

cuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy. *Int. J. Pharm.*, 274:119-129 (2004).

10) Kawakami T, Isama K, Matsuoka A.: Analysis of phthalic acid diesters, monoester, and other plasticizers in polyvinyl chloride household products in Japan. *J. Environ. Sci. Health A*, 46:855-864 (2011).

11) Hayashi Y, Matsuda R, Haishima Y, Yagami T, Nakamura A.: Validation of HPLC and GC-MS systems for bisphenol-A leached from hemodialyzers on the basis of FUMI theory. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28: 421-429 (2002).

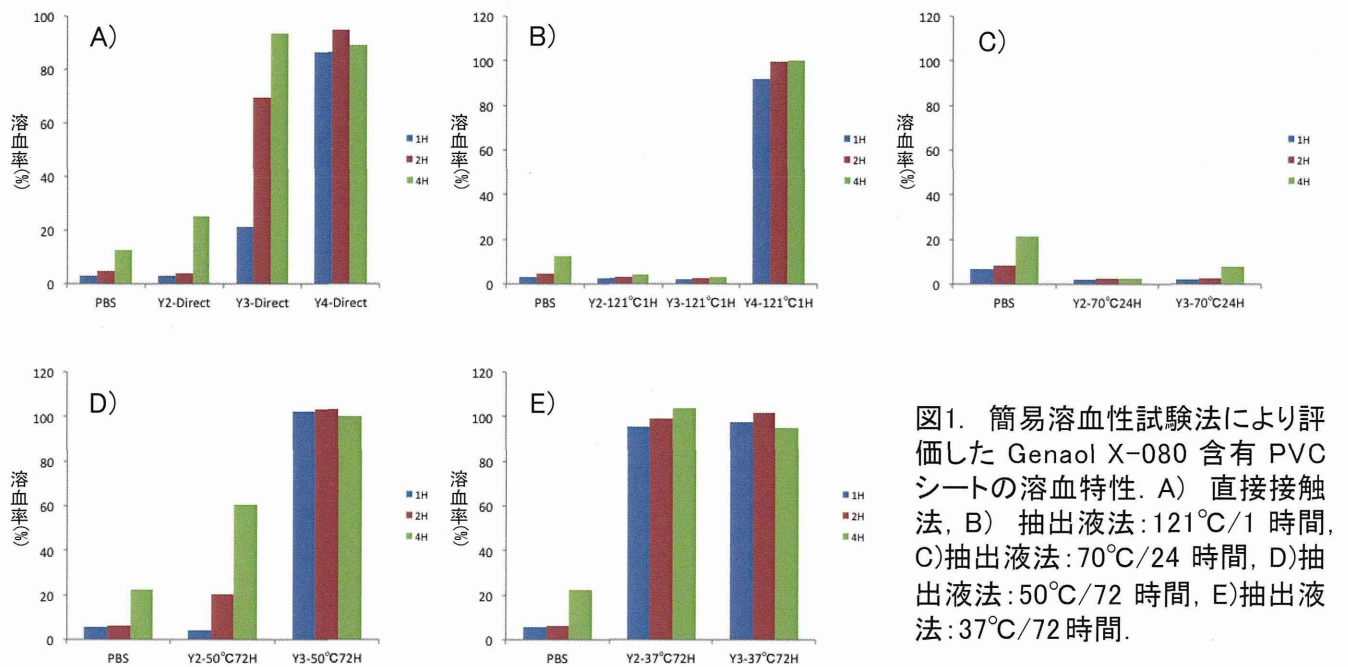


図1. 簡易溶血性試験法により評価した Genacol X-080 含有 PVC シートの溶血特性. A) 直接接触法, B) 抽出液法:121°C/1 時間, C)抽出液法:70°C/24 時間, D)抽出液法:50°C/72 時間, E)抽出液法:37°C/72 時間.

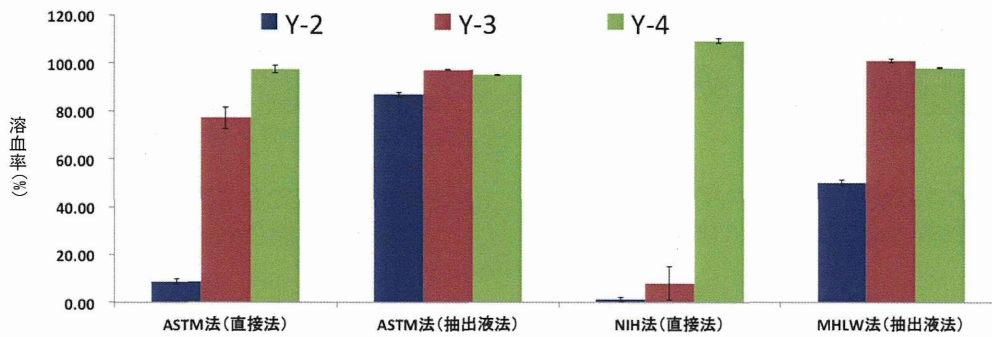


図2. 公定法により評価した Genacol X-080 含有 PVC シートの溶血特性.

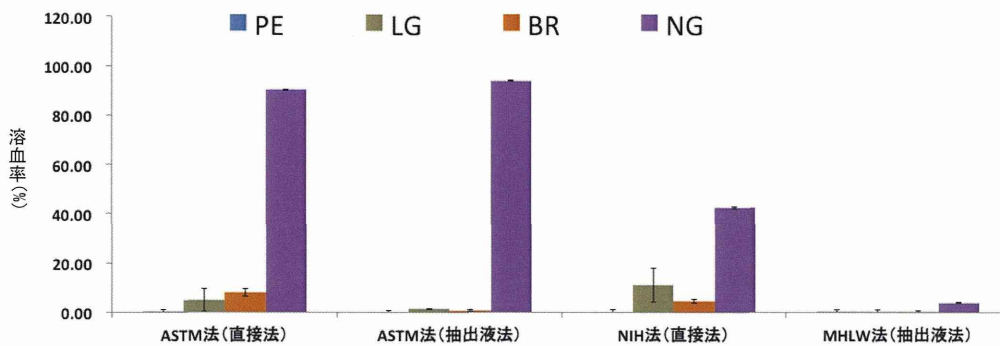


図3. 公定法により評価したラウンドロビンテスト用標準品の溶血特性.

