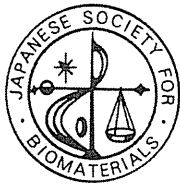


# バイオマテリアル -生体材料-

Journal of Japanese Society for Biomaterials



Vol.33  
2015. JANUARY No.

1

## Offprint

Title \_\_\_\_\_  
Name \_\_\_\_\_  
Department \_\_\_\_\_  
Institution \_\_\_\_\_  
Address \_\_\_\_\_  
Postal Code \_\_\_\_\_ City \_\_\_\_\_ Country \_\_\_\_\_  
Phone \_\_\_\_\_ Fax \_\_\_\_\_

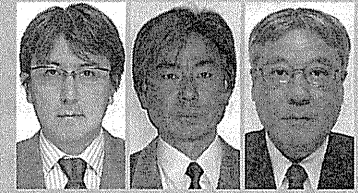
JJSB

日本バイオマテリアル学会

Journal of Japanese Society  
for Biomaterials

特集2 バイオマテリアル・医療機器の実用化と  
ビジネスの最新動向

## 医療機器・材料の国際標準化動向



中岡竜介<sup>○</sup>(写真左), 籠島由二<sup>○</sup>(中央), 新見伸吾<sup>○</sup>(右)

JJSB

Current activities on international standardization of medical devices and their materials

Globalization of economic activities makes their national boundary indistinct so that it becomes very probable that many products without harmonization with their international standards cannot distribute in a worldwide. Even in a field of medical devices, which is controlled by regulatory authority in each country, international standardization of medical devices and their materials by ISO and/or IEC becomes important for industries as well as the regulatory authorities more than before.

In this article, we introduce current domestic and international activities of the standardization of medical devices and their materials. In addition, outlines of important ISO standards related to medical devices, which are developed by two ISO technical committees, are introduced as well.

近年、グローバル化に伴う経済活動の国際的な障壁低下が進んでいるため、さまざまな分野において国際標準と整合性の取れない製品は世界市場に受け入れられなくなってきている。各国において規制対象である医療機器においてもその傾向は見られており、企業のみならず規制当局も国際標準を作成するISO、IECの活動を無視することは出来なくなっている。

ここでは、筆者らが関わっている医療機器・材料に関連した国際標準化の現状を述べるとともに、重要と考えられる国際標準を紹介する。

Ryusuke Nakaoka<sup>○</sup>, Yuji Hatshima<sup>○</sup>, Singo Niimi<sup>○</sup>\*  
Key words: 医療機器, 国際標準化, ISO, 規制

「バイオマテリアル」誌の読者の多くには耳慣れない言葉かもしれないが、国際標準化とは、ある特定の専柄(技術、製品、試験法、システム等)を国際的に共通化するための取り決めであり、簡単にいえば国際的に共通な“ものさし”を作成することによってよい。従来は、国際市場での競争を勝ち抜いて実質的な国際標準となるケース(デファクト規格: WindowsやBlu-ray等)が多かったが、現在は、国際標準化機構(ISO)や国際電気標準会議(IEC)のよう

な国際的な機関内での討議を経て、特定の事情に關する国際標準化が行われることが主流となっている。

さまざまな分野における国際標準化の促進が、現在、国策としても取り上げられてきているが、近年のグローバル化の高まりに伴い国際市場におけるサービスや製品の流通におけるその重要性は増大する一方である。医療機器業界も例外ではないが、他の製品群とは異なり、その製造販売は世界各国において“規制”対象であることから、国際標準化の影響はその流通や品質のみに留まらない。

医療機器・材料の国際標準化は、産業界のみに留まらず、官・学を含んだ医療機器に関わるすべてのステークホルダーに影響を及ぼすものであることを本稿を通じて理解していただければ幸いである。

### 国際標準化の現状

グローバル化は、その活動拡大の妨げとなっていた国境の壁を引き下げることで市場を世界

<sup>○</sup> Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部  
【略歴】(中岡竜介) 1994年 京都大学大学院工学研究科博士後期課程単位取得認定退学(1996年博士[工学])、1994年 セマンティックサイエンス財団研究員、1996年 国立医薬品食品衛生研究所(当時: 国立衛生動物学)医療機器部(当時: 薬品部)研究員、2008年 同部医療機器部第四室長、2009年 同部医療機器部種別医療機器評価室長、現在に至る。専門: 医用高分子、再生医学、趣味: サッカー、音楽  
【略歴】(籠島由二) 1989年 城西大学大学院薬学研究所博士後期課程修了(薬学博士)、1989年 柏西ドイツポリテック研究所研究員、1990年 国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部研究員、1997年 同部医療機器部第一室長、現在に至る。専門: 化学、微生物学、分子生物学、趣味: 卓球  
【略歴】(新見伸吾) 1984年 徳島大学大学院医学系研究科博士課程修了(医学博士)、1984年 徳島大学理学部毒理学教室助手、1984年 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部研究員、1997年 同部薬品部総務用医薬品室長、2002年 同部薬品部第二室長、2003年 同部医薬品部第三室長、2013年 同部医療機器部長、現在に至る。専門: 医療機器の安全性、バイオ医薬品の品質及び免疫原性、趣味: 音楽鑑賞

単一化してきている。単一市場では、性能の如何にかかわらず、そこで標準化された共通規格、すなわち国際標準が重要視され、それから解離した仕様の製品は受け入れられなくなる。この観点から、現在の世界市場では、従来の「よい製品が勝ち残り市場を制する」状況から「規格(標準)を制したものが市場を制する」状況に変化してきている。製品に共通となるプラットフォーム技術(標準)に自社技術を提供することは、知的財産権の面からみると不利になる可能性も孕むが、その後、独自技術を加えることで他社との差別化を図ることが容易になる。すなわち、特定の技術を国際標準化しておくことにより、将来自社製品が市場を勝ち抜き土俵を予め作り出す戦略が可能になるのである。従来の日本のものづくり方針は「よい製品を市場に送り出して競争に勝ち市場を制する」傾向がより強かったことから、その方針が現在の世界動向に合わなくなってきているのは明確である。このような状況を作り出している原因はいくつか考えられるが、その一つとして企業経営陣を含め各業界の方向性を決定しようとする関係者の多くに国際標準化の重要性が普及していない点があげられる。欧米諸国は、元来ボーダーレスな市場を模索していたこともあり、古くから国際標準化を重視していたが、近年は中国、韓国、ブラジル等の国々に加えて、独自路線をとっていた米国も国際標準化を利用した市場拡大のため、ISOやIEC等における国際標準化活動へ積極的に参画しはじめている。

