

究所)では「医療機器開発ガイドライン」, 厚生労働省側(事務局: 国立医薬品食品衛生研究所)は「次世代医療機器評価指標」を作成することにより, 以前から指摘されていたデバイス・ラグを解消し, 次世代医療機器をいち早く患者のもとに届けることを目的としている。本事業が対象とする製品は技術開発の進展が著しい次世代医療機器であることを勘案し, 評価指標自体は将来的に起こり得る技術の革新や更なる知見の集積等によって改訂されるものであり, 申請内容に対して法的な拘束力を有するものではない。また, 評価指標は企業における医療機器開発の効率化や, PMDAが実施している治験相談及び薬事戦略相談等にも有効に活用されている。対象製品は異なるが, 評価指標及び開発ガイドラインともに平成25年5月時点でそれぞれ19件作成されている。

#### 1.6 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業<sup>11)</sup>

平成24年度から開始された厚生労働省の施策である。最先端の技術を用いた革新的な医薬品・医療機器・再生医療製品については, 当該技術に対応できる人材が不足しており, ドラッグ・ラグ及びデバイス・ラグ等の原因となっているが, 本事業ではこれらを解消するために最先端の技術を研究している大学等において, レギュラトリーサイエンスを基盤とした安全性と有効性の評価方法の確立を図りガイドラインの作成を行うと共に, 大学・研究機関等とPMDA, 国立医薬品食品衛生研究所の間で人材交流を実施し, 最先端の技術を習得した人材の育成を図ることを目的としている。現在, 医療機器分野においては7件の課題が選定されている。

#### 1.7 薬事戦略相談<sup>12)</sup>

大学, 研究機関またはベンチャー企業等において有望なシーズが発見されたとしても, 当事者が製品化につなげるための開発戦略に精通していなければ, そのシーズを活かすことは難しい。この問題を解決する一助として, PMDAは日本発の革新的医療機器の創出に向けて, 設計初期段階から臨床開発初期に至るまでに必要な試験等についてデータの評価を伴う案件や治験計画策定等に関する相談への指導・助言を行っている。利用者のニーズに合わせて個別面談, 事前面談または対面助言が準備されている。個別面談では, 希望する相談内容の薬事戦略相談への適否や薬事戦略相談事業の内容や手続きを確認することができる。対面助言では, 相談者から提出された資料を担当審査部の審査チームが精査し, 今後実施する治験や承認申請に向けた具体的な助言・指導を公式見解として得ることができる。事前面談では効率的な対面助言に向けて, 相談内容, 論点整理, 資料内容の確認を行う。

## 2. 医療機器審査の視点と保険収載

### 2.1 基本的事項<sup>13-15)</sup>

薬事法第2条第4項において、医療機器とは「人若しくは動物の疾病の診断、治療若しくは予防に使用されること、又は人若しくは動物の身体の構造若しくは機能に影響を及ぼすことが目的とされている機械器具等であって、政令で定めるものをいう」とされている。医療機器の製造販売をしようとする者は、品目ごとに厚生労働大臣の承認(一般医療機器、指定管理医療機器を除く)を受けなければならない(薬事法第14条第1項)。また、薬事法第14条第1項の承認を受けようとする者は、厚生労働大臣の定める基準に従って収集且つ作成された臨床試験の試験成績に関する資料及びその他の資料を申請書に添付しなければならない(薬事法第14条第3項)。医療機器の承認は、薬事法第14条第2項(承認拒否事由)に該当しないとき、換言すれば申請に係る「効能、効果又は性能」が認められ、その「効能、効果又は性能」に比べて「著しく有害な作用」を有していないときに与えられる。すなわち、医療機器の承認審査では、リスク・ベネフィットのバランスを勘案して有効性及び安全性を評価すると共に、使用目的または効能・効果、操作方法または使用方法、使用上の注意が妥当であることを判断する。医療機器は不具合発生時の人体に対するリスクの程度により、クラスⅠ(一般医療機器)、クラスⅡ(管理医療機器)、クラスⅢ及びⅣ(高度管理医療機器)に分類されている。基本的にクラスⅢ以上の医療機器の薬事審査はPMDAが担当し、大臣承認を受ける。クラスⅡ及び一部のクラスⅢ医療機器の審査は第三者認証機関によって行われる。不具合が生じた場合でも人体へのリスクが極めて低いと考えられるクラスⅠ医療機器の製造販売は届出制である。

医療機器には多彩な製品があり、技術革新周期も早く、その改良は市販後も続くため医薬品と異なり画一的な評価は困難である。審査は事例毎に承認と不承認を判断することが基本であり、適切な判断のもと、回り道をせずに早く行うことが理想的である。

### 2.2 非臨床試験

審査における非臨床試験のデータパッケージとして、仕様の設定に関する資料が要求される。具体的には、安定性及び耐久性に関する資料、薬事法第41条第3項に規定する基準(厚生労働省告示第122号/医療機器基準)への適合性に関する資料、安全性(物理・化学的特性、電気的安全性及び電磁両立性、生物学的安全性、放射線に関する安全性、機械的安全性、無菌性)、性能、効能、使用方法を裏付ける資料等が求められる。安全性については、一般的要求事項としてJIS T 0601-1(電気的安全性及び電磁両立性)、JIS T 0993-1(生物学的安全性)、JIS B 9700-1(機械的安全性)、「薬事法及び採血及び供血あっせん業取締法の一部を改正する法律

の施行に伴う医薬品、医療機器等の製造管理及び品質管理(GMP/QMS)に係る省令及び告示の制定及び改廃について：第4章第4 滅菌バリデーション基準(薬食監麻発第0330001号：平成17年3月30日)」「(無菌性)等の他、JIS Q 13485(品質マネジメント)及びJIS T 14971(リスクマネジメント)に適合することが求められる。その他、各医療機器固有の安全性を担保するための資料が必要であると共に、薬事法改正後、プログラムまたはプログラムを有する医療機器については単体及び装置組み込み型の別を問わず、IEC 62304やIEC 82304-1等のプログラムに関する規格に適合することが求められる。性能に関する評価項目は個々の製品により異なる。例えば、コンピュータ支援手術装置の場合は可動部分(可動原理、制御方法、動作精度、精度の妥当性、動作距離・速度・出力、空間的配置)、医療処置部分(原理、制御方法、動作精度・妥当性、処置範囲、レーザー等出力、外乱要因対応策)、レジストレーション機能(空間情報の把握方法・妥当性、空間的精度、時間的精度、再現性、バリデーション方法)、安全機構(アラーム、緊急停止対策、緊急停止条件、誤作動予防対策等)等が挙げられる。動物試験を行う必要性が認められた場合は、動物の種類とヒトへの外挿性や動物の手術方法と臨床における手術方法との相関性を考察すると共に、取得する計測データ(生理学的、機械的及び電気データ等)、例数の設定とその妥当性等を詳細に検討したプロトコルを作成する。また、評価にあたって考慮すべき点としては、処置の達成状況、システムの性能に係る設計仕様の満足度、治療状況、生体に対する有害事象の程度と頻度等が挙げられる。

医療機器及び原材料の生物学的安全性評価<sup>16)</sup>では、JIS T 14971「医療機器－リスクマネジメントの医療機器への適用」に示されたリスク分析手法に基づき、意図する使用または意図する目的及び医療機器の安全性に関する特質を明確化し、既知または予見できるハザードを特定し、各ハザードのリスクを推定する必要がある。本アプローチにおける陽性結果はハザードが検出・特定できたことを意味するものであり、それが直ちに医療機器としての不適を意味するものではない。医療機器の生物学的安全性は引き続き行われるリスク解析により評価される。個々の医療機器の生物学的安全性について評価すべき試験項目の選択は基本的にJIS T 0993-1(またはISO 10993-1)に準じて判断する。同JISに規定されている試験項目は、細胞毒性試験、感作性試験、刺激性/皮内反応試験、急性全身毒性試験、亜急性全身毒性試験、遺伝毒性試験、発熱性試験、埋植試験及び血液適合性試験である。これらの試験は実施すべき評価を網羅したものではなく、適切にリスク評価を行う際に考慮すべき項目であるが、人体との接触部位と使用期間を考慮した上で複数の試験を組み合わせる評価することが基本となる。この他、特定の医療機器については、慢性毒性、発がん性、生殖/発生毒性、生体内分解性等に関する評価を実施する必要がある。急性全身毒性、亜急性全身毒性または慢性全身毒性試験において、埋植試験あるいは使用模擬試験が各毒性試験で必要とされる観察項目及び生化学データ等を含んで