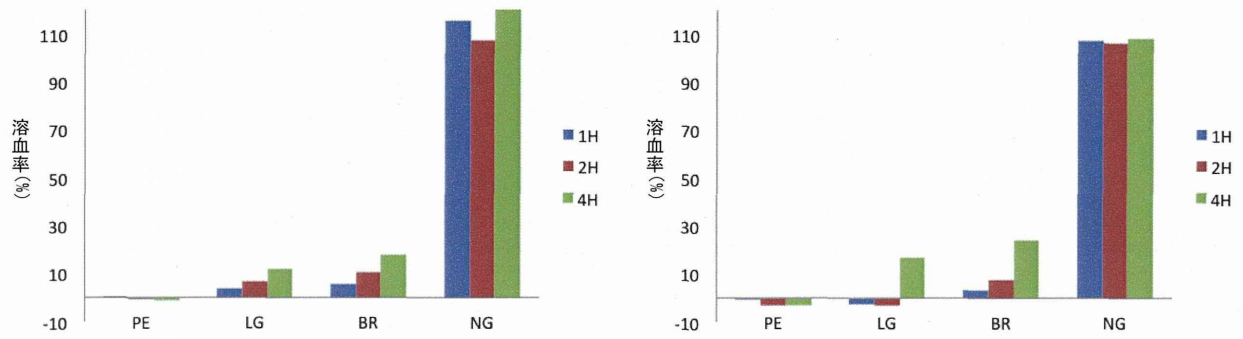


図4. 簡易溶血性試験法により評価したラウンドロビテスト用標準品の溶血特性. A) 直接接触法, B) 抽出液法(37°C/72時間).

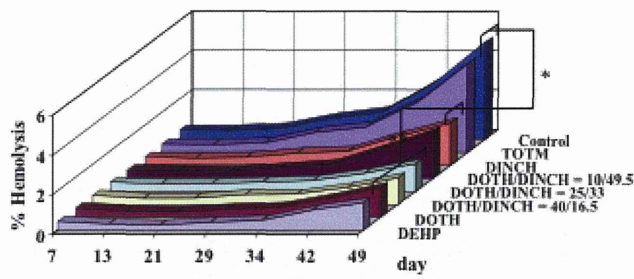


図5. MAP/RCCに対する各種PVCシートの溶血抑制能(* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

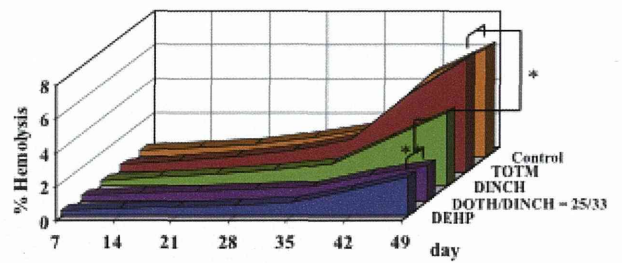


図6. SAGM/RCCに対する各種PVCシートの溶血抑制能(* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$).

表1. 非イオン性界面活性剤 Genapol X-080 含有 PVC シート組成

材料	略号	Y-1		Y-2		Y-3		Y-4	
		PHR	重量 (g)	PHR	重量 (g)	PHR	重量 (g)	PHR	重量 (g)
塩ビレジン	PVC	100	3500	100	3500	100	3500	100	3500
可塑剤	DEHP	55	1925	55	1925	55	1925	55	1925
	ESBO	8	280	8	280	8	280	8	280
安定剤	Ca-St	0.05	1.75	0.05	1.75	0.05	1.75	0.05	1.75
	Zn-St	0.05	1.75	0.05	1.75	0.05	1.75	0.05	1.75
溶血剤	Genapol X-080	0	0	1	35	1.5	52.5	10	350

表2. 公定法及び簡易溶血性試験法の諸条件

Item	ASTM	NIH	MHLW	Simple method
Blood type	Anticoagulated blood	Anticoagulated blood	Defibrinated blood	Anticoagulated blood
Anticoagulant	Sodium citrate	Sodium citrate	-	Alsever's solution
Species	Rabbit	Rabbit	Rabbit	Rabbit
Drawing blood	+	+	+	-
Washing of RBCs	-	-	-	+
Adjustment of blood concentration	10 mg Hb/mL	Adjusted ABS* 0.98 to 1.00	-	-
Contact ratio of sample and blood	Extraction method	PBS extract 7 mL / blood 1 mL	not tested	Saline extract 10 mL / blood 0.2 mL
	Direct contact method	Sample 60 cm ² / PBS 7 mL / blood 1 mL	Sample 5 g / saline 10 mL / blood 0.2 mL	not tested
Incubation time	3 h	1 h ± 5 min	4 h	1,2,4 h
Use of Drabkin reagent	+	+	+	-
Measurement wavelength	540 nm	545 nm	540 nm	415 nm
Mixing during extraction	60 rpm	-	-	-
Mixing during hemolysis testing	invert each tube twice every 30 min	-	-	-

*ABS, absorbance.

表3. GC-MS/MS 分析条件

Chemicals	Retention time (min)	Q ₁ [m/z]	Q ₂ [m/z]	Collision energy (V)	LOD ^a (ng/mL)	LOQ ^a (ng/mL)	MAP		SAGM	
							Recovery ^b (%)	CV (%)	Recovery ^b (%)	CV (%)
DOTH	14.34	170	124	7	0.0079	0.026	85	1.6	84	2.1
DEHP	14.54	167	149	4	0.031	0.10	93	0.98	94	1.9
DINCH	14.60-16.60	155	109	5	0.77	2.6	92	3.4	96	2.8
TOTM	20.97	193	165	14	0.088	0.29	119	4.7	123	2.3
DEHP-d ₄ ^c	14.53	171	153	4						

^a Calculated by TOCO version 2.0 (FUMI theory). The values correspond to the concentration in the injected solution.

^b Adding every chemical to the blood sample (2 µg/mL, n=5).

^c Internal standard.