標準化は製品における性能面での差別化を困難にし、市場にたんなるコスト競争を引き起こす危険性を孕んでいるもの、事業戦略を明確にしたうえでそのために必要な標準は作成し、不要な標準は排除する戦略的な取り組みにより市場および利益の確保が可能となる。すなわち、製品仕様の決定にあたり、競争領域と協調領域をどのように線引きすれば市場を勝ち抜くことができるのかを手助けする手段として標準化が利用できる。留意すべき点は、標準化が技術の固定化、硬直化を引き起こし、将来の技術革新における障壁となる可能性があることである。このような標準は、作成しても将来使用されなくなり結果的に市場から排除されることになるため、市場競争においては不利益なものとなってしまふ。この

ように、現在、標準化は企業において市場競争を勝ち抜くための開発戦略と密接に関わっているため、対象とする製品の開発状況、製品と関連した知的財産権の状況および市場ニーズに加えて、品質管理等、製品に関連するその他の事項の標準化状況を鑑みた事業戦略が必須となっている。このような流れは医療機器産業においても同様であるが、規制という観点からみた場合、他の産業と異なり、わが国の医療機器産業が国際市場で勝ち残っていくためには産・官・学がより一体となった標準化戦略が必要となる。

### 医療機器規制と国際標準化

医療において、医療機器は医薬品とならぶ重要な医療製品である。医療機器が実際に臨床で使用されるようになるためには、適切なレベルの性能、安全性、品質が保証される必要があるとともに、その製造販売には各国における許認可が必須となる。わが国においては、医療機器のリスクに応じて国際的な枠組みに沿った分類がなされ、その分類に応じた規制が適用されている。現在、リスクの低い医療機器に関しては、届出や認証制度が利用されているが、リスクの高い新しい医療機器は原則として(独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)による承認審査において、リスク&ベネフィット評価の概念に基づいて、その製造販売の可否が判断される。これら許認可においては、医療機器共通(ホリゾンタル)の標準やその品目に固有の標準が利用されている。

米国もわが国と同様の規制を行っているが、欧州においては、現在、医療機器指令に基づき、欧州標準(EN)を利用した自己、あるいは第三者認証機関により医療機器の製造販売が判断されている。

近年、粗悪な品質の人工乳房が欧州で販売されたこと等が問題になったため、指令ではなく規制(regulation)で医療機器の製造販売を規制する制度が導入される予定だが、ENを利用した医療機器の製造販売判断制度の大枠に基本的な変化はないものと思われる。1991年に欧州標準化委員会(CEN)とISOとがウィーン協定を締結したことに伴い、現在、医療機器分野の標準においてもEN=ISOとなる状況が生まれている。その結果、欧州市場におけるISO

の地位が向上していることから、世界市場を視野に入れた米国企業および政府は、従来の自国標準(American Society for Testing and Materials, ASTM等)重視の姿勢からISO重視の方向に舵を切ってきている。事実、医療機器に関連するISOの委員会において、FDA関係者が議長を務めているケースが年々増えている。原則、議長は中立性を求められるが、現実的には公平性を保ちつつも少なくとも自国にとって不利な状況をつくり出さないような議論の能取りが可能であるため、米国規制当局がISOの有効活用を見据えて活動していることは明らかである。

(注:国際標準はIS(International Standards)と略されることもあるが、文書の頭には作成された機関名(ISOやIEC)が記されることから標準自体をISO、IECと記すことが多い、その慣例に従って、本稿では標準そのものもISO、IECと記すことにするので、読者らは混乱されないよう留意されたい)。

わが国においても、古くはWTO/TBT協定を踏まえた標準・認証制度の国際整合化を促進する一環として、ISOと国内標準であるJIS(Japan Industrial Standards)との整合化が求められるようになった。また、政府調達は国際標準に適合するよう義務づけられたことから、国際標準化の重要性は高まる一方であった。

近年では、平成26年に閣議決定された「健康・医療戦略」<sup>1)</sup>における健康・医療に関する国際展開の促進が施策としてあげられ、医療分野、特に医薬品、医療機器等の審査において利用可能な国際標準化の策定、提案等の推進が明記された。これまでも、医療機器の認証基準や各種ガイドライン等に引用規格として適宜ISOやIECは用いられてきたところであるが、今後はたんなる引用に留まらず、わが国の技術を医療機器関連の国際規格とし、日本発医療機器を国際的に展開するための戦略とそのための環境構築が推進されることになる。

このように、標準が国内外の規制に幅広く利用されることを考慮した場合、世界的にみても、開発者側である産・学と規制側である官との間の医療機器評価における基準の共有化が進むことが期待される。一方、標準の骨子、基準や適用方法は客観的かつ科学的に妥当なものであると同時に、原則として国際

的に許容可能なものでなければならぬ。国際標準を利用する医療機器産業関係者が開発研究・事業を活性化させるためには、実際の標準化作業を知ることが非常に重要となるので、以下にISOにおける標準化活動例を紹介する。

### 医療機器に関連した国際標準化活動例

現在、ISOにおいて医療機器関連の国際標準化作業を行っている技術委員会(Technical Committee, TC)は14であり、そのうちTC194、198および210では医療機器全般に適用可能なホリゾンタルな標準を主に作成している(表1)。これら以外にも「表面化学分析」を扱うTC201のように医療機器の評価と関連する可能性があるTCが複数存在するため、それらのTCを含めるとその数はさらに増える。また、IECではTC62およびその下部機関である分科委員会(Sub Committee, SC)において医用電気機器に関して共通適用される標準(通則)や個別の医用電気機器に関する標準を作成している。本稿では筆者らが活動に関係し、かつ本誌「バイオマテリアル」誌の読者にも関連する二つのTCを取り上げ、それらの活動状況を紹介する。

なお、標準作成はWebシステムを介した作業が中心となっており、新規標準化提案(technical specificationおよびtechnical report等を含む)からはじまり、その採択可否投票、投票国からのコメント送付、提案者(国)によるコメント対応作業および改訂案回覧に至る一連の工程を繰り返して進められる。これら作業の詳細と標準化文書の種類に関しては、日本工業標準調査会(JISC)のホームページ<sup>2)</sup>に国際標準化の概要とともに詳細な説明があるので参考にされたい。

国際標準化は、素案の採択可否を含めその過程において行われる数回の投票段階毎に一定以上の同意を得る必要があることから、往々にして重要な案件は上記作業では収束しない。そのため、直接議論を交わして、ある程度の合意段階にまで標準案をまとめあげることができる総会での討議が重要な役割を担ってきた。総会は、最低、年1回程度開催されているが、近年はWeb会議による討議も多く行われて