いる場合は、これらの毒性試験に代えることができる。埋植医療機器のリスク評価では全身的影響及び局所的影響を考慮しなくてはならない。接触部位が健常皮膚である医療機器や生物学的ハザードが特定されている医療機器の場合は既存製品との同等性評価や文献等による評価により試験を代替することも可能である。直接または間接的を問わず、生体と接触しない医療機器は生物学的安全性を評価する必要がない。

非臨床試験において検出されたハザードからリスクを推定し、リスク・ベネフィット評価を行うことにより臨床試験に移行する妥当性を判断する。非臨床試験から得られた情報により、臨床試験において示すべき内容が決まる場合があると共に、非臨床試験でハザードが十分に検出され、リスクが推定されれば、臨床試験において観察すべき項目が決まるため、非臨床試験は臨床試験のデザインを考える上で重要な位置を占める。また、非臨床試験は有効性及び不具合・有害事象を考察する土台となるため、臨床試験結果を解析する際にも有用である。非臨床及び臨床試験結果で確認が不十分な部分を明確化し、市販後臨床試験のデザインに反映させることも可能である。

### 2.3 臨床試験(治験)

治験の可否は、平成20年8月4日付け薬食機発第0804001号厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知「医療機器に関する臨床試験データの必要な範囲等について」<sup>17)</sup>に基づいて判断する。すなわち、医療機器の臨床的な有効性及び安全性が性能試験、動物試験等の非臨床試験成績または既存の文献等のみによっては評価できない場合に臨床試験(治験)の実施が必要となり、臨床試験成績に関する資料の提出が求められる。また、その使用目的、手術手技、性能、構造等が既存の医療機器と明らかに異なる場合については、原則として臨床試験の試験成績に関する資料の提出が必要である。

医薬品と異なり、医療機器の臨床試験は画一的な手法では実施できない。臨床試験を実施する場合の症例数は、その目的や主要評価項目等を踏まえ、科学的根拠に基づき、当該医療機器の有効性、安全性の評価に適切な症例数とする。希少疾病用医療機器等、適応疾患の症例自体が少ない場合は当該事情を勘案して妥当な治験計画を立案し、評価可能且つ実施可能な症例数を設定する。既存製品との比較等、比較対照をおく場合にあっては統計学的に症例数を設定する必要があることに留意する。また、信頼できる海外データを承認申請の添付資料として使用できることがあるが、それのみで臨床評価を行うことができるかどうかについては十分に検討する必要がある。

臨床試験計画の立案にあたっては、目的を勘案し、First-in-Human、探索的治験、検証的治験、既存治療との比較、全く新しい治療法の検証等を考慮した上で、方法、対照群、盲検性、対象

患者の選択、主要評価項目、副次評価項目、目標症例数(設定根拠を含む)、観察期間等について検討することが基本となる。通常、既存の医療機器に比較して有効性及び安全性が同等以上であることの評価が必要であり、既存製品と同様に目的とする治療が実施できることはもちろんのこと、既存製品に比して、非劣性であることを具体的な項目を挙げて示す必要がある。

#### 2.4 保険収載<sup>18)</sup>

自社が開発した医療機器が保険収載されるか否かは、企業が事業を展開する上で重要な案件となる。医療機器の承認審査はPMDA、認証審査は第三者認証機関が実施するが、医療機器の保険償還は厚生労働省医政局経済課が担当している。保険償還に係る医療機器の評価区分はA1(包括)、A2(特定包括)、B(個別評価：特定保険医療材料)、C1(新機能)、C2(新機能・新技術)及びF(保険適用に馴染まないもの)に分類される。A1は、いずれかの診療報酬項目において包括的に評価されているもの(例：縫合糸、静脈採血用注射針等)であり、A2は特定の診療報酬項目において包括的に評価されているものであり、眼内レンズと水晶体再建術、超音波検査装置と超音波検査等が該当する。Bは材料価格が機能別分類に従って設定され、技術料とは別に評価されているものであり、例としてPTCAカテーテル、冠動脈ステント、ペースメーカ等が挙げられる。C1は新たな機能区分が必要で、それを用いる技術は既に評価されているものである(例：特殊加工を施した人工関節等)。C2は新たな機能区分が必要で、それを用いる技術が評価されていないものであり、カプセル内視鏡等が該当する。

医療機器・材料価格は承認または認証済み医療機器に係る保険適用希望書を提出し、A1、A2及びB区分については中医協に報告後、C1及びC2については保険医療材料専門組織の審議を経て中医協の了承を得た後に算定される。保険収載にあたり、高い安全性及び有効性を有する医療機器には保険点数が加算される。①臨床上有用な新規の機序を有し、②類似機能区分に属する既収載品に比較して高い有効性または安全性を有することが客観的に示されていると共に、③当該新規収載品により対象となる疾病または負傷の治療方法の改善が客観的に示されている医療機器については画期性加算(50-100%)が適用される。画期性加算条件3項目中、いずれか一つを満たす場合は有用性加算(5-30%)が適用される。その他、加算要件の見直しにより、イノベーションを評価する改良加算(3-10%)も存在する。改良加算は既収載品と比較して、職業感染リスクの低減、廃棄後の環境リスクの低減、低侵襲治療の提供と合併症発生頻度の低減、小型化・軽量化、使用方法の簡易化、耐久性の向上、在宅療養の質的向上が客観的に示されている医療機器に適用されるものであり、画期性加算及び有用性加算の対象となる製品は除外される。

### 3. 医療機器開発における留意点

医療機器を円滑に製品化・臨床導入するためには、開発初期あるいは設計の段階から、薬事申請、上市及び市販後安全対策について検討すべきである。製造所として必要な製造販売業等の業の取得、製造に対するQMS、製品開発や薬事申請に必要な安全性や性能に関する非臨床及び臨床試験の内容、治験の要否等を可能な限り早期に検討することにより、効率的に目標が達成できる。

#### 3.1 材料選択

医療機器の開発にあたっては、材料選択の段階から安全性を視野に入れて研究を進めるべきである。医療機器を構成する代表的な材料としては、金属、合成高分子、セラミック、生体由来を含む天然由来材料等が挙げられるが、金属材料については金属アレルギー、天然由来材料では微生物汚染の問題等を常に考慮する必要がある。合成高分子材料の生物学的安全性は同材料から溶出する化学物質の毒性により大きな影響を受けるため、直接または間接的接触を問わず、生体に適用する医療機器を開発する場合は可能な限り無毒性の原材料を使用することが望ましい。医療機器に要求される特性を充足するため、毒性を発現する可能性のある化学物質(触媒、色素、架橋剤、生理活性物質等)を使用する必要がある場合は、該当する化学物質を除去または固定化する等のステップを製造工程に組み込むことが理想的である。残存した毒性物質が溶出する可能性がある場合は、実臨床を模した条件下において溶出実験を行い、当該物質の暴露量と毒性強度に基づいたリスク解析を実施することにより、最終製品の生物学的安全性を担保する必要がある。

医用材料の生体適合性は、上記のとおり種々の溶出物や残留物質等の毒性や微生物汚染に由来する感染因子の他、材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。これは、医用材料が細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面(バイオインターフェース)で起こる分子間相互作用を介して機能を発揮することに由来する。医用材料を生体内に埋植すると、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体蛋白質の吸着が起こる。細胞は材料表面上で構造変化した吸着蛋白質を介して材料に接着することにより、最終的な生体反応を誘導する。すなわち、医用材料と細胞は吸着蛋白質層を介して相互作用するため、同蛋白質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。血液適合性材料として、超親水性表面、マイクロ相分離表面、細胞膜類似表面及び生理活性分子固定化表面等が開発され、その有効性が報告されてきたが、近年、材料表面の水和状態が血液適合性(抗血栓性)の要因である蛋白質吸着能や細胞接着能に深く関与することが明らかになりつつある。材料表面における水