表4. PVCシートからの可塑剤溶出挙動 (MAP/RCC, µg/mL)

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 ^{a)}	nd	tr ^{b)}	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	6.58±0.21	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
DOTH/DINCH (10:49.5)	4.51±0.21	3.28±0.01	tr	6.99±0.35	5.48±0.24	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	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	28.0±0.94	6.65±0.48	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	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	57.9±1.64	4.53±0.14	tr	58.3±4.87	4.71±0.38	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	82.0±2.89	nd	tr	95.0±5.69	nd	tr	101±1.03	nd	tr	114±0.98	nd	tr
DEHP (55)	nd	nd	16.0±1.41	nd	nd	27.0±1.41	nd	nd	32.0±7.07	nd	nd	36.5±2.12	nd	nd	37.0±7.07	nd	nd	38.5±3.54	nd	nd	50.5±3.54

a) nd, not detected. b) tr, trace amount less than LOQ

表5. DOTH/DINCH 溶出比の経時変化 (MAP/RCC)

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

表7. バックグラウンドの経時変化 (415 nm)

試験法	インキュベーション時間 (O.D.)		
	1時間	2時間	4時間
簡易溶血性試験法	0.295	0.465	0.778
ASTM法	0.246	0.432	0.887
NIH法	0.491	0.615	1.044
MHLW法	0.232	0.290	0.318

表6. PVCシートからの可塑剤溶出挙動 (MAP/RCC, µg/mL)

PVC sheet (parts)	7 days			14 days			21 days			28 days			35 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 ^{a)}	nd	tr ^{b)}	nd	nd	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr	nd	nd	tr
DINCH (60.5)	nd	1.15±0.02	tr	nd	2.64±0.10	tr	nd	4.23±0.21	tr	nd	4.72±1.04	tr	nd	5.22±0.23	tr	nd	6.83±0.09	tr	nd	7.71±0.25	tr
DOTH/DINCH (25:33)	4.98±1.04	0.87±0.19	tr	11.1±1.51	1.97±0.36	tr	16.0±2.78	3.37±0.66	tr	15.0±2.85	3.57±0.96	tr	18.4±1.39	4.11±0.47	tr	15.8±1.95	4.16±0.75	tr	19.2±1.81	5.14±0.22	tr
DEHP (55)	nd	nd	8.19±0.04	nd	nd	15.5±0.27	nd	nd	20.0±1.36	nd	nd	19.4±0.57	nd	nd	24.4±1.56	nd	nd	19.8±1.47	nd	nd	21.6±0.26

a) nd, not detected. b) tr, trace amount less than LOQ

I. 委託業務成果報告（業務項目）

分担研究報告書②

可塑剤の炎症誘導能評価法の確立とその機序の解析に関する研究

鄭 雄一（東京大学大学院工学系研究科）

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

担当研究課題 プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法 2 種の開発

担当責任者 東京大学大学院工学系研究科 教授 鄭 雄一
可塑剤の炎症誘導能評価法の確立とその機序の解析に関する研究

研究要旨： 各種可塑剤を血清中に分散して新鮮ヒト血液と共培養することで、ヒト細胞に対する IL-6 産生誘導能を指標として炎症誘導能を高精度に評価できることを確認した。本評価法を用いて陰性対照のコーン油と比較した結果、DEHP をはじめ複数の可塑剤で炎症誘導能が認められた。特に DEHP、TOTM では DEHP よりも高い炎症誘導能が観察された。また、ATBC では炎症抑制作用を有する可能性が示された。

研究協力者

藤澤彩乃 東京大学大学院工学系研究科・特任研究員

A. 目的

ポリ塩化ビニル (PVC) の代表的可塑剤である Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) については、齧歯類を用いた毒性試験において生殖毒性、肝毒性の報告がある(1, 2)。特に生殖毒性については齧歯類特有の代謝酵素に起因することが明らかになっているが(3)、欧米においてはこうした報告を受け、特に新生児や妊婦用医療機器、あるいは玩具や育児用品への DEHP の使用を規制していた(4-6)。本邦でも同様に食品衛生領域では規制が行われているが(7, 8)、DEHP が溶血阻止作用を有するために(9)血液接触型プラスチック製医療機器に限定して DEHP の使用を継続している。

一方で、DEHP は炎症誘導性化学物質であるとも報告されている(10)。血液接触型医療機器を慢性的に用いる透析においては透析熱と呼ばれる不明熱の発生が知られており、日米において医療機器からの DEHP 溶出が確認されている

ことから(4, 11)、DEHP は透析熱の原因物質の候補と言える。

現行の医療機器生物学的安全性試験において、上記毒性に関連する項目は①細胞毒性試験、②発熱性物質試験、③血液適合性試験の3項目である。①細胞毒性試験は細胞の生死を判定する試験法であり、②血液適合性試験では白血球分画の試験項目は示されていない。③発熱性物質試験においては体温調節機能を有する個体における、全身的な試験法が提示されており、透析患者のような基礎疾患を有する患者での発熱性を正當に評価するには正確性が不足していると考えられる。

以上のことから、本分担研究では細胞レベルでの炎症誘導能評価法を確立し、同時にその機序を解析することで有効な代替可塑剤の要件を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 材料

本実験の被験可塑剤として、DEHP, Diisodecyl phthalate (DIDP), Di(2-ethylhexyl)tere-

phthalate (DEHP), di(2-ethylhexyl)-1,2,3,6-tetrahydro-phthalate (DOTP), Hexamoll® (DINCH), Tris-(2-ethylhexyl)-trimellitate (TOTM), Acetyl tri-n-butyl citrate (ATBC), Di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA), 新規可塑剤 (DL9TH) の9種類を使用した。また、群内陰性対照としてコーン油とエポキシ化大豆油 (ESBO) を用いた。上記サンプルは脂溶性であるため、培養に添加するための溶媒としてウシ胎児血清を用いた。血液の IL-6 産生能を確認するための陽性対照としてはエンドトキシン標準品を用いた。

2. ヒト新鮮血との共培養

9種類の可塑剤に2種類の群内陰性対照を加えた11種類について、血清中に2.5 mg/mLになるよう振とうあるいは超音波を用いて分散させたものをさらに血清を用いて希釈列を作製してサンプルとした。エンドトキシン標準品は培養培地を用いて希釈列を作製し、サンプルとした。可塑剤群あるいはエンドトキシンそれぞれの陰性対照として、血清と培養培地をそれぞれ用いた。

上記サンプル1容量に対し、ヘパリン処理済ヒト新鮮血1容量、培養培地8容量を加え、多穴プレート内に分注して摂氏37度で24時間培養した。プレート内容を遠心分離し、培養上清はIL-6濃度測定まで凍結保存した。