表1 ISOにおける医療機器関連の技術委員会(TC)

| TC  | Title  | SC数 | 議長(国籍)   | 事務局      | 日本の参加状況  |
|-----|--|-----|----------|----------|----------|
| 45  | Rubber and rubber products(ゴムおよび製品)  | 4   | Malaysia | Malaysia | P-member |
| 76  | Transfusion, infusion and injection, and blood processing equipment for medical and pharmaceutical use (医療用輸血装置) | 0   | Germany  | Germany  | P-member |
| 84  | Devices for administration of medicinal products and catheters (医療用注射器および注射針)                                    | 0   | USA      | Denmark  | P-member |
| 106 | Dentistry(歯科)  | 8   | Canada   | Canada   | P-member |
| 121 | Anaesthetic and respiratory equipment (麻酔装置及び人工呼吸器関連装置)  | 6   | USA      | USA      | P-member |
| 150 | Implants for surgery(外科用インプラント)  | 7   | USA      | Germany  | P-member |
| 157 | Non-systemic contraceptives and STI barrier prophylactics (避妊具)  | 0   | Malaysia | Malaysia | P-member |
| 170 | Surgical instruments(外科用器具)  | 0   | Vacant   | Germany  | O-member |
| 172 | Optics and photonics(光学およびフォトニクス)  | 7   | Germany  | Germany  | P-member |
| 194 | Biological and clinical evaluation of medical devices (医療機器の生物学的および臨床評価)   | 1   | Germany  | Germany  | P-member |
| 198 | Sterilization of health care products (ヘルスケア製品の滅菌)   | 0   | UK       | USA      | P-member |
| 210 | Quality management and corresponding general aspects for medical devices (医療機器の品質管理と関連する一般事項)                    | 0   | USA      | UK       | P-member |
| 212 | Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems (臨床検査及び体外診断システム)                                | 0   | USA      | USA      | P-member |
| 215 | Health informatics(保健医療情報)   | 0   | USA      | USA      | P-member |

P-member: Participating member, O-member: Observing member (投票権なし)  
TC: Technical Committee, SC: Sub Committee

おり、関係者との直接議論の機会は増加している。

### 1. TC150 "Implants for surgery" (外科用インプラント)

1971年に設立されたTCであり、その名の通り外科用インプラントに関連する国際標準を作成している。事務局はドイツ標準局が担当しており、議長はFDAに所属するMr. John Goodeが務めている。日本は、各種投票に参加できるP-member(participating member)としてこのTCに参加している。委員会に参加する場合、国内における窓口を担当し、国内での意見を集約するための業務を行う団体(国内審議団)が必要となっており、TC150では日本ファイナセラム協会と日本医療機器テクノロジー協会(MT JAPAN)がその責務を担っている。国内委員会には、筆者らを含め複数名のバイオマテリアル学会会員が委員として参加している。

このTCは、標準化作業を促進するために、TC直下に作業グループを形成する以外に、標準化対象を具体的に分担して扱うためのSCを七つ設立している(表2)。なお、親TCへの活動報告義務はある

が、SCは設立時に定められた業務範囲に関する標準作成を親TCから独立して行うことができる。そのため、設立時の業務範囲がその時代のトピックスと一致しないこと等が原因で、同じTCに属していてもSC間で活動の活発さに差が生じる。実際、SC3は作業対象となる案件が存在しないため現在休眠中であるが、その他のSCおよび各作業グループ(WG)は活発な作業を行っている。

このTCにおける議論対象は、外科用インプラントに使用される材料(金属、高分子、セラミックス)に関する標準や、具体的な個別製品(人工関節、人工骨等)に必要な要件に関する標準、材料や個別製品を対象にした具体的な試験法(強度試験、疲労試験)に関する標準等をこれまでに141作成してきている。これまでにTC150で作成された標準のタイトルを分野毎に分けていくつか以下に示す。

#### 【材料・製品標準例】

- ISO 5832-4:2014 Implants for surgery—Metallic materials—Part 4: Cobalt-chromium-molybdenum casting alloy

表2 ISO/TC 150「外科用インプラント」の構成

| WG    | Title   | 議長(国籍)  | 事務局     | 日本の参加状況        |
|-------|---|---------|---------|----------------|
| TC150 | Implants for surgery(外科用インプラント)<br>Fundamental standards(基本標準)<br>Breast implants(人工乳房)<br>Use and retrieval of surgical implants(外科用インプラントの使用と抜去)<br>Implant coating(インプラントへのコーティング)   | USA     | Germany | P-member       |
| SC1   | Materials(材料)<br>Ceramics(セラミックス)<br>Metals(金属)<br>Plastics(プラスチック)   | UK      | Germany | P-member       |
| SC2   | Cardiovascular implants and extracorporeal systems (心臓血管用インプラントおよび体外循環システム)<br>Cardiac valves(心臓弁)<br>Vascular prostheses(人工血管)<br>Blood gas exchangers(血液-ガス交換器(人工肺))<br>Renal replacement, detoxification and apheresis(人工透析器)<br>Vascular device/drug combination products (血管用機器-薬剤コンビネーション製品)<br>Cardiovascular absorbable implants(心臓血管用吸収性インプラント)  | USA     | USA     | P-member       |
| SC3   | Neurosurgical implants(神経外科用インプラント:休止中)   | Germany | Germany | 不参加            |
| SC4   | Bone and joint replacements(人工骨および人工関節)<br>Mechanical testing(力学試験)<br>Wear(摩耗)<br>General requirements(一般的要求事項)  | UK      | UK      | P-member       |
| SC5   | Osteosynthesis and spinal devices(骨接合機器および脊椎用機器)<br>Osteosynthesis(骨接合機器)<br>Spinal devices(脊椎用機器)  |         |         |                |
| SC6   | Active implants(能動型インプラント)<br>Fundamental standards(基本標準)<br>Cochlear implants(人工内耳)<br>Implantable infusion pumps(植込み式輸液ポンプ)<br>Implantable neurostimulators(植込み式神経刺激装置)<br>Circulatory support devices(補助人工心臓)<br>Cardiac pacemakers and implantable defibrillators (ペースメーカーおよび植込み式除細動器)<br>Effects of magnetic resonance imaging on active implantable medical devices (MRIによる能動型インプラントへの影響) | Canada  | USA     | P-member       |
| SC7   | Tissue-engineered medical products(再生医療機器)<br>Management of risk(リスクマネジメント)<br>General guideline of safety test(安全性試験の一般的ガイドライン)<br>Tissue-engineered medical products for skeletal tissues (骨格組織用再生医療機器)   | USA     | Japan   | P-member (事務局) |