分子は存在様式により、超低温でも凍結しない不凍水、 $-50^{\circ}\text{C}$ 付近で低温結晶を形成する中間水及び $0^{\circ}\text{C}$ で凍結する自由水に大別される。不凍水と自由水は多くの材料に共通して存在する水分子であるが、血液適合性の高い材料は不凍水と自由水の他、中間水を持つことが確認されている<sup>19,20)</sup>。中間水の存在の有無や材料表面への蛋白質吸着挙動から材料の生体適合性や機能を予測できる可能性が非常に高く、これらのパラメータは材料選択のよい指標となり得る。

自社開発品を除き、通常、医療機器を構成するまたは医療機器に含有される原材料は原材料製造会社から購入する。医療用グレードの原材料を供給しているメーカーも存在するが、一般用と医療用を区別していないメーカーもある。いずれの場合においても、原材料は医療機器の安全性と有効性を確保する観点から、生体への接触部位と使用時間、性能への影響の程度、原材料の性状・特徴を考慮して適切に特定することが求められる<sup>21)</sup>。間接的または直接的を問わず、血液・体液・粘膜等に接触せず、医療機器の性能自体に大きな影響を及ぼさない原材料については一般名または通称等の簡素な記載で構わない。埋植または30日を超えて長期的に血液・体液・粘膜等と接触することが想定される部位に使用される原材料の他、コンタクトレンズや眼内レンズ等のように原材料の成分・分量の些細な相違が最終製品の有効性に影響する原材料の場合については、原則として実際に製造に供される原材料を適切に特定する必要がある。これら以外の一時的接触または短・中期的接触の原材料については、最終製品の品質、安全性、有効性を確保するために必要な範囲で特定する。原材料の特定は、原則、実際の製造現場において識別し、原材料製造会社から提供される情報を利用して行う。一般名または通称もしくは細分化された名称で特定する場合以外では、原材料の化学的・物理的情報、製造業者名と製品名または製造番号、CAS等の公的規格が存在する場合はその規格番号により規定する方法がある。原材料製造会社からの情報は非常に重要であり、成分・組成を含めて可能な限り多くの情報開示を得ることが肝要である。

### 3.2 薬事法に準拠した開発

クラスII以上の医療機器を上市化する場合は薬事法に基づいた承認・認証審査を受ける必要がある。当然、その審査も薬事法に準拠して行われるため、医療機器の開発も初期段階から薬事法を理解した上で進めることが重要である。安全性を無視または軽視し、有効性確保に偏った開発は研究の域を出ないことが多い。品質・性能、安全性及び有効性を評価するための規格・基準や試験法も薬事申請を視野に入れて選択する必要がある。特に試験法の設定は重要であり、研究レベルでは妥当と思われる方法により良好な成績が得られていたとしても、薬事申請を行うにあたり多くのデータを取り直す必要がある場合は、時間及び経費の浪費に直結すると共に、再取得したデータによってはリスク・ベネフィットバランスが崩れる可能性を含んで

いるため、連携企業が見つからないケースが多い。また、新しい医療機器の場合、該当する規格・基準はもちろん、試験法も存在しないことがあるが、このような場合は開発者自らが試験法を考案する必要がある。

医療機器の開発から上市化に至る一連の過程には、医療現場のニーズと確実なシーズ、開発のための多大な時間と経費の他、薬事に関する豊富な知識と経験が要求される。ニーズが高く有益と思われるシーズであっても、医師または研究者が単独で開発を進め、上市化に結び付けることは不可能に近い。この一連の過程においては、医工連携はもちろんのこと、その他にも品質マネジメントや申請方法を熟知した薬事専門家、試験法開発等に精通するレギュラトリーサイエンティスト、市場展開するための企業等、各領域を得意とするさまざまな人材の協力を得ることが重要である。開発者個人が薬事やレギュラトリーサイエンスの専門家を確保できない場合は、設計へのインプット、設計プロセス、設計のアウトプットの各段階においてPMDAの戦略相談窓口を利用することが目標達成への近道となる。その他、製品の開発から実用化までを総合的にサポートする橋渡し研究を業として提供する公益財団法人等に協力を求めることも有益な選択肢の一つである。なお、企業が興味を示さない新規医療機器の開発には、設計コンセプト、医療機器としてのリスク・ベネフィットバランス、開発に要する時間及びコストのパフォーマンス、市販後の収益性やPL法等のいずれかに問題点が必ず存在するため、考えられる全ての要因について考察する必要がある。

医療機器を上市化するにあたり、薬事法を避けて通ることは不可能である。換言すれば、薬事法を理解し、同法に従った開発を展開しない限り、新たな製品を市場に出すことはできない。薬事申請に必要な情報は全て開示されている。医療機器開発を真剣に目指すのであれば、努力を惜しまず邁進する気構えが必須となる。

#### 4. 市場拡大に関する国際標準化の重要性<sup>22)</sup>

近年、世界中で経済のグローバル化が急速に進み、経済活動を妨げる国境の壁が低くなり市場が世界単一化していく中で、製品の性能が優秀でも国際標準から乖離した仕様では市場に受け入れられなくなっている。これは世界貿易機構(WTO)が、貿易障害協定(TBT協定)で加盟国に対して非関税障壁を排除する目的で国際規格に準拠した製品づくりを要求していることから見ても明らかである。この観点より、グローバル化した世界市場においては「規格を制するものが市場を制する」といっても過言ではない。しかし、日本企業の国際標準化に関する認識は高いとはいえない。この原因は、従来の日本のものづくりの基本方針である「良いものを適正な価格で市場に送り出し、市場を制する」ことで製品を標準化するというデファクト



標準重視の姿勢が世界の動向に合わなくなってきた状況を企業経営陣が理解していない点にある。米国でも従来のデファクト標準重視の方針からデジュール標準重視に大きく舵を切っている。欧州諸国は古くから国際標準化を重視しており、近年では中国、韓国、ブラジル等の国々も ISO/IEC に積極的に参画している。

標準化は製品の差別化を困難にし、コスト競争に陥る危険性を持っている。したがって、標準化で市場を拡大しながら収益を確保するためには、事業戦略を明確にした上で、作りたい標準を自ら提案し、不都合な標準の作成は阻止するという積極的な取り組みが必要である。また、標準化とは、製品仕様の決定にあたって、何を競争領域とし、何処を協調領域とするかの線引きであるともいえる。このため、グローバル市場においては線引きでイニシアティブを取ったものが市場競争で優位に立つ可能性がある。しかし、線引きを誤れば、技術を固定化してその後の技術開発の妨げになり、更には市場に受け入れられない標準になる。標準化とビジネスは密接に結び付いており、競争領域においてはいかにして市場競争を勝ち抜くかという開発戦略と直結している。また、開発戦略の立案にあたっては、技術開発と商品開発のどちらを優先するかを市場のフェーズ(揺籃期、成長時、成熟期)や市場ニーズの観点から見極める必要があり、事業戦略、開発戦略及び標準化戦略は一体となって進めるべきものである。

我が国の優れた製品を世界的に流通させるためには、日本の国内法規における要求事項を反映した国際規格を作成し、運用することが最適といえる。また、日本は医療機器開発において先進的な技術力を持つことから、国際的な優位性を確立することが可能な状況にある。例えば、製品や材料の性能評価等に関する技術については、差別化による高付加価値化を狙い、新たな市場を開拓していくことが重要である。このため、研究開発段階から標準化を視野に入れたプロジェクトを推進すると共に、国際標準策定に必要なデータ取得、ラウンドロビンテスト等を産業界と一体となり推進することが必要である。

品質マネジメントにおける製品実現の設計開発では、設計へのインプット、設計プロセス、設計のアウトプットが重要な点である。通常、設計・開発者は当該機器に要求される基準・規格を選択して設計するが、それは国際標準を含み State-of-the-Art(最新の技術)のものでなければならない。しかし、新しい機器の設計開発においては、設計・開発者が最新の基準・規格を把握していないケースが見受けられる。また、State-of-the-Artの基準・規格自体が存在しないことも多いが、この場合、設計・開発者が自らこれを作り出さなければならない。これが特許となり、将来、国際標準として公開するかまたは公開せずにブラックボックスとするかの判断が企業戦略となる。次に国内規格・基準の現状及び標準化戦略と知財戦略の相関性について概説する。

#### 4.1 国内規格・基準

医療分野の国際規格は、ISO/846件、IEC/191件、合計1037件である。一方、医療分野の日本工業規格(JIS)は459件であり、国際規格に対応しているものは276件である。JISは国際規格をベースに作成されているものが30%弱であり、決して国際性が高いといえないのが現状である。また、これらのJISのうち、約半数が薬事法、計量法等で使われていることが特徴である。

