にはアプライドバイオシステムズ社製 API 4000 を用い、ターボスプレーイオン化 (TSI) 法によりイオン化を行った。カラムは関東化学社製 Mightysil® RP-18 GP (5 x 2.0 mm, 5 µm)、前処理カラムには Waters 社製 OASIS® HLB extraction column (20 x 2.1 mm, 25 µm) を用いた。データ解析には Analyst 1.3.2 を使用した。

B-2-2 LC 測定条件

LC 分析条件は以下の通りであり、Table 2 に移動相のタイムプログラムを示す。

- ・移動相(A): Water (1.0 mL/min)
- ・移動相(B): Acetonitrile / Water = 90 / 10 (v/v) (0.2 mL/min)
- ・注入量: 20 µL
- ・カラム温度: 40°C

B-2-3 MS/MS 測定条件

- ・モニタリングイオン (Mode, Precursor ion → Product ion): DEHP (positive, m/z 391 → 149), DEHP-d₄ (positive, m/z 395 → 153), MEHP (negative, m/z 277 → 134), MEHP-d₄ (negative, m/z 281 → 138)
- ・イオン化電圧: 5500 V (DEHP, DEHP-d₄), -4500 V (MEHP, MEHP-d₄)
- ・イオン源温度: 650°C
- ・ネブライザーガス圧: N₂ (30 psi)
- ・ターボガス圧: N₂ (0 psi)
- ・カーテンガス流量: N₂ (DEHP&DEHP-d₄: 20 psi, MEHP&MEHP-d₄: 30 psi)
- ・コリジョンガス圧: N₂ (DEHP&DEHP-d₄:

2*, MEHP&MEHP-d₄: 1*)

* 装置(API 4000)固有の設定数値

B-3. 標準溶液の調製

DEHP 及び DEHP-d₄, MEHP 及び MEHP-d₄ 標準試薬を精秤し、アセトニトリルに溶解して各標準原液を調製した。その後、この標準原液からアセトニトリル/水=50/50 (v/v)の混合溶液で希釈したものを標準溶液とした。これらの標準溶液は 4°C で保存した。

B-4. 溶出試験

2 種類の PVC チューブに各医薬品溶液を 8 cm 高で封入し、室温下、1 時間緩やかに振とう抽出した。抽出液をガラス製試験管に移して、検量線の範囲内となるよう適宜希釈した後、試料 1 mL に DEHP-d₄ 及び MEHP-d₄ を 50 ng 添加したものを直接注入し、LC/MS/MS にて分析した。

B-5. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト及び動物由来の組織、臓器、細胞などを使用していないため、倫理面への特別な配慮は行っていない。

C. 研究結果

C-1. 測定条件の検討

医薬品中に含まれる界面活性剤等の夾雑成分の除去を目的として、固相抽出法を検討した。DEHP は生活環境中に広く存在する物質であり、試薬や空気、実験器具等、実験環境からのコンタミネーションが懸念される。そこで、実験操作を簡略化し、閉鎖系での前処理が可能となるカラムスイッチング (CS) によるオンライン固相抽出を

試みた (Figure 1).

まず、前処理カラムに精製水を送液し、目的物質の保持及び目的物質以外の高極性夾雑成分の除去を行った。さらに、3分後、バルブを切り替えてバックフラッシュにより有機溶媒含有率の高い移動相 (アセトニトリル/水 = 90/10 (v/v)) を送液することで、前処理カラムから目的物質を溶出させ、測定した。

また、MS/MS の高い選択性を利用して迅速な分析を行うため、フローインジェクションによる分析を試みたが、良好なピーク形状が得られなかった。これは、CS によりバルブを切り替えることで、一瞬ではあるが送液が遮断される影響が大きく出たと考えられる。そこで、ショートカラムである関東化学社製 Mightysil[®] RP-18 GP (5 x 2.0 mm, 5 µm) を用いたところ、良好なピーク形状が得られた。また、その際の保持時間は、DEHP 及び DEHP-d₄ が約 4.2 分、MEHP 及び MEHP-d₄ が約 3.6 分であり、前処理を含めた 1 試料当たりの測定は 8 分以内とハイスループット分析が達成できた。