3. ヒト IL-6 濃度測定

培養上清サンプルを用い、炎症カスケードの入り口としてIL-6濃度を測定した。測定にはELISAキットを用い、手順はメーカーの手順書に従った。検量線から培養液中濃度を計算したものを結果とした。

<倫理面への配慮>

本研究では、国立医薬品食品衛生研究所の倫理審査に基づき、国立医薬品食品衛生研究所に所属する共同研究者から採取した血液を試料として使用した。同研究者は本研究課題において同一グループかつグループ代表者であり、採取血液を本研究に使用することに関して了承済みであった(申請188-5及び188-6)。採血に伴う危険、環境や実験従事者への感染危険については、医師の判断のもとに実験を行うこと、関連規約を遵守することにより回避した。感染性を有する試料の取り扱いは一切国立医薬品食品衛生研究所内で行った。

C. 結果

9種類の可塑剤およびコーン油、ESBOを分散した血清、陽性対照、陰性対照をヒト新鮮血液と共培養し、遠心分離によって得た上清中のhuman IL-6濃度をELISA法にて測定した。図中a, bおよびc, dはそれぞれ代表的な実験回のデータであり、eに示すようにエンドトキシンへの反応性はほぼ同程度であるが、可塑剤への反応性は回によって異なる。本実験におけるヒト白血球の炎症反応性はエンドトキシン希釈列の添加によって確認され、濃度依存性かつ高感度の反応性が示された。

コーン油と比較すると、DEHPでは高いIL-6産生が見られた。同様の傾向はDIDP、DOTP、DINCH、DEHAでも観察された。上記5種類の可塑剤について、a, bでは濃度依存性が認められなかったが、c, dでは濃度依存性が観察された。DEHPおよびTOTMでは、DEHPよりもさらに高値のIL-6がいずれの実験回でも明らかな濃度依存性を伴って観察された。一方で、ATBCではIL-6の産生はほとんど見られなかった。コーン油と同様の陰性対照として添加したESBOでは、

DEHP などと同程度の IL-6 産生が確認された。上記の傾向は異なる実験回において再現された (図 a-d)。

D. 考察

本研究においては、血清に分散させることで脂溶性の可塑剤を *in vitro* の培養系に適用することを可能とした。脂溶性の物質であっても、血清中の結合タンパクとの相互作用により血液中に溶出する可能性は以前より指摘される場所であり、その危険性を非動物実験によって単純化して抽出できた点において本試験法は優れた評価系と言える。

陰性対照として用いた ESBO では DEHP と同程度の炎症誘導能が見られたが、実験に使用した ESBO は単分子あるいは類分子液体でない点で他の可塑剤群とは性状が異なり、またコーン油を含めた他サンプルには観察されない可視サイズの粒子が含まれており、これを白血球が貪食した結果サイトカインが産生された可能性が高く、他の可塑剤由来の炎症反応とは性質が異なると考えられる。対象となる医療機器の性質から考えると、血液適合性試験において比較的大型の粒子を含む被験物質は、実際の使用状況と乖離するため、試験対象としては不適である。したがって、以降の検討においてはコーン油のみを陰性対照とすることが妥当であり、特に ESBO を検討に用いる必要性はないと考えられる。

DEHP においてコーン油よりも高い IL-6 値が観察されたことは、従来の報告と一致するため、ヒト細胞を使用した IL-6 産生誘導試験は従来の炎症誘導能の評価と同様の結果をもたらす系として有用である。

本試験法での測定結果より、DIDP、DOTP、DINCH、DEHA はコーン油と比較すると明らかに高い

IL-6 濃度を示しており、いずれも DEHP と同程度の炎症誘導能があることが示唆された。これらのサンプルの図中 a, b の例では明らかな濃度依存性は見えづらいが、全く同じ手順による図中 c, d では上記の可塑剤においても明確な濃度依存性が認められていることから、a, b では高濃度域において培養期間中に可塑剤の分散が解除され、培養液中における濃度が低下した可能性が排除できない。ゆえに、これらの可塑剤について危険性を過少に評価することは控えるべきと考えられる。

DEHTP、TOTM は上記 5 種類よりも高値の IL-6 産生を誘導し、なおかつ濃度依存性も明らかであった。したがって、DEHTP と TOTM は、DEHP を上回る高炎症誘導性物質の可能性が高い。特に TOTM については DEHP の代替可塑剤として利用が拡大しているため、使用にあたって炎症誘導性に着目した検討を要する。

ATBC は陰性対照のコーン油と同等以下の IL-6 産生であり、実質的に IL-6 産生はほとんど行われていないと考えられ、比較的安全な可塑剤と言える。ともに低値域で測定されたために本試験法においてコーン油と ATBC を比較することは現実的ではないが、炎症抑制作用を有する可能性を有し、透析患者の不明熱の原因が究明されていない現状において、打開策となりうる物質と言える。

次年度においては上記に記した特徴的な炎症誘導能を示した可塑剤について、IL-6 産生に至るシグナル伝達の作用メカニズムを解析する予定である。

E. 結論

ヒト細胞に対する IL-6 産生誘導能は各種可塑剤の炎症誘導能評価法の指標となりうる。炎症誘導性の可塑剤として、DEHTP、TOTM が挙げ

られ、使用にあたって注意喚起を要する可能性がある。一方、ATBCは低炎症誘導性の可塑剤として今後代替可塑剤としての使用が期待できる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表等

G-1 論文発表等

1) Haishima Y, Kawakami T, Fukui C, Tanoue A, Yuba T, Ozono S, Kumada H, Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Fujisawa A, Yamasaki K, Nomura Y, Isama K, Chung UI, Ogawa K, Niimi S, Yoshida M.: Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers. *J. Vinyl Add. Technol.*, 2015, in press.

G-2 学会発表等

1) 齋島由二, 福井千恵, 山崎佳世, 野村祐介, 小園知, 熊田秀文, 藤澤彩乃, 井上 薫, 森川朋美, 市村亮平, 前田 潤, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑: 新規血液バッグ用代替可塑剤 DOTH のラット亜慢性毒性試験. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会(2014. 11, 船堀).