一般的に、JIS規格の作成は関連業界が担当しているが、国際規格が発行されてから当該翻訳JISが発行されるまでには大変長い時間を要しており、電子情報技術産業協会(JEITA)のデータによると5年から10年の遅れが見受けられる。このようにJIS化における課題としては、国際規格がJIS化されていないことや、JIS化に時間を要し、タイムリーではないこと等が挙げられる。これらの問題は明らかに日本企業の国際競争力を失わせることになり、輸出拡大の大きなブレーキになると思われる。

医療イノベーション5か年戦略によると医療機器に関する国際標準化の推進等に関して次のように言及している。

- (1) 日本発の医療材料や診断・治療装置の規格化及び評価方法等の標準化に加え、それらに用いる主要部材に関する信頼性や耐久性等の基準設定を国が主導して一体的に進める等、戦略的に国際標準化を進める。
- (2) 今後、世界的な成長が期待され、我が国が優れた技術を有する分野(特定戦略分野)の一つとして先端医療機器を対象に、国際競争力強化のため国際標準の獲得を推進する。
- (3) 国内のQMS基準(医療機器及び体外診断用医薬品の製造管理及び品質管理の基準)とISO 13485との一層の整合性を図るとともに、製品群毎の調査方法の導入等、QMS調査の効率化と質の向上を図る。

また、審査基準の明確化の項では、「(2)世界に通用する革新的医薬品・医療機器の開発に資するよう、レギュラトリーサイエンス研究の成果を活用し、国際的に整合性のとれた革新的医薬品・医療機器の審査のガイドラインを整備する。また、審査の国際的ハーモナイゼーションを推進すると共に、日米欧等の審査当局が審査や相談、GCP実地調査等に関する協議に向けた意見交換を引き続き実施する。特に医療機器について、日米欧等の審査当局間におけるHBD(Harmonization by doing)等を通じて、日米欧等との同時開発を推進する」とされている。さらに医療機器の特性を踏まえた規制のあり方の検討の項における②第三者認証機関が行う認証基準については、「最新の国際的な基準とも整合性が図られるよう、JIS規格だけでなく、国

際的な基準を採用し、認証制度の合理化を進める」としている。これらの考えに基づき国際標準化を進め、国際規格を積極的に使っていく必要がある。

#### 4.2 標準化戦略と知財戦略

1995年にWTO/TBT協定が成立し、任意規格/強制規格ともに国内規格を国際規格に適合することが求められるようになった。さらに1996年にWTO政府調達協定が成立して、政府調達は国際規格に適合することが義務化されたことにより、国際標準化の重要性は益々高まっている。

標準化戦略と知財戦略は企業における有力な事業戦略であるにも関わらず、各々独立した手段であると考えられてきた。標準化は技術を普及させる手段としてとらえられる一方、知的財産権の活用は技術の独占によって自社の競争力を高める手段としてとらえられており、外見上、両者は目的を異にするものであるからである。

しかしながら、近年、特許技術が標準に必須の要素として含まれる例が増えてきた。また、欧米を中心として、標準の必須特許1(規格特許)に関する数々の知財係争が起こったことから、標準と特許はもはや独立した手段ではなく、両者を組み合わせた戦略が有力なビジネスツールになると考えられるようになってきた。標準化戦略と知財マネジメントを連携し、知財戦略・標準化戦略と研究開発戦略・事業戦略を一体として考えることは、企業利益を獲得するための一手段として重要となっている。

標準化に関する政策を考えるためには、企業が所持する知的財産をどのように取り扱うかに関する意思決定問題を考える必要がある。企業が知的財産を取り扱う場合、基本的には知的財産を①公開するか、②権利化するか、③秘匿するかという三つの選択肢が存在する。これらの選択肢にはそれぞれ固有のメリットとデメリットが存在するため、標準化を踏まえた上で知的財産マネジメント戦略を企画・立案することが重要である。

#### おわりに

近年、我が国において、次世代型補助人工心臓や細胞シート工学製品等、世界をリードする製品が開発されたが、日本発の新規医療機器を世界に先駆けて上市化することを目指した「革新的医薬品・医療機器創出のための5か年戦略」の施策中であつたにも拘わらず、両製品の治験は海外に流出した。現在も医療イノベーション5か年戦略をはじめとしたさまざまな施策により日本発の革新的医療機器の開発が推進されているが、上市化に成功した事例は決して多くなく、依然として海外製品が国内市場の大部分を占めているのが現状である。その要因を解析

し、アカデミア及び関連企業における医療機器開発を促進するための現実的な方策を真剣に考える時期が到来していると思われる。

我が国の医療機器産業を活性化するために必要な因子は幾つか存在するが、中でも薬事法改正、医工連携、橋渡し研究及び国際標準化が大きなカギになると考えられる。薬事法は医療機器の特性を踏まえた制度に改正されるが、改正薬事法を活かすためには政令、省令、通知の整備等を通じて、一層の医療機器審査の充実と合理化を図っていく必要がある。また、新規医療機器の安全性と有効性を評価するためには市販後調査が極めて重要であり、その結果を含めて検討する必要性が求められる場合があることから、市販後臨床試験の導入を積極的に推進することを要望するアカデミアや企業は少なくない。医工連携の重要性は少なくとも40年前に提唱された。現在ではさまざまな大学や研究機関が医工連携拠点を構築し、医療機器開発を加速させている。橋渡し研究については、その重要性が提唱されてから早10年程度が経過し、近年、ようやく本格的に始動できる体制が整ってきている。

日本発または日本の主張を国際規格に取り入れていくことは、中・長期的にも「ものづくり国家・日本」の重要な課題である。我が国の医療機器分野における国際標準化活動を活性化させるために必要な因子は多岐にわたる。実質的な国際活動は関係工業会等に依存しているケースが多く、専門性を持つ企業が加盟する工業会等に依頼されることは当然であるが、国としてそれを総括し、積極的に支援する体制を構築することが求められている。しかし、国際規格策定業務に携わる人材(エキスパート)を抱える企業経営陣に国際標準化活動の理解がなければ、満足できる結論を得ることは不可能である。国際規格策定業務には多くの時間と費用がかかるが、エキスパートの評価が適切に行われないう場合、モチベーションの向上につながらず、意欲的な活動を期待できない。我が国において国際標準化活動に携わるエキスパートの1企業あたりの人数は韓国や中国を含む諸外国と比較して極端に少ないのが現状であるが、人材の確保と育成に係る問題も企業経営陣の考え次第で改善できる。デファクト標準からデジュール標準への移行は世界的な流れであるため、医療機器産業界、特に企業経営陣に向けて国際標準化の重要性を啓蒙することは、国としての緊急の課題である。

#### 参 考 文 献

- 1) 日本分析機器工業会 HP [http://www.jasis.jp/2013/pdf/result/130905\\_04\\_kakudo.pdf](http://www.jasis.jp/2013/pdf/result/130905_04_kakudo.pdf) (2013.11).
- 2) 日本貿易振興機構 HP [http://www.jetro.go.jp/jfile/report/07000902/us\\_medical\\_enhancement.pdf](http://www.jetro.go.jp/jfile/report/07000902/us_medical_enhancement.pdf) (2013.11).
- 3) 首相官邸 HP <http://www.kantei.go.jp/jp/singi/iryoku/5senryaku/> (2013.11).
- 4) 経済産業省 HP <http://www.meti.go.jp/information/publicoffer/kobo/k130329001.html> (2013.11).