WG: working group

- ISO 5834-1:2005 Implants for surgery—Ultra-high-molecular-weight polyethylene—Part 1: Powder form
- ISO 13179-1:2014 Implants for surgery—*In vitro* evaluation for apatite-forming ability of implant materials
- ISO/TS 17137:2014 Cardiovascular implants and extracorporeal systems—Cardiovascular absorbable implants
- 【試験標準例】
- ISO 7206-6:2013 Implants for surgery—Partial

- and total hip joint prostheses—Part 6: Endurance properties testing and performance requirements of neck region of stemmed femoral components
- ISO 12891-2:2014 Retrieval and analysis of surgical implants—Part 2: Analysis of retrieved surgical implants
- ISO 17853:2013 Wear of implant materials—Polymer and metal wear particles—Isolation and characterization
- ISO 23317:2014 Implants for surgery—*In vitro* evaluation for apatite-forming ability of implant

表3 ISO/TC 194「医療機器の生物学的及び臨床評価」の構成

| WG     | Title  | 議長(国籍)  | 事務局     | 日本の参加状況  |
|--------|--|---------|---------|----------|
| TC 194 | Biological and clinical evaluation of medical devices (医療機器の生物学的および臨床評価)             | Germany | Germany | P-member |
| 1      | Systematic approach to biological evaluation and terminology (生物学的評価における体系的な取組みと用語集) |         |         |          |
| 2      | Degradation aspects related to biological testing (生物学的試験における材料分解性に関する留意点)           |         |         |          |
| 3      | Animal protection aspects (動物愛護に関する留意点)  |         |         |          |
| 4      | Clinical investigations of medical devices in humans (医療機器の臨床試験)                     |         |         |          |
| 5      | Cytotoxicity (細胞毒性)  |         |         |          |
| 6      | Mutagenicity, carcinogenicity and reproductive toxicity (変異原性,発がん性および生殖毒性)           |         |         |          |
| 7      | Systemic toxicity (全身毒性)   |         |         |          |
| 8      | Irritation, sensitization (刺激性,感作性)  |         |         |          |
| 9      | Effect on blood (血途への影響)   |         |         |          |
| 10     | Implantation (埋植試験)  |         |         |          |
| 11     | Allowable limits for leachable substances (溶出物の許容限界)                                 |         |         |          |
| 12     | Sample preparation and reference materials (試料調製と対照物質)                               |         |         |          |
| 13     | Toxicokinetics (毒物動態学)   |         |         |          |
| 14     | Material characterization (材料特性評価)   |         |         |          |
| 15     | Strategic approach to biological assessment (生物学的アセスメントにおける戦略的取組み)                   |         |         |          |
| 16     | Pyrogenicity (発熱性)   |         |         |          |
| 17     | Nanomaterials (ナノマテリアル)  |         |         |          |
| SC 1   | Tissue product safety (組織由来製品の安全性)   | USA     | Germany | P-member |
| 1      | Risk assessment, terminology and global aspects (リスクアセスメント,用語集およびその他の事項)             |         |         |          |
| 2      | Sourcing controls, collection and handling (原料の制限,入手および処理)                           |         |         |          |
| 3      | Elimination and/or inactivation of viruses and TSE agents (ウイルスおよびTSE原因物質の除去と不活化)    |         |         |          |
| 4      | TSE Elimination (TSE原因物質の除去)   |         |         |          |

materials

これらのタイトルから、このTCにおける標準化の具体的な対象、さらにはみずからの研究成果や技術を当該TCにおいて標準化する手段が存在することを、本稿の読者には理解していただけることを期待する。ただし、みずからの技術を標準化する最終目標は、標準化自体ではなく、それをを用いた医療機器が数多く開発され上市化されることであることに留意されたい。特に、このTCのように個別の材料・製品に特化した標準を作成する場合は、さらなる技術発展の阻害にならないよう適切な標準化戦略が必要となる。

2.TC 194 Biological and clinical evaluation of medical devices (医療機器の生物学的および臨床評価)

1988年に設立されたTCであり、医用材料および医療機器の安全性に関する生物学的評価方法(細胞毒性, 変異原性, 全身毒性等)と臨床試験基準(GCP)に関する標準化を討議してきている。このTCで作

成されている生物学的評価に関する標準は、その番号からISO 10993シリーズとして医療機器業界に知られており、特にWG1で作成された基本的考え方に関する標準は国内通知<sup>3)</sup>にも引用されている。

材料が人体に障害を引き起こす原因は、材料と接触した血液や組織液に溶出する化学物質の毒性に由来することが多い。現在、医療機器の安全性評価を行うにあたっては、毒性の原因となりうるハザードの特定、特定されたハザードによるリスクの推定等が、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を用いて実施されなければならない。その後、実際に使用される状況に応じたリスク解析を行うことにより、医療機器の生物学的安全性が評価される。

材料によって生体を受ける障害は、炎症, アレルギー, 発熱, 組織壊死, 腫瘍等の形で出現するため、各毒性反応を検出しようとする生物学的試験を用いてそれらの安全性を評価する。個々の医療機器の生物学的安全性評価に求められる試験項目は、実際に使用さ

れる状況、具体的には、医療機器のカテゴリー、接触部位、接触期間に応じて選択する必要がある。そのための基本的な考え方はこのTCで作成されたISO 10993-1に記載されており、上述したように国内通知にも引用されている。TC 150で数多く作成されている個別標準と異なり、このTCで作成されたISOはほとんどの医療機器に適用される水平的な標準であり、医療機器業界における重要性は大きい。

現存するWGは17、SCは1であり、そのSCは四つのWGをもつ(表3)。なお、SC1は2008年にScopeを変更し、親TCでは対象とされていない生きた組織、すなわち細胞等の安全性に関する事柄も扱うことになり、2013年には、このSCで討議された「生きたヒト細胞を含む医療製品のリスクマネジメント」に関する標準(ISO 13022:2012)が発行された。これは、ISOにおいて発行された最初の再生医療関係の標準である。このTCで発行した標準はこれまでに30存在し、その多くが国内外の規制に引用されている。具体的な標準の内容、現在の討議事項に関して興味のある方は、ISOのホームページ<sup>3)</sup>や弊所に開設しているTC 194国内委員会ホームページ<sup>3)</sup>をご覧ください。

