

# 血液回路用チューブにおける可塑剤の血液適合性

— ヒト血液における検討 —

柴田 拓志・大王 拓哉<sup>\*</sup>・小阪 湧<sup>\*</sup>・今村 祐太<sup>\*</sup>・鈴木 大貴<sup>\*</sup>・

岡本 真悟<sup>\*\*</sup>・杉山 博信<sup>\*\*</sup>・内貴 猛<sup>\*\*\*</sup>

岡山理科大学大学院工学研究科修士課程生体医工学専攻

<sup>\*</sup>岡山理科大学工学部生体医工学科

<sup>\*\*</sup>日機装株式会社 メディカル技術センター

<sup>\*\*\*</sup>岡山理科大学工学部生命医療工学科

(2017年10月26日受付、2017年12月4日受理)

## 1. 緒言

ポリ塩化ビニル樹脂 (polyvinyl chloride, 以下, PVC) は, 医用素材として柔軟性・耐久性に優れることから, 広く医療器具に用いられている<sup>1, 2)</sup>. 特に, 血液回路用チューブにおいては柔軟性, 耐久性, 信頼性の面から現在唯一選択できる素材である. PVCには柔軟性を付与するために可塑剤が添加される. PVCの可塑剤として広く使用されてきたのがDEHP (Di(2-ethylhexyl) phthalate, C24H38O4) である. しかしながら, DEHPには成長期のげっ歯類の内分泌系である精巣に毒性を示すことが近年明らかになった<sup>3)</sup>. それにともなう, TOTM (Tri-octyl trimellitate, C33H54O6) やDINCH (Di-isononyl-cyclohexane-1, 2-dicarboxylate, C26H48O4) 等の精巣毒性の危険性が少なく, 血液への溶出量が少ない<sup>4)</sup>可塑剤を使用した新しい血液回路用チューブが開発されてきた. 医用材料については生体適合性を検査する必要があるが, TOTMやDINCHを使用した血液回路用チューブについてもウサギ血液を使用して検査されている. 実際に日機装(株)ではTOTMを使用した透析用チューブの薬事申請時にウサギ血液で検討した生体適合性試験の結果を提出した. ウサギ血液は実験動物の血液の中でも凝固線溶系がヒトに近い<sup>5)</sup>ため, 血液の研究に良く使用されている<sup>6)</sup>. しかし, 例えば血液型はヒトとは異なる(H1型, H2型, H1・H2型, O型)など, 完全にヒト血液と同じではない<sup>6)</sup>. そのためヒト血液でも可塑剤の生体適合性を調べる必要があるが, ヒト血液を使用して新規可塑剤を使用した血液回路用チューブの生体適合性を調べた報告はほとんどない.

血液回路用チューブは血液と接触し, 血液中に可塑剤が溶出するため, 生体適合性の中でも血液適合性が最も重要である. 血液適合性を調べる試験については

ISO 10993-4および「薬食機発0301第20号」<sup>7)</sup>に規定されており, 溶血性試験が必須である. そして, 臨床でどのように使用されるのかを考慮して血栓形成, 血液凝固, 血小板活性, 血液学的項目, 補体活性の中から検査項目を決定する<sup>8)</sup>. 血液回路用チューブは, 血液と接触するため血液凝固反応が重要な評価項目である. そのため, 臨床で血液凝固能の指標として使用されている活性化凝固時間(ACT)を評価すれば上記の血栓形成, 血液凝固, 血小板活性の検査項目について検討できると考えた. ACTとは血液をガラスやセライト等の凝固活性剤に接触させて凝固系を人為的に活性化させた際に, 血液が凝固するまでの時間である.

ウサギ血液ではなくヒト血液を使用して新規可塑剤の生体適合性を調べた報告がほとんどないことから, 本研究ではDEHP, TOTM, DINCHを添加したヒト血液の溶血率とACTを測定し, 生理食塩液を添加した血液と比較することにより, 3種類の可塑剤の血液適合性を検討した.

## 2. 実験試料および方法

### 2-1 試料

1人の健康人より採取した血液に9通りのヘパリン濃度を投与し, ACTの値が人工心肺中の目標値である400 s<sup>9)</sup>と血液透析中の目標値である200 s<sup>10)</sup>の間である300 s程度になる1.66 U/mLの濃度をACT測定時のヘパリン濃度とした. その濃度になるようにヘパリン(持田製薬株式会社, ノボ・ヘパリン注5千単位/5 mL)を入れたシリンジに6人の健康人より血液を採取した. 一方, 溶血率を測定する血液にはどのような条件でも血栓が発生しないように十分な量のヘパリン(血中濃度は12 U/mL)を添加した. 血液については一般血液検査(白

血球数, 赤血球数, ヘモグロビン, ヘマトクリット, 末梢血液像) およびB型, C型肝炎ウイルス, ATL (成人T細胞白血病), HIV (エイズ), 梅毒への感染を検査して, いずれにおいても正常範囲からはずれていないこと, 血液提供者が特定の疾患を患っていないことを確認してから実験に使用した.