- 5) 厚生労働省 HP <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000000ax9a.html#shingi128705> (2013.11).
- 6) 厚生労働省 HP <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000020uxm-att/2r98520000020uz3.pdf> (2013.11).
- 7) 内閣府 HP <http://www8.cao.go.jp/cstp/project/tokku/> (2013.11).
- 8) 橋渡し研究加速ネットワークプログラム HP <http://www.tr.mext.go.jp> (2013.11).
- 9) 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部 HP <http://dmd.nihs.go.jp/jisedai/index.html> (2013.11).
- 10) 経済産業省 HP [http://www.meti.go.jp/policy/mono\\_info\\_service/service/iryuu\\_fukushi/](http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryuu_fukushi/) (2013.11).
- 11) 厚生労働省 HP [http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/iyakuhin/kakushin/index.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iyakuhin/kakushin/index.html) (2013.11).
- 12) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/consult/yakujiisenryaku/file/yakujiisenryaku-youkou.pdf> (2013.11).
- 13) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/guide/kagakuiinkai/iyaku/h240924gijishidai/file/shiryoo9-3.pdf> (2013.11).
- 14) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/iryokiki/file/iryokiki.pdf> (2013.11).
- 15) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/iryokiki/iryokiki-list.html> (2013.11).
- 16) 医薬品医療機器総合機構 HP [http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/saisei-iryuu/pdf/H240301\\_030120.pdf](http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/saisei-iryuu/pdf/H240301_030120.pdf) (2013.11).
- 17) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/notice/2008/file/0804001.pdf> (2013.11).
- 18) 厚生労働省 HP <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/hoken/iryokiki/> (2013.11).
- 19) 科学技術振興機構 HP <http://jstshingi.jp/abst/p/10/1005/yamagata1.pdf> (2013.11).
- 20) 名古屋大学エコトピア科学研究所 HP [http://www.esi.nagoya-u.ac.jp/shinpo/poster\\_20120718.pdf](http://www.esi.nagoya-u.ac.jp/shinpo/poster_20120718.pdf) (2013.11).
- 21) 医薬品医療機器総合機構 HP <http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/iryokiki/file/iryokiki-material.pdf> (2013.11).
- 22) 厚生労働科学研究成果データベース HP <http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIDD02.do?resrchNum=201203003A> (2013.11).
- 23) (一社)日本分析機器工業会 HP, JASIS2013メディカルイノベーションゾーンテーマ講演要旨(講演者 経済産業省 商務情報政策局 覺道 崇文医療・福祉機器産業室長).

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する資料⑦

J. Vinyl Add. Technol., in press

# Characterization of Alternative Plasticizers in Poly(vinyl chloride) Sheets for Blood Containers

AQ8 **Yuji Haishima,<sup>1</sup> Tsuyoshi Kawakami,<sup>2</sup> Chie Fukui,<sup>1</sup> Akito Tanoue,<sup>3</sup> Toshiyasu Yuba,<sup>4</sup> Satoru Ozono,<sup>1</sup> Hidehumi Kumada,<sup>5</sup> Kaoru Inoue,<sup>6</sup> Tomomi Morikawa,<sup>6</sup> Miwa Takahashi,<sup>6</sup> Ayano Fujisawa,<sup>7</sup> Kayo Yamasaki,<sup>8</sup> Yusuke Nomura,<sup>1</sup> Kazuo Isama,<sup>2</sup> Ung-il Chung,<sup>7</sup> Kumiko Ogawa,<sup>6</sup> Shingo Niimi,<sup>1</sup> Midori Yoshida<sup>6</sup>**

AQ1 <sup>1</sup>*Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

<sup>2</sup>*Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501, Japan*

<sup>3</sup>*Department of Pharmacology, National Center for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan*

<sup>4</sup>*Corporate Research and Development Division, Kawasumi Laboratories, Inc., Shinagawa Intercity Tower B, 9th Floor 2-15-2, Konan, Minato-ku, Tokyo 108-6109, Japan*

<sup>5</sup>*Department of Dental Education, Kanagawa Dental University, 82 Inaoka-cho, Yokosuka, Kanagawa 238-8580, Japan*

<sup>6</sup>*Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan*

<sup>7</sup>*Department of Bioengineering, The University of Tokyo Graduate Schools of Engineering and Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan*

<sup>8</sup>*Research Department, Public Welfare Institute of Scientific Research Foundation, 3-8-14 Nukuikitamachi, Koganei, Tokyo 184-0015, Japan*

This study aimed to optimize the ratio of dioctyl 4-cyclohexene-1,2-dicarboxylate (DOTH) and di-isononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH<sup>®</sup>) for use as plasticizers in poly(vinyl chloride) (PVC) sheets. We also evaluated the biological safety of DOTH for its potential to be part of a safe PVC-based blood container. The suppression of hemolysis in (mannitol-adenine-phosphate)/(red cell concentrates) with DOTH/(DINCH<sup>®</sup>-PVC) sheets and the elution of plasticizers from the sheets increased with higher DOTH compositions. The properties of the PVC sheet containing DOTH and DINCH<sup>®</sup> in the ratio of 25:33 parts against PVC 100 parts as a weight were almost identical to the PVC sheet made of di(2-ethylhexyl) phthalate. From a

subchronic toxicity test, DOTH did not show any adverse effects on all organs, including the testes, epididymis, liver, and kidneys. The no-observed-adverse-effect level was 300 mg/(kg body weight)/day in a rat. These results suggest that DOTH/DINCH<sup>®</sup> (25:33) is a promising candidate for the replacement of di(2-ethylhexyl) phthalate in blood containers. *J. VINYL ADDIT. TECHNOL.*, 00:000-000, 2015. © 2015 Society of Plastics Engineers

## INTRODUCTION

Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), a typical plasticizer for increasing the flexibility of poly(vinyl chloride) (PVC), is easily eluted from PVC products into food, pharmaceuticals, and any body fluids that come into contact with the plastic, thereby resulting in the transfer of DEHP directly and/or indirectly into the human body [1, 2]. Some phthalates, including DEHP, are considered toxic because they exhibit effects in young rodents that are similar to the antiandrogenic effects of endocrine

Correspondence to: Yuji Haishima; e-mail: haishima@nihs.go.jp

This study was supported by the Health and Labor Sciences Research Grants (H25-CHIKYUKIBO-SHITEI-008 and H26-SOUYAKU-IPPAN-008) from the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare.

DOI 10.1002/vnl.21472

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

© 2015 Society of Plastics Engineers

disruptors in male rats, wherein alterations in the development of the male reproductive system, especially in spermatogenesis, are observed [3–5]. Although the *in vivo* reproductive and developmental toxicity of DEHP in the human body are not yet well understood, recent *in vitro* toxicological studies using human cells have reported that mono(2-ethylhexyl) phthalate, an active metabolite of DEHP [6–9], causes adverse effects, such as the reduction of germ cells by increasing apoptosis without altering their proliferation [10–12]. Therefore, precautions should be taken to limit human exposure to DEHP and mono(2-ethylhexyl) phthalate, particularly for high-risk patients, such as male neonates, male fetuses, and peripubertal male individuals.

Several agencies and official organizations worldwide have individually evaluated the safety of DEHP released from PVC products. Recently, regulation of the use of DEHP has been tightened worldwide, particularly in Europe, not only for toys, childcare products, food apparatus, containers, and packages but also for medical devices. In many countries, including the USA, Canada, and Japan, the use of alternative plasticizers to develop safer PVC products and a switch to other plastic products has been recommended for the medical treatment of high-risk patients. However, the use of PVC blood bags containing DEHP has been permitted in Japan without any regulation other than storage at low temperatures because DEHP has been found to be effective in preserving stored red blood cells (RBCs) [13].

We recently reported [14] that the presence of two carboxy-ester groups at the *ortho* position on a six-membered ring of carbon atoms may be needed for the plasticizer to exhibit a hemolysis suppression effect on (mannitol-adenine-phosphate)/(red cell concentrates) (MAP/RCC), and the degree of prevention closely relates to the amount of plasticizer eluted from heat-pressed PVC sheet. Based on these results, we concluded that dioctyl 4-cyclohexene-1,2-dicarboxylate (DOTH) and diisononyl-cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH<sup>®</sup>, BASF SE, Germany) are possible candidates to replace DEHP in RBC storage bags because of their ability to inhibit hemolysis. The amount of DOTH eluted from the PVC sheet is relatively higher than that of DEHP [14], but the total exposure of plasticizer to the patient during medical treatments should be reduced as much as possible. There is a possibility that the amount of plasticizers eluted from heat-pressed PVC sheets may be different from that of T-die molded PVC sheets used to manufacture commercial PVC products, because PVC molecules take on a different orientation and density in the sheet types. In the present study, to develop a novel and safer blood container, we optimized the minimum mixing ratio of DOTH to T-die molded PVC sheet and the precise dose of DINCH<sup>®</sup> that maintains low leachability [14–16] compared with DEHP.