近年の活動で特筆すべき事項は、国内委員会主催で開催されたTC 194年次総会(2014年4月、三島市)において、体内吸収性材料に関する考え方や試験法に加え、動物愛護の高まりに伴う動物試験削減のための考え方を標準に追加することが参加者間の活発な討議により合意され、当該TCがこれまでに作成したほとんどすべての標準の改訂作業を開始するに至ったことである。また、一部WGでは、各国で開発された新規の安全性評価技術を標準に取り込むための作業も開始することになった。このことから分かるように、必要とされる標準は、その時代に応じた形に修正されていくものであり、そのためのバックグラウンドデータを得るための材料や試験法に関する継続的かつ地道な基礎的研究が必要となる。その一方で、新規材料の開発においては、これらの標準に記載された試験法により生物学的安全性を評価することが求められるため、最先端の研究を行っている研究者であってもこのTCの活動や発行された

ISOを無視することはできない。

歴史的に、日本はTC 194設立当時のP-memberであり、初期の実質的な審議主体は本学会であったことが国内委員会ホームページ議事録に掲載されている。その議事録には、1995年に国内の生物試験法ガイドラインが通知として発出され、TC 194も試験の枠組みと個別試験法の一通りの標準化作業を終えたことから、改訂や問題点解決等、以降に必要なとされる作業の主体を企業および規制当局に移行させるべきであるとの判断が当時の審議メンバーによりなされ、1997年をもって本学会はTC 194の討議から距離をおくことになったとの記載があった。この時点で本学会とTC 194との直接的な関係はなくなったが、標準化作業では一定の科学的知識を有するメンバーでの討議が必須であるため、必然的に各国からは規制関係者や企業関係者、コンサルタントらに加え科学者、特にバイオマテリアル研究者がメンバーとして推薦されることになる。

日本においても、筆者らを含め、現在のTC 194国内委員会メンバーの多くが本学会員であることから、いまだにTC 194と本学会との関係はある程度の距離を保ちながらつづいているといつてよい。上述したように、本TCの活動はバイオマテリアルの実用化に大きく影響するため、今後、学会および学会員の皆様の積極的な関与をお願いしたい。

医療機器関連国際標準化支援窓口の試験的開設

筆者らは、平成23.24年度に行った厚生労働科学研究費補助金事業において「医療機器規格・基準の国際標準化戦略に係る政策的提言」を作成し、日本発の医療機器を国際的に進出させるための環境整備における国際標準化推進の重要性を提言した。当該提言に含まれる施策は多岐にわたり、その一項目として米国のAmerican National Standards Institute(ANSI)、英国のBritish Standards Institution(BSI)、ドイツのDeutsches Institut für Normung(DIN)のように、自国政府および関連省庁と連携して基礎データの収集や保持管理も行いつつ国際標準化活動を分野毎にとりまとめ、一元的かつ戦略的に実施・サポートする機関を国内に設立する必要性が指摘されている。この

提言をもとに、本年度から、厚生労働科学研究費補助金事業により、医療機器の標準化に関する情報を一元的に収集してとりまとめて発信するための試験的窓口を弊部ホームページ<sup>6)</sup>に設立した。表1にあげたように、医療機器に関連したISOおよびIECのTCは非常に多く、また発行された標準の総数も千を超え、限られた人員ですべての医療機器を対象とした作業を行うことは不可能なことから、まずは注目度の高い医療機器を対象を絞り、関連したTCやSCの活動状況を調査し取りまとめることにした。

調査対象として選択した製品は、「再生医療等製品」と「医療機器ソフトウェア」であり、いずれも、近年、急速に発展し、今後もその展開が着目されている分野である。昨年11月より「再生医療等製品」は、医療機器とは別の枠組みで規制されており、厳密には医療機器ではない。しかし、多くの再生医療等製品にはバイオマテリアルが使用されており、その安全性・有効性においては細胞および医用材料との相互作用解析が重要となる。また、筆者の一人が当該製品の国際標準化に関わっていることから調査対象分野として選定した。後者は、stand aloneの医療用ソフトウェアであってもその用途によって規制対象となったことから、従来以上に関連する国際標準が安全性や品質を検討するうえで重要となるため調査対象とした。ホームページは未完成であり、2014年11月現在は再生医療機器の状況のみを公開しているが、本稿が「バイオマテリアル」誌に掲載されるころには、その更新とソフトウェアの標準化に関する情報を公開できるよう努力したい。

この活動を通して明確になった特筆すべき事項は、国際標準化に積極的な企業が少ないこと、関与している企業においてもその担当者への特別なサポート等がほとんどなく、担当者は正当な評価を受けていないと感じていることなど、多くの企業が国際標準化の重要性を理解していないことである。具体的には、事業における標準化と知的財産権との戦略的な使い分けを行っていないとともに、知的財産権の確保のみで市場を勝ち抜く、旧態の事業戦略から脱却していない企業が数多く存在することが判明した。

このような現状を打破するためには、医療機器関連の研究者のみならず、企業経営陣を対象とした国際標準化の啓蒙活動が必要であることも明らかとなった。前述した「健康・医療戦略」に医薬品、医療機器等の審査において利用可能な国際標準化の策定、提案等の推進が国策として明記された状況を鑑みると、このような状況は医療機器開発に携わるすべての関係者にとって好ましくない。

筆者らは、今後も医療機器開発に携わる産・官・学関係者を対象とした啓蒙活動を行っていく予定であるが、本稿により標準化の重要性を理解していただいた読者の方々には、ぜひともみずからの研究に関係するTCの活動にご協力いただくとともに、ご自分の技術を含めたわが国発の医療機器標準作成への積極的な関与をお願いしたい。なお、関連TCへの橋渡しを担当させていただくことも可能であるため、標準化活動にご興味をもたれた読者の方々は筆者らにご一報いただきたい。少なくとも本稿により、読者にとって医療機器関連の国際標準化に関する理解を深めるきっかけになると同時に、わが国発の国際標準作成の活性化、さらにはそれを通じた医療機器国際市場の新規開拓等の国内産業活性化ならびに医療機器審査の迅速化等への取り組み状況を理解するための一助になれば幸いである。

本稿に紹介した活動および研究成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金地球規模保健課題事業「医療機器規格の国際標準化を支援する体制構築に関する研究」による。

#### 文 献

- 1) <http://www.kantei.go.jp/jp/singi/kenkouiryousuisin/ketteisiryoudai2/siryoudai>
- 2) <http://www.jisc.go.jp/international/index.html>
- 3) 平成24年3月1日付薬食機発0301第20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「医療機器の製造販売承認申請等に必要となる生物学的安全性評価の基本的考え方について」([http://www.pmda.go.jp/kijunsakusei/file/guideline/medical\\_device/T12030210070.pdf](http://www.pmda.go.jp/kijunsakusei/file/guideline/medical_device/T12030210070.pdf))
- 4) [http://www.iso.org/iso/home/standards\\_development/list\\_of\\_iso\\_technical\\_committees/iso\\_technical\\_committee.htm?commid=54508](http://www.iso.org/iso/home/standards_development/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=54508)
- 5) <http://dmd.nhs.gov/jp/iso-ic194/index.html>
- 6) <http://dmd.nhs.gov/jp/chikyukibo/index.html>