DEHP, TOTM, DINCHを1あるいは10, 50 µg/mLの濃度になるように血液中に添加した. 添加する可塑剤は微量であるため, 予め生理食塩液で希釈してから血液に添加した. コントロールの血液には同量の生理食塩液を添加した.

なお, 採血を行う本研究は岡山理科大学工学部研究倫理委員会の承認 (受付番号25-1, 26-1) を受けた上で, 被験者には実験内容について説明を行い, 書面にて同意を得て実施した.

## 2-2 溶血率測定方法

1回の採血で採取した血液を10個の試験管に1 mLずつ分け, 50 µLの生理食塩液, あるいは1, 10, 50 µg/mLの最終濃度になるようにDEHP, TOTM, DINCHを希釈した50 µLの生理食塩液を添加し, 37°Cでインキュベートした. 1, 2 h後に生理食塩液あるいは1 µg/mLの可塑剤を添加した血液から200 µLのサンプルを注出し, 下記の方法で溶血率を測定した. 4 h後には全ての血液の溶血率を測定した. 同様の測定を6回 (6人分の血液) 行い, 平均値を比較した.

「薬食機発0301第20号」[7]に規定されている方法にそって溶血率を測定した. すなわち, 3種類の可塑剤あるいは生理食塩液 (コントロール) を添加してインキュベートした血液から200 µLを抽出して10 mLの生理食塩液に添加し, 1回だけ転倒混和した. それらの溶液を750×gで5分間遠心分離した後の上清の540 nmおよび576 nmにおける吸光度を測定した. 10 mLの純水に200 µLの血液を添加して完全に溶血させた溶液の上清の吸光度についても同様に測定し, その値をポジティブコントロールとした. そして, 下記の式 (1) により, 溶血率 $H$  (%) を算出した.

$$H(\%) = \frac{T-C}{P-C} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

$T$ : 可塑剤入り血液を添加した生理食塩液の吸光度

$C$ : 0 hのコントロールの吸光度

$P$ : ポジティブコントロールの吸光度

## 2-3 ACT測定方法

ACT測定では1回の採血で採取した血液を2 mLずつに4分割してそれぞれに生理食塩液 (コントロール), あ

るいは1 µg/mLの濃度になるようにDEHP, TOTM, DINCHを添加してACTを測定した. さらに可塑剤濃度依存性を検討するために, 1回の採血で採取した血液を2 mLずつに5分割して生理食塩液 (コントロール), あるいはプロタミン (0.016 U/mL), 10 µg/mLの濃度になるようにDEHP, TOTM, DINCHを添加してACTを測定した. プロタミンはヘパリンの作用を阻害するため, ネガティブコントロールとして使用した. 同様の測定を6回 (6人分の血液) 行い, 平均値を比較した. ただし, ACTを測定する装置を1台しか所有していないため, 全てのサンプルを同時に測定することができなかった. そのため, 4種類の血液のACTを1つずつ測定したが, 全ての測定が終了するのに30分程度かかってしまい, その間に血液のACTが短くなる可能性がある. そこで, その経時変化の影響を除外するために, 実験毎に試験液を測定する順番をかえた.

ACT測定にはヘモクロン401 (Soma Tech. Inc., Bloomfield, USA) を使用した. ヘモクロン401では血液を入れたテストチューブを鉛直軸から60 deg傾けた状態で37°Cに保ちながらゆっくりとテストチューブの中心軸を中心に回転させる. テストチューブの中には磁石と凝固活性剤としてセライト粉末が予め入っている. 血液が凝固していないときには重力により磁石と血液が常に下方にあるが, 血液が凝固すると血液とその中にある磁石がテストチューブと一緒に回転し, 上方に移動する. ホールセンサによりこの磁石の移動を検出し, 血液が凝固したことを判定している.

可塑剤を希釈した20 µLの生理食塩液と2 mLの血液をテストチューブに入れ, 激しく10回程度振り, チューブ内のセライトと可塑剤, 血液を十分に混合した. テストチューブをヘモクロン401に挿入し, 手で2回時計回りに回転させ, テストチューブのふたを指でたたいた. ヘモクロン401が血液凝固を検出したらテストチューブを取り出しチューブ内の血液が確実に凝固していることを確認した. 血液をテストチューブに入れてから凝固を検出するまでの時間 (s) をACTとした.