The plasticizer for the blood container must be safe for humans. Recently, Hirata-Koizumi et al. reviewed the toxicity of alternative plasticizers and showed that DINCH<sup>®</sup> had minimal toxicity [17]. On the other hand,

DOTH's overall toxicity is not well known. Hence, we also evaluated the biological safety of DOTH using a sub-chronic toxicity test in a rat to confirm the Japanese reports [18–20] on several toxicity tests conducted by BOZO Research Center Co., Ltd. (Shizuoka, Japan) commissioned by the Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

DOTH, trioctyl trimellitate (TOTM), and epoxidized soybean oil were purchased from Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan). DINCH<sup>®</sup> was provided by BASF (Ludwigshafen, Germany). DEHP, DEHP-*d*<sub>4</sub>, diethyl ether of pesticide residue, PCB analysis grade, and phthalate-analytical-grade hexane were purchased from Kanto Chemical Co. (Tokyo, Japan). Sodium chloride from pesticide residue, PCB analysis grade, phthalate-analytical-grade anhydrous sodium sulfate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan), and ultrapure water obtained by using Milli-Q Synthesis A10 (Millipore, Tokyo, Japan) were used to prepare the sample for (gas chromatography)/(tandem mass spectroscopy) [(GC-MS)/MS] analysis. Other chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries. All the tools, which were made of glass, metal, or Teflon<sup>®</sup>, were heated at 250°C for more than 16 h prior to use.

### Preparation of RCCs

Human blood (200 mL) was obtained from a volunteer at our own laboratory. The procedure was performed in accordance with the ethical guidelines of the National Institute of Health Sciences (approval number 188). The blood was immediately mixed at 4°C with citrate-phosphate-dextrose solution (28 mL) consisting of sodium citrate hydrate (26.3 g/L), citric acid hydrate (3.27 g/L), glucose (23.2 g/L), and sodium dihydrogen phosphate (2.51 g/L). The blood was divided into two equal volumes followed by centrifugation at 3,000g for 10 min at 4°C and the removal of the upper layer. MAP solution (23 mL), consisting of D-mannitol (14.57 g/L), adenine (0.14 g/L), sodium dihydrogen phosphate (0.94 g/L), sodium citrate hydrate (1.5 g/L), citric acid hydrate (0.2 g/L), glucose (7.21 g/L), and sodium chloride (4.97 g/L), or saline-adenine-glucose-mannitol (SAGM) solution (23 mL), consisting of sodium chloride (8.77 g/L), adenine (0.17 g/L), glucose (9.0 g/L), and D-mannitol (5.25 g/L), was added to the remaining RCC layer to prepare MAP or SAGM/RCC (Htc. 59%). The solution was stored at 4°C until use.

### Preparation of PVC Sheets

T-die molded PVC sheets (thickness = 0.4 mm) containing DEHP 55 parts and epoxidized soybean oil 8 parts



against PVC 100 parts as a weight ratio and other additives were mixed according to the standard recipe of Kawasumi Laboratories, Inc. (Tokyo, Japan). T-die molded PVC sheets were also prepared with TOTM 85 parts, DOTM 55 parts, DINCH<sup>®</sup> 60.5 parts, or DOTM/DINCH<sup>®</sup> mixtures (10:49.5, 25:33, and 40:16.5 parts) instead of DEHP. Each sheet was cut into small pieces (3.2 cm × 1 cm).

#### Hemolysis Test

The hemolysis test was performed according to the method previously reported [14]. Each PVC sheet (3.2 cm × 1 cm, thickness = 0.4 mm) containing different kinds of plasticizers was placed into a screw-capped glass bottle, and 5 mL of freshly prepared MAP or SAGM/RCC was added to the bottle. During incubation at 4°C for 49 days, an aliquot (50 µL) of the blood sample was collected into Eppendorf tubes every week. Phosphate-buffered saline (PBS; 1 mL) was added to each sample and gently mixed, followed by centrifugation at 500g for 2 min at 4°C; then the absorbance of the supernatant (100 µL) was measured at 415 nm with a SH-9000 Lab microplate reader (Corona Electric Co. Ltd., Ibaraki, Japan). MAP or SAGM/RCC was also tested under the same conditions as the negative control, whereas the positive control was prepared by adding distilled water instead of PBS. This test was repeated in triplicate, and the significant difference was calculated by two-way analysis of variance (ANOVA). The hemolytic ratio was calculated in accordance with the following formula:

$$\% \text{ Hemolysis} = (A_T - A_N) / (A_P - A_N) \times 100$$

where  $A_T$  is the test sample absorbance;  $A_N$  is the average negative control mean absorbance; and  $A_P$  is the average positive control mean absorbance.

#### Elution Test for the Plasticizer

The quantity of plasticizer in each PVC sheet soaked with the blood samples was measured according to the methods previously reported [14, 21–25]. Briefly, an aliquot (50 µL) of the MAP/RCC sample for the hemolysis test was collected into a screw-capped glass tube every week, and sodium chloride (1 mL, 1 w/v%), DEHP- $d_4$  (0.1 µg), and hexane (1 mL) were added. After shaking vigorously for 15 min and centrifuging at 3,000 rpm for 10 min at room temperature, the organic phase was collected and dehydrated with anhydrous sodium sulfate. Subsequently, the sample was analyzed by (GC-MS)/MS, which included an analysis of precision based on the same conditions described in a previous report [14]. This test was repeated in triplicate, each with a hemolysis test performed simultaneously. The significant difference was calculated by two-way ANOVA.

#### Animal Treatment

A repeated-dose 90-day oral toxicity study similar to the principles of OECD 408 [3] was performed on male

rats. The procedure was performed in accordance with the animal experiment guidelines of the National Institute of Health Sciences (approval number 434).

Sprague-Dawley rats were purchased at age of 4 weeks (body weight; 90–110 g) from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). The animals were maintained under controlled light and temperature conditions. The rats also were given free access to food and water. Their food was a customized vehicle for DOTM intake; DOTM was mixed with corn oil to obtain final concentrations of 0 (control), 5, 50, 500, and 5,000 µg/g corresponding to the target dose levels of 0 and approximately 0.3, 3, 30, and 300 mg/(kg body weight)/day, and the mixture was kneaded at a concentration of 4% and shaped into CE-2 chow (CLEA Japan Inc.). The highest dietary concentration was decided according to the protocol of the repeated-dose toxicity and reproduction/development toxicity tests of DOTM conducted by BOZO Research Center [18]. After a weeklong habituation period, 40 rats were divided into five groups of eight animals with two animals housed in each cage. For the next 13 weeks, the rats were fed the basal diet containing various concentrations of DOTM. Food consumption and body weight were determined weekly.

At the termination of the study, the animals were anesthetized with an inhalation of isoflurane, exsanguinated, and euthanized by decapitation. A portion of the blood (10 mL each) was immediately collected into a BD Vacutainer<sup>™</sup> Blood Collection Tube (Japan Becton and Dickinson Co., Tokyo, Japan), and a serum sample was prepared according to the manufacturer's protocol.

During necropsy, the epididymis was weighed, cut into small pieces in PBS (4.5 mL), and fixed by adding 37% neutral-buffered formalin (0.5 mL). The nuclei of the sperm were stained with Hoechst 33258 under standard conditions, and counting was performed by using a BIO-REVO BZ-9000 fluorescence microscope (KEYENCE Co., Osaka, Japan) and software. The significant difference was calculated by two-way ANOVA.

After complete necropsy, the testes and eyes were fixed in Bouin or Davidson solution. The brain, thymus, heart, spleen, liver, adrenal glands, kidneys, epididymis, thyroid glands, trachea, gullet, thoracic aorta, mediastinal lymph node, lungs, pancreas, stomach, small intestine, mesenteric lymph node, femoral muscle, sciatic nerve, sternum, thoracic vertebrae, seminal vesicle, colon, rectum, skull with pituitary, trigeminal nerve, and tongue, salivary gland with cervical lymph node, skin with mammary gland, prostate and congealing gland with urinary bladder, and bulbourethral gland were fixed in 10% neutral-buffered formalin. The testes, brain, thymus, heart, spleen, liver, adrenal glands, kidneys, epididymis, and prostate were weighed before the fixation. The significant difference was calculated by using a Dunnett's test or Dunnett-type rank-sum test. The fixed tissues were processed routinely and embedded in paraffin. The paraffin blocks were sectioned and stained with hematoxylin and eosin for microscopic examination.