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する資料⑫

J. Vinyl Add. Technol., in press (2015)



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

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>5</sup>

<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 Nukukitamachi, 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

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 periparturient 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 di-isononyl-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 subchronic 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 spectrometry) (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, DOTH 55 parts, DINCH<sup>®</sup> 60.5 parts, or DOTH/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:

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

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 DOTH intake; DOTH 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 DOTH 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 DOTH. 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™ 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 I. 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        | nd        | nd   | nd        | nd        | nd   | nd        | nd        | nd   | nd        | nd        | nd   | nd         | nd        | nd   | nd        | nd        | nd   | nd        | nd        | nd   | nd |
| DOTH                 | 3.77±1.06 | nd        | nd   | 6.58±0.21 | nd        | nd   | 12.4±0.2  | nd        | nd   | 10.9±1.53 | nd        | nd   | 20.4±0.83  | nd        | nd   | 20.4±0.83 | nd        | nd   | 25.6±1.33 | nd        | nd   | nd |
| DINCH                | 4.51±0.21 | 3.28±0.00 | nd   | 6.88±0.35 | 5.88±0.24 | nd   | 8.8±0.32  | 8.07±0.10 | nd   | 10.8±1.76 | 14.0±1.50 | nd   | 10.9±2.236 | 15.4±2.81 | nd   | 12.8±0.70 | 20.7±1.44 | nd   | nd        | nd        | nd   | nd |
| DOTH/DINCH (10:49.5) | 8.79±0.42 | 1.51±0.09 | nd   | 18.8±0.83 | 3.39±0.14 | nd   | 26.0±0.94 | 6.65±0.48 | nd   | 30.3±0.98 | 8.69±0.23 | nd   | 35.0±3.47  | 10.3±0.76 | nd   | 32.4±2.87 | 11.3±0.67 | nd   | 37.1±1.92 | 14.0±0.17 | nd   | nd |
| DOTH/DINCH (25:33)   | 21.0±3.18 | 1.03±0.14 | nd   | 33.9±1.45 | 1.76±0.05 | nd   | 47.2±0.01 | 2.90±0.06 | nd   | 58.3±4.89 | 4.71±0.38 | nd   | 64.5±3.34  | 3.80±0.08 | nd   | 68.5±2.51 | 1.61±0.20 | nd   | nd        | nd        | nd   | nd |
| DOTH (5)             | 26.7±4.18 | nd        | nd   | 49.9±3.58 | nd        | nd   | 66.1±7.34 | nd        | nd   | 90.0±5.69 | nd        | nd   | 101.1±0.5  | nd        | nd   | 114±0.08  | nd        | nd   | nd        | nd        | nd   | nd |
| DEHP(5)              | 16.0±1.41 | nd        | nd   | 27.0±1.41 | nd        | nd   | 36.5±2.12 | nd        | nd   | 50.0±7.07 | nd        | nd   | 58.2±3.54  | nd        | nd   | 58.2±3.54 | nd        | nd   | nd        | nd        | nd   | nd |

nd, not detected. \*p, 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- $d_4$  as the internal standard.

As shown in Table I, 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    |

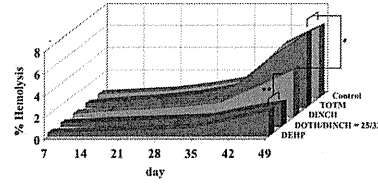
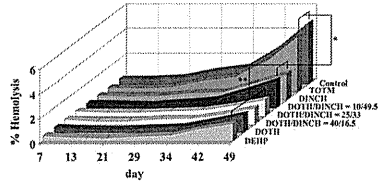


FIG. 1. Hemolytic behavior of MAP/RCC in the presence of T-die molded PVC sheets containing different plasticizers. Based on the hemolytic ratio, three distinct groups were observed: Group 1: the control and TOTM-PVC; Group 2: DINCH<sup>®</sup> and DOTH/DINCH<sup>®</sup> (10/49.5) PVC sheets; and Group 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 ( $**p < 0.05$ ) 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.

|                         | Group treated with DOTH (mg/kg body weight/day) |               |                          |               |               |
|-------------------------|---|---------------|--------------------------|---------------|---------------|
|                         | Control   | 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 | 0.14 ± 0.02 |
| 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 | 0.65 ± 0.04              | 0.63 ± 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,

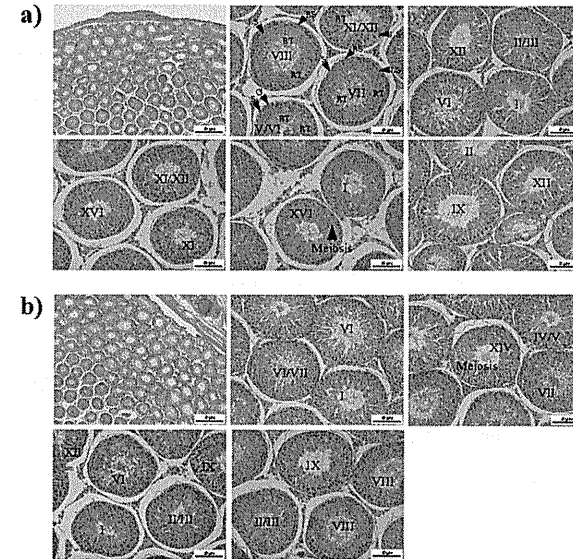


FIG. 3. Histopathological observation of the testes in the subchronic toxicity test in rats administered with DOTH. (a) Control (base diet) and (b) DOTH (300 mg/kg body weight/day). I–XVI, the stages of sperm cell formation cycle; G, spermatogonia; ES, early spermatocytes; LS, late spermatocytes (pachytene 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.]