2) 齋島由二, 福井千恵, 野村祐介, 藤澤彩乃, 山崎佳世, 熊田秀文, 井上 薫, 森川朋美, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 宮崎謙一, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑: PVC 製血液バッグに適用可能な新規可塑剤 NJC-NP の毒性評価. 日本薬学会第 135 年会(2015. 3, 神戸).

G-3 報道発表等

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

I. 参考文献

- 1) NIH Publication No. 06-4476: NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) (2006)
- 2) FDA Public Health Notification: PVC Devices Containing the Plasticizer DEHP (2002)
- 3) D. Parmar, SP. Srivastava, GB. Singh and PK. Seth, *Vet Hum Toxicology*, 37:310-3 (1995)
- 4) FDA: Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices (2002)
- 5) EU Directive 2005/84/EC (2005)
- 6) US CPSC Improvement Act (2008)
- 7) 平成 22 年厚生労働省告示第 336 号
- 8) 平成 14 年厚生労働省告示第 267 号
- 9) P. Arun, NKG. Padmakumaran, V. Manojkumar, KV. Deepadevi, LR. Lakshmi and PA. Kurup, *Vox Sang*, 76:220-5 (1999)
- 10) T. Gourlay, I. Samartzis, D. Stefanou and K. Taylor, *Artif Organs*, 27:256-60 (2003)
- 11) 平成 14 年厚生労働省告示第 182 号

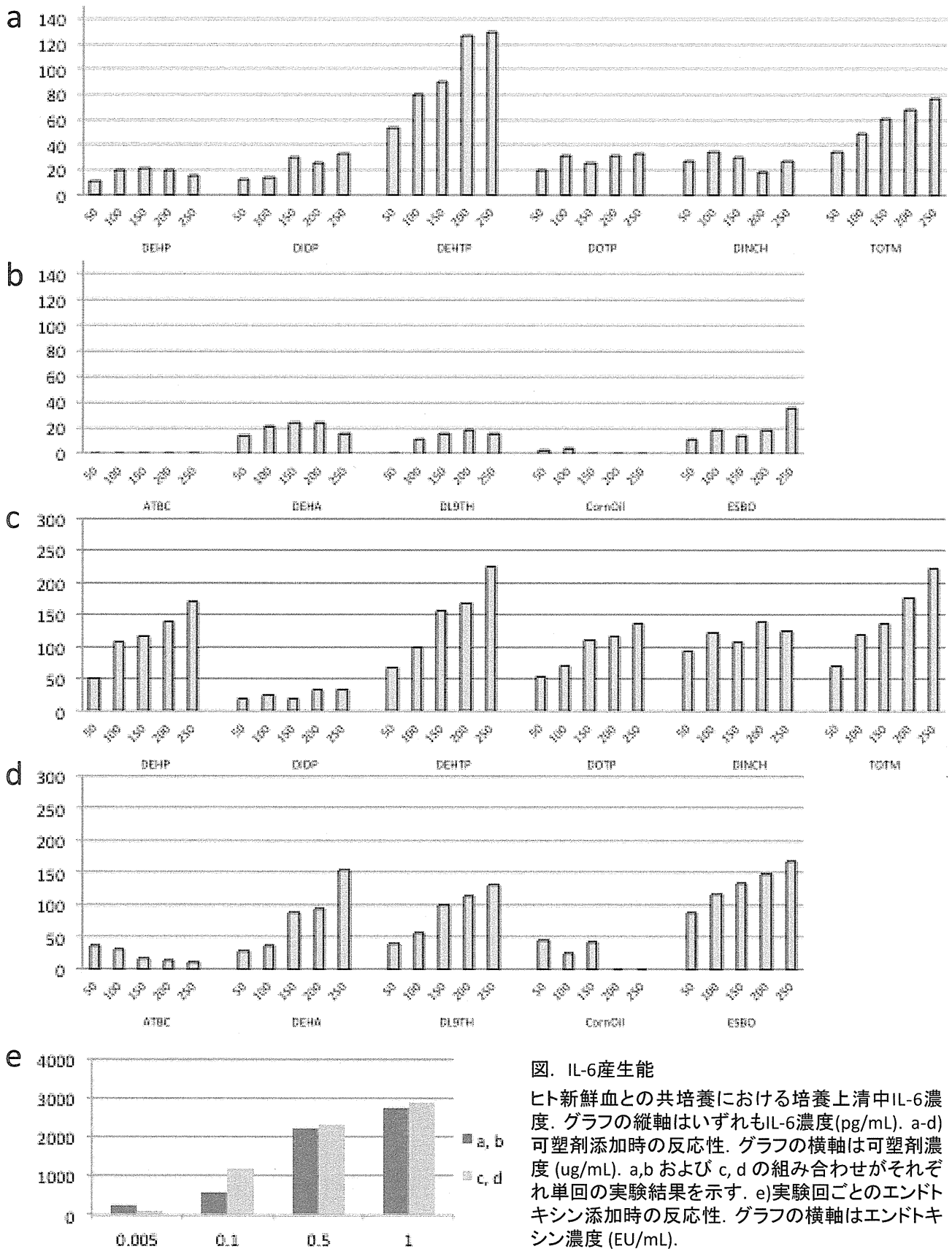


図. IL-6産生能
 ヒト新鮮血との共培養における培養上清中IL-6濃度。グラフの縦軸はいずれもIL-6濃度(pg/mL)。a-d) 可塑剤添加時の反応性。グラフの横軸は可塑剤濃度(ug/mL)。a,b および c, d の組み合わせがそれぞれ単回の実験結果を示す。e) 実験回ごとのエンドキシン添加時の反応性。グラフの横軸はエンドキシン濃度(EU/mL)。

I. 委託業務成果報告（業務項目）

分担研究報告書③

新規可塑剤を配合した溶血性試験用評価材料の開発に関する研究

柚場 俊康（川澄化学工業株式会社）

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法2種の開発

担当責任者 川澄化学工業株式会社 研究開発部研究開発三課長 柚場俊康
新規可塑剤を配合した溶血性試験用評価材料の開発に関する研究

研究要旨：溶血性試験法の陽性対照材料となるポリ塩化ビニル（PVC）シートの作製および、溶血抑制能を有する代替可塑剤含有 PVC シートの作製を実施した。陽性対照材料は、ハサミ等で裁断が容易であり取扱いが簡便な軟質 PVC を基材とし、溶血を惹起する非イオン系界面活性剤 Genapol® X-080 を 1 パーツ、1.5 パーツ、10 パーツの含有量に振り分けて混練、成形した。完成した Genapol® X-080 含有 PVC シートはハサミで任意のサイズに調整可能であり、陽性対照材料として使用しやすい検体に仕上がった。溶血抑制能を有する代替可塑剤含有 PVC シートは血液バッグへの用途展開を想定し、既存の血液バッグと同等の柔軟性になる様に各可塑剤の添加量を調整の上、試作を行った。多様な可塑剤を用い、いずれも製品の製造方法と同じ T ダイ成型によってシート成型を行い、目的とする柔軟性に設計することに成功した。