## 2-4 統計学的検定

6人の血液を使用して測定したデータを平均値と標準偏差により表し, 溶血率におよぼすインキュベート時間と添加物の種類 (可塑剤の種類と生理食塩液), 可塑剤濃度と添加物の種類の影響の検定には繰り返しのある (対応あり) データについての二元配置分散分析を実施した. 可塑剤を血液に添加してから4 h後の溶血率の平均値間の有意差の検定には一元配置分散分析とTukey法 (多重比較) を使用した. ACTの平均値間の有意差の検定には繰り返しのある (対応あり) データについての一元配置分散分析とDunnett法 (多重比較)

を使用した。いずれの検定でも有意水準を0.05とした。

### 3. 結果

#### 3-1 溶血率

540 nmおよび576 nmにおける吸光度を測定した結果、両者はほとんど同じ結果であった。そのため、540 nmにおける吸光度の結果だけを示す。血液を生理食塩液あるいは1 µg/mLの濃度の可塑剤を添加した生理食塩液に入れてインキュベートした結果(図1)、時間の経過とともに溶血率が増加し、二元配置分散分析から、その効果は有意( $p < 0.01$ )であることがわかった。しかし、添加物の種類(可塑剤あるいは生理食塩液)による有意な影響はなかった。

4 h後の溶血率におよぼす可塑剤濃度の影響を検討した結果(図2)、DEHPとDINCHについては濃度を10、50 µg/mLにしたときの溶血率は濃度を1 µg/mLにしたときの溶血率より有意に( $p < 0.01$ あるいは $p < 0.05$ )少ないことがわかった。TOTMについては全ての濃度における溶血率の間に有意な差はなかったが、DEHPやDINCHと同様に変化する傾向があった。また4 hにおけ

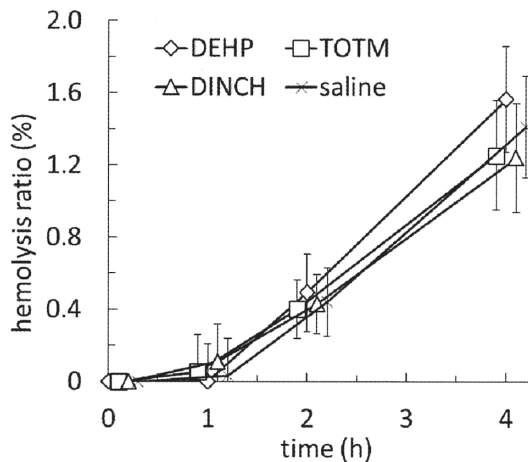


図1 3種類の可塑剤(1 µg/mL)を添加した血液の溶血率 ( $n = 6$ )

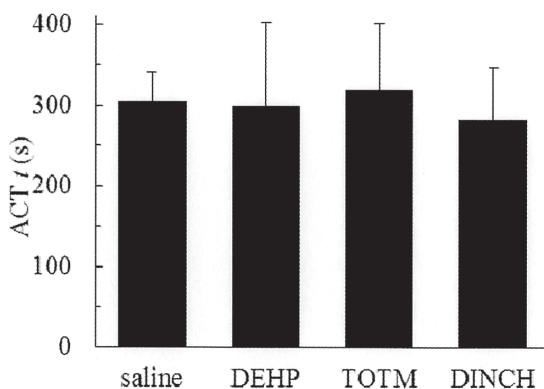


図3 3種類の可塑剤を添加した血液のACT (可塑剤濃度 1 µg/mL)

る最大の溶血率は1.6%程度(DEHP, 1 µg/mL)であることがわかった。さらに、50 µg/mLのDEHPを添加した血液以外の10、50 µg/mLの可塑剤を添加した血液の溶血率は生理食塩液を添加した血液の溶血率より有意に( $p < 0.01$ )低い値であった。

#### 3-2 ACT

濃度が1 µg/mLになるように可塑剤を血液に添加した場合には、3種類の可塑剤と生理食塩液を添加した血液のACTの間に有意差はなかった(図3)。濃度が10 µg/mLになるように可塑剤を血液に添加し、比較対象としてプロタミンを血液に添加した結果、プロタミンと3種類の可塑剤、あるいは生理食塩液を添加した血液のACTとの間に有意差があったが、可塑剤間および生理食塩液を添加した血液との間には有意差はなかった(図4)。