さらに、高精度な分析法を構築するため、DEHP 及び MEHP の重水素置換体である DEHP-d₄ 及び MEHP-d₄ をサロゲートとして用いる内標準法を採用した。DEHP はポジティブモードで m/z 391 の分子イオンが、MEHP はネガティブモードで m/z 277 の分子イオンが観察され、これらをプリカーサーイオンとした。さらに、コリジョンガスによりプリカーサーイオンが開裂することでプロダクトイオンが生じる。DEHP 及び MEHP のプロダクトイオンを測定したところ、それぞれ m/z 149 及び m/z 134 が観察されたことから、本分析法では、Multiple

Reaction Monitoring (MRM) で、DEHP m/z 391→149 及び MEHP m/z 277→134 をモニタリングイオンとした。また、MS/MS のイオン化について種々検討し、測定条件の最適化を行った。

C-2. DEHP 及び MEHP の測定

C-2-1 分析バリデーション

ブランク試験において DEHP 及び MEHP のピークが検出されたことから、 $S/N > 10$ を定量限界としたところ、それぞれ 2.5 ng/mL 及び 0.75 ng/mL であった。また、標準溶液を用いてそれぞれの検量線を作成したところ、相関係数 0.998 (DEHP 濃度範囲: 2.5-500 ng/mL) 及び 0.997 (MEHP 濃度範囲: 0.75-500 ng/mL) と良好な直線性を示した。

C-2-2 添加回収試験

5 %ブドウ糖液を用いて、DEHP 及び MEHP の添加回収試験を行った。得られたクロマトグラムを Figure 2 に示す。DEHP の平均回収率は 99.2 % (RSD=3.2 %, $n = 6$)、MEHP の平均回収率は 109.0 % (RSD=3.4 %, $n = 6$) と良好な結果が得られた。

C-2-3 医薬品溶液の検量線

各医薬品溶液中の DEHP 及び MEHP を測定するにあたり、医薬品成分の種類や濃度により妨害ピークや測定感度の低下などの影響が大きく現れることが考えられた。そこで、ブランクの医薬品溶液に各濃度の標準溶液を一定量ずつ添加して検量線を作成した。5 %糖液においては、各々の標準溶液により作成した検量線と同様の結果が得られた。しかしながら、プログラブ[®]注、フロリド[®]注及びラステット[®]注では若干の変

動が見られたことから、標準添加法における医薬品ごとの検量線を用いた結果、良好な直線性が得られた (Table 3)。

C-3. PVC チューブからの溶出試験

構築した分析法を用いて、2 種類の異なるメーカー製の PVC チューブから溶出する DEHP 及び MEHP を測定した (Table 4)。

各医薬品への DEHP 溶出量は、2 種類のチューブでほとんど差はなかった。一方、5 %糖液及びプログラフ®注においては、MEHP の溶出も確認された。DEHP では同一医薬品に対する 2 種類のチューブからの溶出量はほぼ同等であったが、MEHP では同一医薬品においても、チューブごとに 3 倍程度の差が生じた。また、フロリード®注及びラステット®注については、溶出した DEHP 量にあわせて適宜希釈したため、MEHP は検出限界以下であった。

D. 考察

本研究では、LC/MS/MS を用いて、PVC 製医療用具から溶出する DEHP 及びその分解物である MEHP の迅速かつ簡便な同時分析法を構築した。その際、測定環境からのコンタミネーションが懸念されることから、閉鎖系での前処理を目的として、カラムスイッチングによるオンライン固相抽出法を利用することで、前処理操作が簡便化されるとともに、コンタミネーションの軽減化が可能となった。また、MS/MS の高い選択性を利用し、カラムによる分離を行わないことで、迅速分析が達成された。