TABLE 1. Amount of plasticizer eluted from T-die molded PVC sheet incubated in MAP/RCC at 37°C for 49 days (µg/mL in blood).

PVC sheet (parts)	7 days			13 days			21 days			29 days			34 days			42 days			49 days		
	DOTH	DINCH	DEHP	DOTH	DINCH	DEHP	DOTH	DINCH	DEHP	DOTH	DINCH	DEHP	DOTH	DINCH	DEHP	DOTH	DINCH	DEHP	DOTH	DINCH	DEHP
Control (no sheet)	nd <sup>a</sup>	nd	tr <sup>b</sup>	nd	nd	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr
DINCH (60:5)	nd	3.77±1.06	tr	nd	12.4±0.42	tr	nd	16.8±0.64	tr	nd	19.0±1.53	tr	nd	20.4±0.82	tr	nd	25.6±1.32	tr	nd	25.6±1.32	tr
DOTH/DINCH (10:49.5)	4.51±0.21	3.28±0.01	tr	8.38±0.32	8.07±0.10	tr	12.1±1.08	13.6±0.01	tr	10.8±1.76	14.0±1.50	tr	10.9±2.76	15.4±2.81	tr	10.9±2.76	15.4±2.81	tr	12.8±0.70	20.7±1.44	tr
DOTH/DINCH (25:33)	8.79±0.42	1.53±0.09	tr	18.8±0.93	3.59±0.14	tr	30.3±0.56	8.60±0.24	tr	35.0±3.47	10.3±0.76	tr	32.4±2.87	11.3±0.67	tr	32.4±2.87	11.3±0.67	tr	37.1±1.92	14.0±0.37	tr
DOTH/DINCH (40:16.5)	21.0±3.18	1.03±0.14	tr	33.9±1.45	1.76±0.05	tr	47.2±0.01	2.90±0.06	tr	58.3±4.87	4.71±0.38	tr	64.5±3.34	5.80±0.08	tr	64.5±3.34	5.80±0.08	tr	68.5±2.51	6.61±0.20	tr
DOTH (55)	26.7±8.18	nd	tr	49.9±3.58	nd	tr	66.1±7.34	nd	tr	95.0±5.69	nd	tr	101±1.03	nd	tr	101±1.03	nd	tr	114±0.98	nd	tr
DEHP(55)	nd	16.0±1.41	tr	27.0±1.41	nd	tr	32.0±7.07	nd	tr	36.5±2.12	nd	tr	37.0±7.07	nd	tr	37.0±7.07	nd	tr	38.5±3.54	nd	tr

<sup>a</sup>nd, not detected, <sup>b</sup>tr, trace amount less than LOQ

Serum levels of 17β-estradiol (E2), testosterone (TS), follicle-stimulating hormone (FSH), and thyroid-stimulating hormone (TSH) were measured with ELISA kits provided by Enzo Life Sciences Inc. (Farmingdale, NY) for E2 and Endocrine Technologies (Newark, CA) for others. The significant difference was calculated by two-way ANOVA.

RESULTS AND DISCUSSION

Plasticizer Elution Test

The elution test of the plasticizers from the T-die molded PVC sheets was performed to determine the mixing ratio of DOTH and DINCH<sup>®</sup> from the point of the exposure amount to patient. All plasticizers, except for TOTM, with low leachability and no effect on hemolysis suppression [14], were quantified by (GC-MS)/MS analysis by using DEHP-*d*<sub>4</sub> as the internal standard.

As shown in Table 1, the amounts of DEHP, DINCH<sup>®</sup>, and DOTH released from the T-die molded PVC sheets increased in a time-dependent manner and reached 50.5 ± 3.54, 25.6 ± 1.32, and 114 ± 0.98 µg/mL, respectively, after a 49-day incubation in MAP/RCC. These elution patterns were similar to those of the heat-pressed PVC sheets previously reported [14]. Similarly, the total amount of DOTH and DINCH<sup>®</sup> eluted from DOTH/(DINCH<sup>®</sup>-PVC) sheets also increased with higher DOTH content. The total elution amounts of the plasticizers from DOTH/DINCH<sup>®</sup> (10:49.5) and DOTH/DINCH<sup>®</sup> (40:16.5) PVC sheets were lower and higher, respectively, than the amount of DEHP released from DEHP-PVC sheet at all sampling points. On the other hand, the total amount of plasticizers released from the DOTH/DINCH<sup>®</sup> (25:33) PVC sheet was similar to that of DEHP-PVC sheet.

As shown in Table 2, the DOTH/DINCH<sup>®</sup> elution ratio decreased in a time-dependent manner during the test period, and the trend was similar to the elution test performed with the heat-pressed PVC sheet [14]. Hence, the data indicate that the plasticizers were leaching out at different rates. Specifically, the elution of DOTH into MAP/RCC slowed over time, whereas DINCH<sup>®</sup> steadily released during the incubation period.

Taken together, the data suggest that the DOTH/DINCH<sup>®</sup> (40:16.5) PVC sheet is not a useful material for a blood container because patients will be exposed to a larger amount of plasticizer compared with the traditional RBC storage bag consisting of a DEHP-PVC sheet.

Hemolysis Suppression Effect of Each PVC Sheet

The hemolysis suppression effect of the PVC sheets containing alternative plasticizers was estimated and compared with those of DEHP-PVC and TOTM-PVC sheets used as the positive and negative control, respectively.

As shown in Fig. 1, the hemolytic ratio of MAP/RCC in the absence of the PVC sheets increased in a time-dependent manner, reaching 4.9% after 49 days of

TABLE 2. Mean ratio of DOTH and DINCH<sup>®</sup> eluted from the PVC sheet into MAP/RCC (DOTH/DINCH<sup>®</sup>).

PVC sheet (parts)	Incubation time						
	7 days	13 days	21 days	29 days	34 days	42 days	49 days
DOTH/DINCH <sup>®</sup> (10:49.5)	1.38	1.27	1.04	0.89	0.77	0.71	0.62
DOTH/DINCH <sup>®</sup> (25:33)	5.73	5.23	4.22	3.52	3.39	2.87	2.65
DOTH/DINCH <sup>®</sup> (40:16.5)	20.4	19.2	16.3	12.8	12.4	11.1	10.4

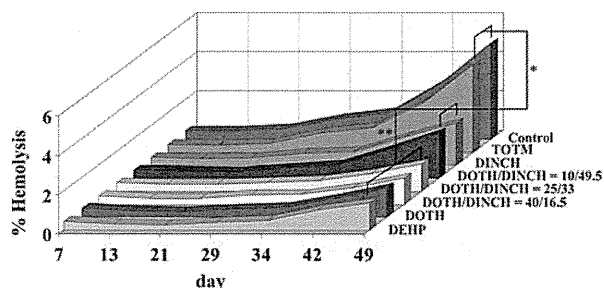


FIG. 1. Hemolytic behavior of MAP/RCC in the presence of T-die molded PVC sheets containing different plasticizers. Based on the hemolytic ratio, three distinct groups were observed: Group 1: the control and TOTM-PVC; Group 2: DINCH<sup>®</sup>- and DOTH/DINCH<sup>®</sup> (10/49.5) PVC sheets; and Group 3: DEHP-, DOTH-, and DOTH/DINCH<sup>®</sup> (40/16.5 and 25/33) PVC sheets. Significant difference (\* $p < 0.01$ ) was detected between Group 1 and Group 2. Significant difference (\*\* $p < 0.05$ ) was detected between Group 2 and Group 3, but not within the group. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