研究協力者

向井智和 研究開発二課・課長

清麻里子 研究開発二課・課員

となり、開発を迅速化させることができる。

A. 研究目的

国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部が研究を進めている、家兎及び青酸化合物を用いることなく、高感度に溶血性を評価する簡易試験系を構築するために、溶血性試験法の陽性対照材料及び代替可塑剤を配合した PVC シートを作製し、提供する。

代替可塑剤を利用した血液バッグの開発は世界的に進められており、我々も早急に国産の新規製品を開発し、患者の安全性と国際市場でのシェアを確保する必要がある。

本簡易試験方が構築されれば、本手法を用いて代替可塑剤を用いた新たな血液バッグ材料の溶血抑制特性を簡易に評価することが可能

B. 研究方法

1. 溶血性試験法の陽性対照材料の作製

陽性対照として用いる試験片には、1)滅菌可能であること、2)任意のサイズに容易に調整できること、3)輸送・保存しやすい形状・寸法であることといった特性が求められる。

そこで我々は、軟質 PVC シートを基材とし、溶血を惹起する非イオン系界面活性剤 Genapol® X-080 を複数の濃度に振り分けて混練し、シート状に成型加工した。

陽性対照材料の処方表は表 1 の通りとした。Genapol® X-080 を基材に均一に分散させるため、コンパウンディングにあたっては、まず、規定の Genapol® X-080 を可塑剤（DEHP）に滴下し、十分に攪拌した。その後、PVC レジンに安定剤、滑材、可塑剤を配合し、ヘンシェルミキサーに

より十分にコンパウンディングした。

シート成型にあたり、多様な成型加工方法を検討したが、材料への熱履歴を最小限に抑える為、180℃のヒートプレス法を選択し、シート形状に加工した。材料表面が荒れない様、プレス金型と材料の間にはフッ素樹脂シートを介した。

以上により、溶血性試験法の陽性対照材料シートを作製した。

2. 代替可塑剤を配合した PVC シートの作製

川澄化学工業株式会社が製造販売する血液バッグを設計の基礎とし、当該製品と同等の柔軟性を有する代替可塑剤を配合した PVC シートの作製を試みた。

血液バッグに用いる PVC シートに要求される特性として、1)滅菌可能であること、2)柔軟かつ、一定の強度を有すること、3)安全であること、4)赤血球保存時に溶血を抑制できること、5)新鮮凍結血漿保存時に凍結破損しにくいことなどが挙げられる。

上記を満たす可塑剤として藪島らの研究により、ジ (2-エチルヘキシル) -1, 2, 3, 6-テトラヒドロフタレート (DOTH) およびジイソノニル-1-シクロヘキサン-1, 2-ジカルボキシレート (DINCH) の混合可塑剤が有用であることが見出されている。

そこで我々は、DOTH および DINCH の混合比率を複数振り分けた可塑剤含有軟質 PVC シートを作製した。また、溶血抑制能を有さない陰性コントロール材料として、TOTM を可塑剤に用いたシートと、現在市場で主に使用されており、溶血抑制能を有する陽性コントロール材料として、DEHP を可塑剤に用いたシートも作製した。各処方における可塑剤の配合量は、川澄化学工業株式会社が製造販売する血液バッグの柔軟

性と同等になる様、各可塑剤の可塑化効率（可塑剤メーカーからの開示データ）を基に理論値で算出した。その結果、代替可塑剤を配合した PVC シートの処方表 2 の通りとした。

シートの成形加工方法は、血液バッグ製品と同じ成型加工方法である T ダイ成型法を選択した。

PVC レジンに安定剤、滑材、可塑剤を配合し、ヘンシェルミキサーにより十分にコンパウンディングした。その後、ペレタイジングを行い、T ダイ成型によってシート形状に加工した。

以上により、代替可塑剤を配合した PVC シートを作製した。

<倫理面への配慮>

利益相反に該当しないように留意し、研究に取り組んだ（国立医薬品食品衛生研究所の COI 委員会にて審査済み）。

C. 結果および考察

1. 溶血性試験法の陽性対照材料の作製

ヒートプレス法により、フィッシュアイや表面の荒れが無いシートを得ることができた。本シートは 121℃/20 分のオートクレーブ滅菌に耐えることができ、ハサミによって任意のサイズに容易に調整することができた。

本シートを国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部に提供し、溶血性試験法の陽性対照材料として評価して頂いた。

2. 代替可塑剤を配合した PVC シートの作製

T ダイ成型法により、目的とする T ダイシートロールを得ることができた。本シートは 121℃/20 分のオートクレーブ滅菌に耐えることができた。その柔軟性を室温での 5%弾性率により評価した結果、いずれも 14N/mm² 前後であ

り、川澄化学工業株式会社が製造販売する血液バッグと同様の柔軟性であった。

本シートを国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部に提供し、血液中への可塑剤溶出量および溶血抑制能の評価対象として頂いた。

D. 結論

溶血性試験法の陽性対照材料として、非イオン系界面活性剤 Genapol® X-080 を含有する軟質 PVC シートを作製し、国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部に提供した。

また、代替可塑剤を配合した PVC シートとして、DOTH および DINCH の混合比率を複数振り分けた可塑剤含有軟質 PVC シートを作製し、国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部に提供した。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表等

論文発表等

1) Haishima Y, Kawakami T, Fukui C, Tanoue A, Yuba T, Ozono S, Kumada H, Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Fujisawa A, Yamasaki K, Nomura Y, Isama K, Chung U, Ogawa K, Niimi S, Yoshida M.: Characterization of alternative plasticizers in polyvinyl chloride sheets for blood containers. *J. Vinyl Add. Technol.*, 2015, in press.