さらに、構築した方法を用いて、2 種類の異なるメーカー製の PVC チューブの溶出試験を行った。各医薬品への DEHP 溶出量

は、2 種類のチューブ共にほぼ同等であったことから、これらのチューブの DEHP 含量は同程度であると推測された。一方、DEHP 溶出力のほとんどない 5 %糖液においては、DEHP 溶出量以上に MEHP が検出され、その量はチューブ間で約 3 倍程度の差であった。プログラフ®注においても、5 %糖液と同様にチューブ間で MEHP 溶出に約 3 倍程度の差が認められた。血液バッグ中で、酵素により DEHP から MEHP が生成するとの報告はあるが、一般的な合成医薬品中ではそのような現象は考えにくい。PVC バッグ中の生理食塩水や 5 %糖液中への MEHP 溶出報告もあるが、バッグへの溶液封入後の加熱滅菌過程により DEHP が加水分解したのではないかとの見解が示されている¹⁰⁻¹³⁾。しかしながら、今回の条件では、溶出試験時に熱等のエネルギーを付加しておらず、DEHP が加水分解することにより MEHP が生成したとは考えにくい。さらに、チューブ間で差が生じたということは、これら PVC チューブ材質自体に MEHP が存在し、その含有量が異なるためであると考えられた。これらのことから、溶出した DEHP から MEHP が生成したのではなく、PVC 材質中に存在する MEHP が溶出していることが示唆された。また、5 %糖液において、比較的高極性である MEHP の溶出量が DEHP よりも多いことからこのことは推測される。

従来、難水溶性医薬品からの DEHP 溶出のみに着目されていたが、より生体への影響が大きいと考えられる MEHP が水溶性溶液によって溶出することが示唆され、詳細な研究が必要であると思われる。

E. 結論

本研究で構築した方法は、DEHP 及びその分解物である MEHP のハイスループットな同時分析法として、医療行為に伴う DEHP リスク評価への適用が可能である。

今回得られた結果では、PVC 材質中で MEHP が生成し、水などの DEHP 溶出力のない溶媒に対しても容易に溶出するという問題点が新たに判明した。今後、この問題点は PVC 製品の安全性について優先検討課題になると考えられ、MEHP の溶出挙動に関して詳細な研究を進めるとともに、その溶出を抑える方法の探究が求められる。また、MEHP の毒性の評価を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

- 1) R. Ito, F. Seshimo, C. Hasegawa, K. Isama, T. Yagami, T. Tsuchiya, K. Nakahashi, H. Yamazaki, K. Inoue, Y. Yoshimura, K. Saito, Y. Haishima, H. Nakazawa, Reducing the migration of di-2-ethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride medical device., *Int. J. Pharm.*, in press.
- 2) 瀬下文恵, 伊藤里恵, 山崎晴子, 井之上浩一, 小椋哲雄, 斉藤貢一, 中澤裕之. LC/MS/MS による PVC 製医療用具から溶出する可塑剤の分析. 日本分析化学会第 53 年会 (2004 年 9 月・千葉)
- 3) 配島由二, 瀬下文恵, 伊佐間和郎, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江, 中橋敬輔, 井之上浩一, 伊藤里恵, 中澤裕之. PVC 製医療機器の光照射・熱処理による DEHP 溶出挙動の解析. 日本バイオマテ

リアル学会シンポジウム 2004 (2004 年 11 月・茨城)

- 4) 配島由二, 樋口多恵, 瀬下文恵, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江, 中橋敬輔, 井之上浩一, 伊藤里恵, 中澤裕之. PVC 製医療機器からの DEHP 溶出リスクを予測する簡易分析法の開発. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004 年 11 月・茨城)
- 5) 瀬下文恵, 配島由二, 伊藤里恵, 伊佐間和郎, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江, 中橋敬輔, 井之上浩一, 斉藤貢一, 中澤裕之. 光照射及び加熱処理を施した PVC 製医療機器からの DEHP 溶出に対する影響. 日本薬学会第 125 年会 (2005 年 3 月・東京)
- 6) 配島由二, 瀬下文恵, 長谷川千恵, 矢上 健, 土屋利江, 中橋敬輔, 伊藤里恵, 井之上浩一, 斉藤貢一, 中澤裕之. PVC 製医療機器からの DEHP 溶出リスクを予測する簡易分析法の有用性評価. 日本薬学会第 125 年会 (2005 年 3 月・東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

【参考文献】

- 1) Poon R., Lecavalier P., Mueller R., Valli V.E., Procter B.G., Chu I., *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 225-239 (1997)
- 2) Lamb J.C.: Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 255-269 (1987)
- 3) Tyl R.W., Price C.J., Marr M.C., Kimmel C.A., *Fundam. Appl. Toxicol.*, **10**, 395-412 (1988)