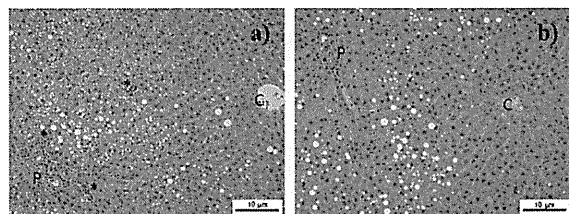


FIG. 4. Histopathological observation of the liver in the subchronic toxicity test in rats administered DOTH. (a) Control (base diet) and (b) DOTH (300 mg/kg body weight/day). C, central vein; P, Glisson's capsule; \*, slight infiltration of inflammatory cells located around Glisson's capsule. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

the total amount of the plasticizers released from the sheets was higher than that of the DEHP-PVC sheet. Conversely, although DINCH<sup>®</sup>-PVC and DOTH/DINCH<sup>®</sup> (10:49.5) sheets had less plasticizer leached, the hemolytic ratios were higher than the DEHP-PVC sheet. The data for the DINCH<sup>®</sup>-PVC sheet are in agreement with a study by Dumont et al. [26] in which DINCH<sup>®</sup>-PVC bags exhibited protective effects against RBC hemolysis that were similar to normal DEHP-PVC containers under periodic mixing conditions, but not adequate under static conditions.

The type of anticoagulant and the viability of RBCs may be closely correlated with hemolysis suppression of the plasticizer [27]. The RCC product used in Japan contains the MAP solution as an anticoagulant, whereas the SAGM solution is widely used in other countries. Hence, hemolysis suppression with SAGM/RCC was also performed, and the results are shown in Fig. 2. The hemolytic behavior using SAGM/RCC was almost identical to the result yielded from MAP/RCC described above. The DINCH<sup>®</sup>-PVC sheet exhibited significantly greater hemolysis suppression than that shown by the control (no sheet) and TOTM-PVC sheet ( $p < 0.01$ ). The hemolysis suppression effect of DOTH/DINCH<sup>®</sup> (25:33) PVC sheet was higher than that of the DINCH<sup>®</sup>-PVC sheet ( $p < 0.05$ ) and equal to that of DEHP-PVC sheet. Thus, the potential of the DOTH/DINCH<sup>®</sup> (25:33) PVC sheet as part of a suitable blood container was reaffirmed with SAGM/RCC.

#### Subchronic Toxicity of DOTH in Rats

The growth rate and feed consumption in the DOTH groups were comparable to those in the control group throughout the study. The mean dietary intake of DOTH administered to rats at the highest dose level was calculated to be 297 mg/(kg body weight)/day based on food consumption. The treatment-related macroscopic change was not detected in any of the organs except for a fatty liver observed in the control and DOTH groups. There was no significant difference in the absolute and/or relative weights shown in Tables 3 and 4. In the histopatho-

logical examination, no abnormalities were observed in the testes of rats in the control and treated groups, and all rats were normal (Fig. 3). Diffuse fatty change of hepatocytes and inflammatory cell infiltration were noted in several rats of both the control and the treated groups in the liver (Fig. 4). Although these changes are not common in rats of this age, they were not due to treatment-related toxicity. The changes may be related to the rats' diet. The prepared food included oil in the basal diet, which resulted in high calorie consumption of all groups including the control group. Other histopathological changes, such as focal inflammation in the prostate and focal myocarditis, were scattered in all groups. All of these observations are known to be common changes in rats, and their incidences or intensities were comparable among the control and the treated groups, indicating they were not treatment-related. Other organs including the epididymis and kidneys were not affected by the treatment with DOTH even at the highest dose. From the hormone assays, no significant differences in the number of sperm cells in the epididymis and the levels of TS, E2, FSH, and TSH in serum were observed between each group including control, as shown in Figs. 5 and 6. Based on the results of the study, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of DOTH was found to be 300 mg/(kg body weight)/day.

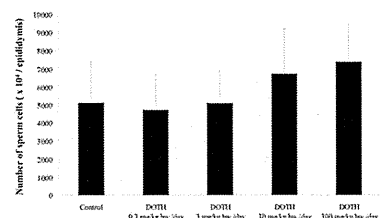


FIG. 5. Number of sperm cells in the epididymis of rats administered different amounts of DOTH for 13 weeks.

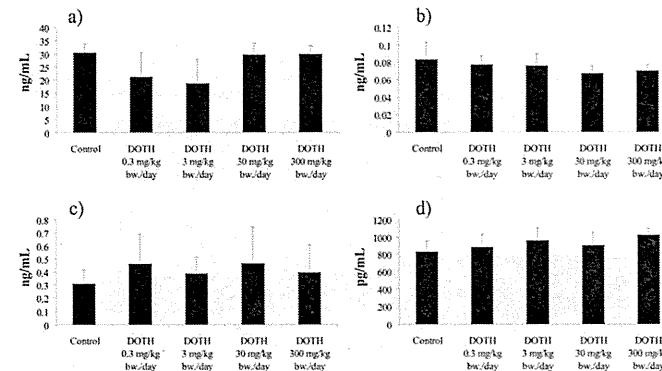


FIG. 6. The levels of hormones in the blood of rats administered different amounts of DOTH for 13 weeks. (a) TSH. (b) FSH. (c) testosterone, and (d) 17 $\beta$ -estradiol.

Poon et al. [28] reported that DEHP caused hepatomegaly to Sprague-Dawley rats by the administration of the diet containing the plasticizer at the concentration of 5,000  $\mu$ g/g for 13 weeks. They reported there was mild to moderate seminiferous tubule atrophy and Sertoli cell vacuolation in male rats at 375.2  $\pm$  98.5 mg/(body weight)/day, rats of both sexes showed hepatic peroxisome proliferation at the same dose. They also found that DEHP caused mild histological changes in the thyroid consisting of reduced follicle size and colloid density, and the liver, consisting of endothelial nuclear prominence, nuclear hyperchromicity, and anisokaryosis at 5,000  $\mu$ g/g. In addition to the results of other experiments, Poon et al. judged the NOAEL of DEHP in the rats to be 3.7 mg/(kg body weight)/day for testicular toxicity. In contrast, these histological changes were not observed in our study of rats treated with DOTH even at the highest dose described above. Our findings indicate that DOTH has no toxicity in the subchronic study in male rats, thereby suggesting that DOTH is a less toxic plasticizer than DEHP with the NOAEL at 300 mg/(kg body weight)/day.

The weak toxicity of DOTH was also found in another Japanese report [18], in which the NOAEL in the male rats was determined to be 100 mg/(kg body weight)/day. In this case, centrilobular hepatomegaly and a significant increase of liver and kidney weights were observed after treatment with DOTH at 300 mg/(kg body weight)/day in the repeated oral administration for 56 days. It was also confirmed that these changes were reversible in that the recovery was observed by 2 weeks after stopping the administration [18], no effect of DOTH was detected in testing for reproductive/developmental toxicity [18], bacterial reverse mutation [19], and chromosomal aberration [20].