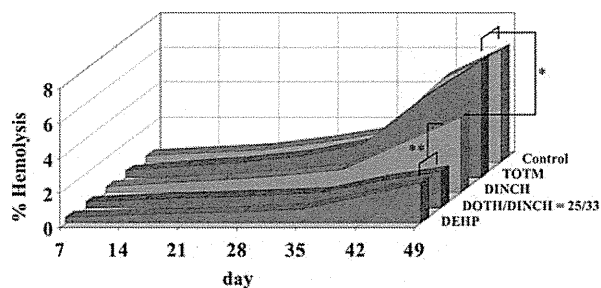


FIG. 2. Hemolytic behavior of SAGM/RCC in the presence of T-die molded PVC sheets containing different plasticizers. Based on the hemolytic ratio, three distinct groups were observed: Group 1: the control and TOTM-PVC; Group 2: DINCH<sup>®</sup>-PVC sheet; and Group 3: DEHP- and DOTH/DINCH<sup>®</sup> (25/33) PVC sheets. Significant difference (\* $p < 0.01$ ) was detected between Group 1 and Group 2. Significant difference (\*\* $p < 0.05$ ) was detected between Group 2 and Group 3, but within each group. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

incubation. The hemolytic behavior of MAP/RCC in the presence of the TOTM-PVC sheet was almost identical at 4.6% after the incubation. DOTH/DINCH<sup>®</sup> (25:33) and DOTH/DINCH<sup>®</sup> (40:16.5) PVC sheets exhibited the hemolysis suppression effect, in which the hemolytic ratios were 1.4% and 1.3%, respectively. These ratios were almost identical to those of DOTH-PVC and DEHP-PVC sheets. The suppression effect was also

detected in DINCH<sup>®</sup>-PVC and DOTH/DINCH<sup>®</sup> (10:49.5) PVC sheets in comparison with those of control (no sheet) and TOTM-PVC sheet ( $p < 0.01$ ), but the degree of suppression from both sheets was slightly weaker than that of the DOTH/DINCH<sup>®</sup> (25:33), DOTH/DINCH<sup>®</sup> (40:16.5), DOTH-PVC, and DEHP-PVC sheets ( $p < 0.05$ ).

TABLE 3. Final body and absolute organ weights of SD rats treated with DOTH for 13 weeks.

	Control	Group treated with DOTH (mg/[kg body weight]/day)			
		0.3	3	30	300
No. of animals examined	8	8	8	8	8
BW (g)	622.6 ± 63.0 <sup>a</sup>	629.6 ± 57.1	617.3 ± 42.9	630.4 ± 48.9	598.0 ± 42.5
Brain (g)	2.22 ± 0.11	2.15 ± 0.07	2.18 ± 0.08	2.17 ± 0.05	2.18 ± 0.09
Thymus (g)	0.38 ± 0.06	0.38 ± 0.07	0.39 ± 0.08	0.34 ± 0.09	0.36 ± 0.06
Heart (g)	1.79 ± 0.23	1.73 ± 0.11	1.74 ± 0.18	1.80 ± 0.14	1.76 ± 0.17
Spleen (g)	0.92 ± 0.16	0.94 ± 0.09	0.89 ± 0.10	0.88 ± 0.13	0.99 ± 0.11
Liver (g)	17.58 ± 2.29	17.10 ± 2.28	17.53 ± 2.08	17.72 ± 2.08	18.17 ± 2.05
Adrenals (g)	0.065 ± 0.009	0.058 ± 0.008	0.059 ± 0.004	0.056 ± 0.008	0.070 ± 0.008
Kidneys (g)	3.93 ± 0.43	3.92 ± 0.37	4.13 ± 0.40	4.09 ± 0.25	4.00 ± 0.23
Testes (g)	3.71 ± 0.40	3.74 ± 0.26	3.88 ± 0.24	3.92 ± 0.34	3.90 ± 0.26
Epididymides (g)	1.37 ± 0.20	1.29 ± 0.13	1.26 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.30 ± 0.08	1.30 ± 0.12
Prostate, ventral (g)	0.69 ± 0.12	0.62 ± 0.17	0.60 ± 0.14	0.62 ± 0.16	0.60 ± 0.10

<sup>a</sup>Mean ± SD.

<sup>b</sup>One animal was excluded due to lack of the head of unilateral epididymis at the sampling. Group treated with DOTH (mg/[kg body weight]/day)

TABLE 4. Relative organ weights of SD rats treated with DOTH for 13 weeks.

	Group treated with DOTH (mg/kg body weight)/day				
	Control	0.3	3	30	300
No. of animals examined	8	8	8	8	8
Brain (g/100 g BW)	0.36 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03
Thymus (g/100 g BW)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Heart (g/100 g BW)	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.03
Spleen (g/100 g BW)	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	± 0.12
Liver (g/100 g BW)	2.83 ± 0.24	2.71 ± 0.15	2.84 ± 0.27	2.81 ± 0.19	3.04 ± 0.30
Adrenals (mg/100 g BW)	10.5 ± 1.5	9.3 ± 1.2	9.6 ± 0.6	9.0 ± 1.7	11.7 ± 1.3
Kidneys (g/100 g BW)	0.63 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.05	0.65 ± 0.04	0.67 ± 0.06
Testes (g/100 g BW)	0.60 ± 0.06	0.60 ± 0.07	0.63 ± 0.04	0.63 ± 0.08	0.65 ± 0.05
Epididymides (g/100 g BW)	0.22 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02
Prostate, ventral (g/100 g BW)	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.02

<sup>a</sup>Mean ± SD.

<sup>b</sup>One animal was excluded due to lack of the head of unilateral epididymis at the sampling.

These results suggest that the DOTH/DINCH<sup>®</sup> (25:33) PVC sheet is the most suitable material for a novel blood container based on the reduction of hemolysis and an elu-

tion of plasticizer comparable to the DEHP-PVC sheet. Although the DOTH-PVC and DOTH/DINCH<sup>®</sup> (40:16.5) PVC sheets exhibited adequate prevention of hemolysis,

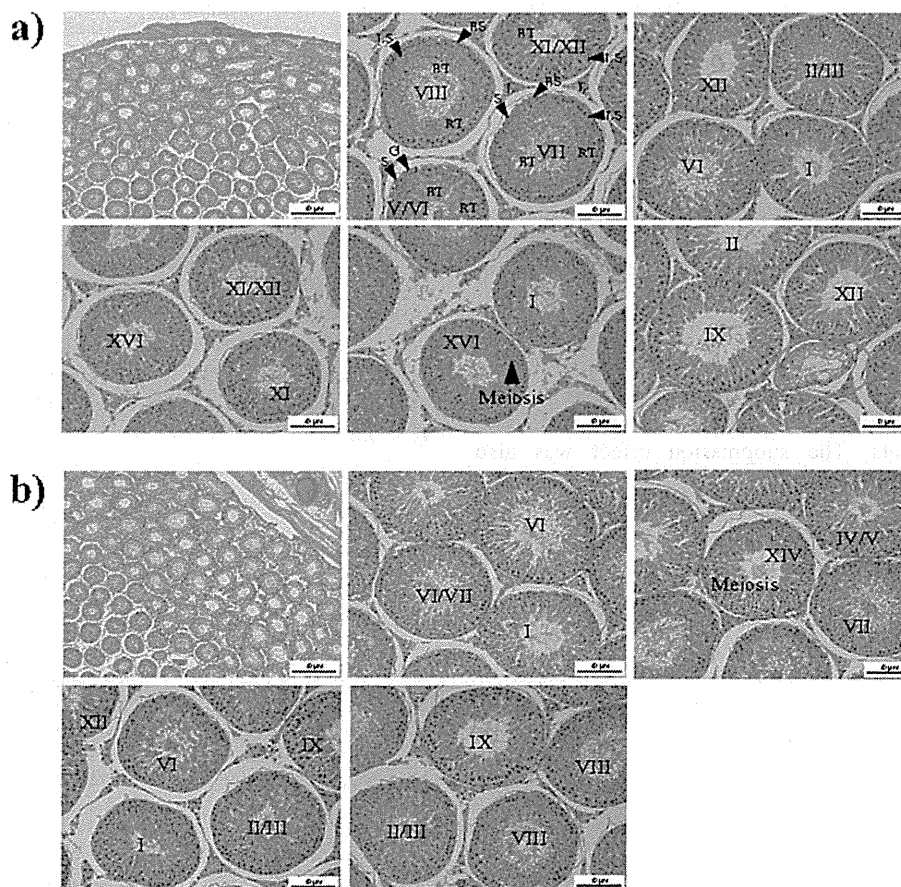


FIG. 3. Histopathological observation of the testes in the subchronic toxicity test in rats administered with DOTH. (a) Control (base diet) and (b) DOTH (300 mg/kg body weight)/day. I–XVI, the stages of sperm cell formation cycle; G, spermatogonia; ES, early spermatocytes; LS, late spermatocytes (pachytene stage); RT, round spermatids; ET, elongate spermatids; S, Sertoli cells; L, Leydig cells; red circle, late spermatocyte apoptosis; green circle, degenerated and atrophied testicular vessel in ordinary state. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]