学会発表等

1) 藪島由二, 福井千恵, 山崎佳世, 野村祐介, 小園 知, 熊田秀文, 藤澤彩乃, 井上 薫, 森

川朋美, 市村亮平, 前田 潤, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑: 新規血液バッグ用代替可塑剤 DOTH のラット亜慢性毒性試験. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014. 11, 船堀).

2) 藪島由二, 河上強志, 福井千恵, 田上昭人, 柚場俊康, 向井智和, 野村祐介, 伊佐間和郎, 新見伸吾: 新規血液バッグ素材 DOTH/DINCH 配合 PVC シートの性能評価. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014. 11, 船堀).

3) 野村祐介, 福井千恵, 柚場俊康, 新藤智子, 坂口圭介, 谷川隆洋, 杉山知子, 竹ノ内美香, 新見伸吾, 藪島由二: 簡易溶血性試験法の性能評価と公定法との比較検証. 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014. 11, 船堀).

4) 藪島由二, 福井千恵, 野村祐介, 藤澤彩乃, 山崎佳世, 熊田秀文, 井上 薫, 森川朋美, 高橋美和, 河上強志, 伊佐間和郎, 柚場俊康, 宮崎謙一, 鄭 雄一, 小川久美子, 新見伸吾, 吉田 緑: PVC 製血液バッグに適用可能な新規可塑剤 NJC-NP の毒性評価. 日本薬学会第 135 年会 (2015. 3, 神戸).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1) 藪島由二, 福井千恵, 河上強志, 迫田秀行, 野村祐介, 伊佐間和郎, 新見伸吾, 柚場俊康, 向井智和, 清麻里子「医療用バッグ」出願番号: 特願 2015-17514、出願日: 2015 年 1 月 30 日.

表1. Genapol X-080 含有 PVC シート組成

処方名⇒		Genapol:0 PHR		Genapol:1 PHR		Genapol:1.5 PHR		Genapol:10 PHR	
材料		PHR	重量(g)	PHR	重量(g)	PHR	重量(g)	PHR	重量(g)
PVC レジン	重合度 1700	100	3500	100	3500	100	3500	100	3500
可塑剤	DEHP	55	1925	55	1925	55	1925	55	1925
	ESBO	8	280	8	280	8	280	8	280
安定剤	ステアリン酸等	適量							
滑材	シリコンオイル等								
溶血惹起剤	Genapol	0	0	1	35	1.5	52.5	10	350

表2. 代替可塑剤含有PVCシート組成

処方名⇒		DEHP (55)	TOTM (66)	DOH (55)	DOH/DINCH (40:16.5)	DOH/DINCH (25:33)	DOH/DINCH (10:49.5)	DINCH (60.5)
材料		PHR	PHR	PHR	PHR	PHR	PHR	PHR
PVC レジン	重合度 1700	100	100	100	100	100	100	100
可塑剤	ESBO	8	8	8	8	8	8	8
	DEHP	55	-	-	-	-	-	-
	TOTM	-	66	-	-	-	-	-
	DOH	-	-	55	40	25	10	-
	DINCH	-	-	-	16.5	33	49.5	60.5
安定剤	ステアリン酸等	適量						
滑材	シリコンオイル等							

I. 委託業務成果報告（業務項目）

分担研究報告書④

可塑剤の溶出挙動と評価結果との相関に関する研究

坂口 圭介（テルモ株式会社）

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 プラスチック製医療機器の化学物質影響評価法 2 種の開発

担当責任者 テルモ株式会社 研究開発本部主席研究員 坂口圭介

可塑剤の溶出挙動と評価結果との相関に関する研究

研究要旨： ジエチルヘキシルフタレート（DEHP）は毒性学的見地から、現在その使用は厳しく規制されている。DEHP 曝露の点で最もリスクの高い医療行為の一つとして、2002 年米国 FDA は ECMO（Extracorporeal membrane oxygenation）を挙げ、警告した。近年、代替可塑剤による置き換えが進み、その一つトリメリット酸トリオクチル（TOTM）が PVC 製医療機器に汎用されるようになってきている。本研究では TOTM を使用した PVC 製の血液回路チューブからの溶出量測定を実施し、人体曝露量を算出した。その量は毒性試験から求めた摂取許容値 TI を下回ることから、全身毒性の影響はないと考えられた。この材料は溶血毒性も認められず、体外循環用医療機器の可塑剤として適切な化学物質であると考えられる。

研究協力者

谷川 隆洋 テルモ/評価センター・研究員
猪俣 依子 テルモ/評価センター・研究員
小川 理恵 テルモ/評価センター
岡本 知子 テルモ/評価センター
竹ノ内美香 テルモ/評価センター

当たり、リスク&ベネフィット評価の結果、現在厳しくその使用が規制されている。DEHP 曝露の点で最もリスクが高い医療行為として、米国 FDA（2002）¹⁾は新生児における血漿交換療法と ECMO（Extracorporeal membrane oxygenation 人工肺とポンプを用いた体外循環回路による治療）が摂取許容値 TI を大きく超える危険性のあることを警告し、DEHP 代替を訴えた。

A. 研究目的

塩化ビニル樹脂（PVC）製医療機器の生物学的安全性は PVC に用いられる可塑剤に左右されると考えられる。従来広く使用されてきたジエチルヘキシルフタレート（DEHP）は、1970 年代より毒性学的見地から多くの研究がおこなわれ、げっ歯類の肝臓に及ぼす影響などその特徴的な多くの毒性作用が知られている。この化学物質には可塑剤として優れた性質や、赤血球の保護作用など医療用途として有益な性質が見いだされていたが、近年、低用量で発現する生殖発生毒性や精子形成に関する毒性に焦点が

本研究では、PVC 製医療機器における可塑剤曝露の最も大きい治療行為となる体外循環に焦点を当て、近年、汎用医療機器に広く使用されている代替可塑剤：トリメリット酸トリオクチル（TOTM）を使用した PVC 血液回路からの溶出量測定を試み、この素材の安全性と血液適合性を評価した。

B. 研究方法

1. TOTM 溶出量の測定

被験物質には表 1 に示す体外循環回路用の

PVC 製チューブを使用した。IS03826-1²⁾、JIST3217 : 2011³⁾を参考に充填抽出を行い、その抽出液中の TOTM 濃度を LC/MS により定量した。以下、詳述する。