#### CONCLUSIONS

Our data suggest that the DOTH/DINCH<sup>®</sup> (25:33) PVC sheet may be the most suitable material to replace the DEHP-PVC sheets used in traditional RBC storage bags because of its ability to suppress hemolysis and elute less plasticizer. A prototype of a blood container made of this sheet is now in progress; a clinical trial with the cooperation of a suitable number of volunteers will be performed in the near future. We will evaluate the chemical, physicochemical, biological, and dynamic properties required for a medical device product.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We greatly appreciate the skillful assistance of Drs. Ryoh-ichi Ichimura and Jun Maeda, Division of Pathology, National Institute of Health Sciences.

#### REFERENCES

1. M.C. Allwood, *Int. J. Pharm.*, 29, 233 (1986).
2. S. Loff, F. Kabs, K. Witt, J. Sartorius, B. Mandl, K.H. Niessen, and K.L. Waag, *J. Pediatr. Surg.*, 35, 1775 (2000).
3. OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4, Test No. 408: Repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents (1998).
4. J.C. Lamb, R.E. Chapin, J. Teague, A.D. Lawton, and J.R. Reel, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 88, 255 (1987).
5. R.W. Tyl, C.J. Price, M.C. Marr, and C.A. Kimmel, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10, 395 (1988).
6. J.H. Richburg, and K. Boelkeheide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 137, 42 (1996).
7. J. Lee, J.H. Richburg, E.B. Shipp, M.L. Meistrich, and K. Boelkeheide, *Endocrinology*, 140, 852 (1999).

8. J.H. Richburg, A. Nanex, L.R. Williams, M.E. Embree, and K. Boekelheide, *Endocrinology*, **141**, 787 (2000).
9. T.N. Lovekamp, and B.J. Davis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **172**, 217 (2001).
10. R. Habert, V. Muczynski, A. Lehraiki, R. Lambrot, C. Lécureuil, C. Levacher, H. Coffigny, C. Pairault, D. Moison, R. Frydman, and V. Rouiller-Fabre, *Folia Histochem. Cytobiol.*, **47**, S67 (2009).
11. R. Lambrot, V. Muczynski, C. Lécureuil, G. Angenard, H. Coffigny, C. Pairault, D. Moison, R. Frydman, R. Habert, and V. Rouiller-Fabre, *Environ. Health Perspect.*, **117**, 32 (2009).
12. J. Reinsberg, P. Wegener-Toper, K. van der Ven, H. van der Ven, and D. Klingmueller, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **239**, 116 (2009).
13. J.P. AuBuchon, T.N. Estep, and R.J. Davey, *Blood*, **71**, 448 (1988).
14. Y. Haishima, T. Kawakami, C. Hasegawa, A. Tanoue, T. Yuba, K. Isama, M. Matsuoka, and S. Niimi, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **102**, 721 (2014).
15. K. Kambia, T. Dine, R. Azar, B. Gressier, M. Luyckx, and C. Brunet, *Int. J. Pharm.*, **229**, 139 (2001).
16. T. Holmgren, L. Persson, P.L. Andersson, and P. Haglund, *Sci. Total Environ.*, **437**, 306 (2012).
17. M. Hirata-Koizumi, M. Takahashi, M. Matsumoto, T. Kawamura, A. Ono, and A. Hirose, *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, **130**, 31 (2012).
18. BOZO Research Center, *Final report on the repeated dose toxicity and reproduction/development toxicity tests of DOTH* (in Japanese) [WWW document]. URL [http://dra4.nihs.go.jp/mhlw\\_data/home/pdf/PDF2915-49-3d.pdf](http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/pdf/PDF2915-49-3d.pdf) [Accessed on XXX].
19. BOZO Research Center, *Final report on the bacterial reverse mutation test of DOTH* (in Japanese) [WWW document]. URL [http://dra4.nihs.go.jp/mhlw\\_data/home/pdf/PDF2915-49-3e.pdf](http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/pdf/PDF2915-49-3e.pdf) [Accessed on XXX].
20. BOZO Research Center, *Final report on the chromosomal aberration test of DOTH* (in Japanese) [WWW document]. URL [http://dra4.nihs.go.jp/mhlw\\_data/home/pdf/PDF2915-49-3f.pdf](http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/pdf/PDF2915-49-3f.pdf) [Accessed on XXX].
21. R. Ito, F. Seshimo, Y. Haishima, C. Hasegawa, K. Isama, T. Yagami, K. Nakahashi, H. Yamazaki, K. Inoue, Y. Yoshimura, K. Saito, T. Tsuchiya, and H. Nakazawa, *Int. J. Pharm.*, **303**, 104 (2005).
22. Y. Haishima, F. Seshimo, T. Higuchi, H. Yamazaki, C. Hasegawa, S. Izumi, T. Makino, K. Nakahashi, R. Ito, K. Inoue, Y. Yoshimura, K. Saito, T. Yagami, T. Tsuchiya, and H. Nakazawa, *Int. J. Pharm.*, **298**, 126 (2005).
23. Y. Haishima, R. Matsuda, Y. Hayashi, C. Hasegawa, T. Yagami, and T. Tsuchiya, *Int. J. Pharm.*, **274**, 119 (2004).
24. T. Kawakami, K. Isama, and A. Matsuoka, *J. Environ. Sci. Health A*, **46**, 855 (2011).
25. Y. Hayashi, R. Matsuda, Y. Haishima, T. Yagami, and A. Nakamura, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**, 421 (2002).
26. L.J. Dumont, S. Baker, D.F. Dumont, L. Herschel, S. Waters, K. Calcagni, C. Sandford, K. Radvanski, K. Min, R.M. David, and R. Otter, *Transfusion*, **52**, 1439 (2012).
27. P. Burger, H. Korsten, A.J. Verhoeven, D. Korte, and R. Brügger, *Transfusion*, **52**, 1245 (2012).
28. R. Poon, P. Lecavalier, R. Mueller, V.E. Valli, B.G. Procter, and J. Chu, *Food Chem. Toxicol.*, **35**, 225 (1997).

AQ7

AQ1: Please confirm that all author names are OK and are set with first name first, surname last as well as the affiliations and the correspondence footnote.

AQ2: Please spell out PCB.

AQ3: Please spell out Htc. here at only mention.

AQ4: Please verify PBS is spelled out correctly.

AQ5: Please verify cities as added for Enzo Life Sciences Inc. and Endocrine Technologies.

AQ6: Please supply publisher and location for ref. 3.

AQ7: Please supply year of reference and accessed on date for refs. 18–20.

AQ8: Please confirm that given names (red) and surnames/family names (green) have been identified correctly.

Author Proof

WILEY  
Author Proof