IS03826-1 及び JIS T3217 に従い、抽出溶媒には、水/エタノール混液（密度：0.9373～0.9378）を用いた。抽出操作は以下の通りに実施した。

- ①サンプルを約17 cmに切断し、片端を鉗子で封じた。次いで、そのチューブに抽出溶媒（あらかじめ37℃に温めておく）を15 cm分充填し、鉗子で封じた。これを各サンプル3本ずつ準備した。
- ②37℃±1℃恒温槽に検体を入れ、37℃で60±1分、6時間、及び24時間の抽出を行った。
- ③抽出終了後、恒温槽からサンプルを取り出し、10回転倒混和した。充填液を全て回収し、抽出液とした。

定量は以下の通り実施した。

TOTM 約100 mg を精密に量り、THFを加えて正確に100 mLとし、TOTM標準原液とした。TOTM標準原液を正確に量り、THFを加えて、標準溶液（濃度1～100 μg/mL）を調整した。抽出液をそのまま試料溶液とし、試料溶液及び標準溶液10 μLにつき、次の条件でLC/MS分析により試験を行い、TOTM (m/z=547) のピーク面積を求め、標準溶液の検量線からTOTM濃度を算出した。LC/MS分析条件は以下の通りである。

- ・カラム：Waters, Cymmetry C18 (4.6 mm I.D.×250 mm. Particle size 5 μm)
- ・カラム温度：40 °C (40 °C付近の一定温度)
- ・移動相 A：アセトニトリル：水=9：1
- ・移動相 B：THF

- ・タイムプログラム：10 %B (0.01分) →40 %B (15分) →10 %B (15.1分) →STOP (25分)
- ・流量：2.0 mL/min
- ・注入量：10 μL
- ・MS条件：表2の通り

2. TOTM-PVC の血液適合性試験

本検討の被験物質には表3に示す体外循環回路用のPVC製チューブを使用した。血液適合性評価として溶血性試験法：ASTM F 756-08⁴⁾を用いた。

<倫理面への配慮>

溶血毒性試験に用いるウサギ血液の採取及び使用にあたっては、テルモ株式会社動物実験委員会（公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・動物実験実施施設認証センター認定番号：12-030）に計画書を提出して審査を受けた。

C. 結果

1. TOTM 溶出量の測定

体外循環用血液回路用 PVC チューブからのTOTM溶出量を図1に示した。径の小さなチューブ（φ6 mm）に比し、径の大きいチューブ（φ12 mm）のほうが平衡に達する時間が長くなる傾向があるが、インキュベーション6時間でほぼ平衡に達することが確認された。またPVC中の可塑剤含量（78及び85パーセント）の差は抽出量に大きく影響を及ぼさなかった。本実験の結果、TOTMの24時間溶出量（チューブ表面積あたりの溶出量）は最大1.45 μg/cm²と求められた。別途、成人用体外循環用血液回路のPVCチューブ表面積の情報を得て、その数値（10839 cm²）から人体曝露量は0.26 mg/kg/dayと算出された。

2. TOTM-PVC の血液適合性試験

ASTM 法による溶血毒性試験の結果を表 4 に示した。いずれの被験物質にも溶血毒性は認められなかった。

D. 考察

日比谷ら (2006)⁵⁾は体外循環用血液回路からの可塑剤溶出を測定するために、血液回路チューブに 5mL の牛血清を封入し、37°C 下で抽出を行った。6 時間後には $0.39 \pm 0.18 \mu\text{g/mL}$ に上昇した報告し、DEHP-PVC の DEHP 溶出量の約 1/100~1/200 であると報告している。同様に Miyamoto ら (1988)⁶⁾も血液バッグでの保存において TOTM 溶出は DEHP の約 1/100 であることを報告している。本研究においては可塑剤溶出量測定 of 標準化を勘案し、血液バッグの DEHP 量測定を規定する ISO 3826-1 を参考にし、抽出溶媒にエタノール/水混液 (密度: 0.9373~0.9378) を用いた。この溶媒は前述の日比谷らの報告と同様に、溶出量は 6 時間目で平衡に達したが、約 10 倍高い濃度を示した。リスク分析においては、より厳しく安全性を評価できる実験系であると言える。

血液回路から TOTM の人体曝露は血液を介して行われるため、静脈内投与による毒性試験結果が重要な判断材料となる。しかしこの化学物質は水系溶媒に難溶のため、静脈内投与による毒性データはほとんど見当たらない。その中で橋本ら (2003)⁷⁾と伊藤ら (2003)⁸⁾は脂肪乳剤に TOTM を乳化し、静脈内投与可能な投与液を調製し、SD 系ラットによる毒性試験を行っている。これらの毒性試験の結果、彼らは無毒性量 (NOAEL) を 32mg/kg と報告している。

医療機器から溶出される化学物質の摂取許容値に関する世界標準的な考え方は、ISO 10993-17 に示されており、摂取許容値 TI (Tolerable Intake) を次式のように定めてい

る。

$$TI \text{ (mg/kg/day)} = \text{NOAEL or LOAEL (mg/kg/day)} / \text{Modifying Factor}$$

本研究では Modifying Factor に 100 を用いて、TOTM の TI を 0.32 mg/kg/day とし、判断基準にすることとした。本研究の結果、TOTM を可塑剤に使用した PVC 製血液回路からの TOTM 溶出量は、0.26 mg/kg/day と予測されることから TI を下回り、毒性影響は認められないものと考えられた。

TOTM を可塑剤として用いた PVC は代表的な血液適合性試験である溶血毒性試験にて評価した結果、毒性は認められなかった。

E. 結論

DEHP 代替可塑剤として TOTM を使用した PVC 製の血液回路からの溶出量測定を実施した。その人体曝露量は摂取許容値 TI を下回ることから毒性影響はないと考えられた。この材料は溶血毒性も認められず、体外循環用医療機器の可塑剤として適切な化学物質であると考えられた。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表等

学会発表等

- 1) Sakaguchi K, Saso K. : Biological Safety Evaluation for PVC Related Medical Devices and Alternative Plasticizers. 5th China International Medical Device Regulatory Forum (2014.8, Xiamen, China).
- 2) Tanigawa T. : Hemolysis Round Robin data