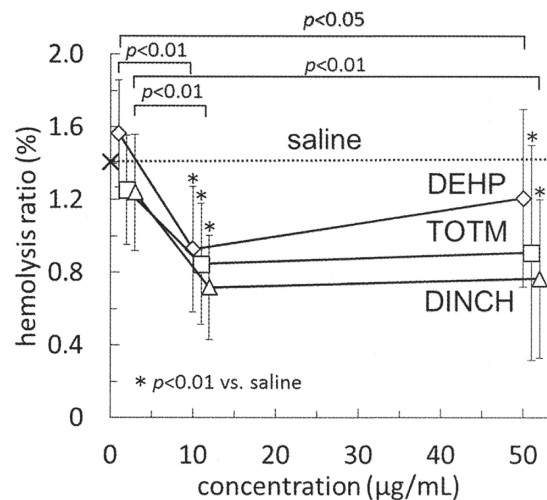


図2 4 hにおける溶血率の可塑剤濃度依存性 ( $n = 6$ )

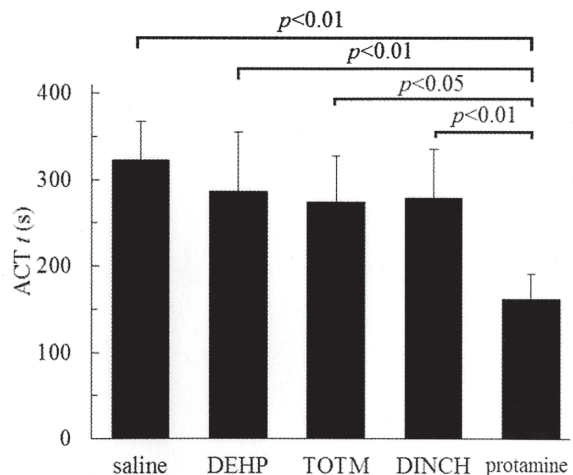


図4 3種類の可塑剤を添加した血液のACT (可塑剤濃度 10 µg/mL)

#### 4. 考察

Faouziら<sup>11)</sup>によると血液中に溶出するDEHPの一部は即座に肝臓によって代謝され、1回の透析中に血液中に残るDEHPの量は3.6~59.6 mgであると報告している。体重60 kgの男性の血液量が体重の約8%であるとすると、上記の数値は0.75~12.4 µg/mLの血中濃度となる。血中におけるDEHPの濃度にかかなりのバラツキがあるのは個人の代謝能力の違いによると同時に血液回路用チューブの製造方法に大きく依存すると考えられる。そのため日本で市販されている透析チューブでは2.0 µg/mL(参考文献中に記載されていた67 µg/kg/dayから換算)のDEHPが溶出し、特に日機装(株)が製造した透析チューブでは0.76 ± 0.30 µg/mLの濃度のDEHPが溶出すると報告されている<sup>12)</sup>。これらの報告から本研究で使用した可塑剤濃度の中で1 µg/mLが最も国産の血液回路用チューブを使用した場合に血中に溶出する可塑剤濃度に近く、1 µg/mLの可塑剤が引き起こす溶血率とACTの結果が重要であると考えられる。また、TOTMの溶出量はDEHPの1/100~1/200であるとの報告<sup>13)</sup>があるが、DINCHの溶出量を調べた報告はない。そこで、本研究ではTOTMやDINCHの溶出量に関係なく、血液に添加する濃度をDEHPと同じにし、同量の可塑剤がおよぼす影響を比較した。

3種類の可塑剤と生理食塩液を添加した血液の溶血率を比較した結果、時間依存性、濃度依存性とも可塑剤間および生理食塩液との間に有意な差はほとんどなかった。また4 hにおける最大の溶血率は1.6%程度(DEHP)であり、可塑剤を生理食塩液で希釈してから血液に混入しているため、生理食塩液によって発生した溶血率を引くと可塑剤(DEHP)による溶血率は0.2%以下であったことになる。以上の結果から、3種類の可塑剤が溶血性に影響をおよぼす可能性は非常に低いことがわかった。また、DEHPとDINCHを使用したPVCシートをヒト血液に入れて10週間インキュベートした結果、溶血を抑えることが報告<sup>14)</sup>され、血液保護機能を有する血液バッグとして使用されている。本研究における溶血率の結果(図2)からも、10、50 µg/mLの溶出量の場合はDEHP、TOTM、DINCHのいずれの可塑剤でも溶血を抑制する効果があることがわかった。

3種類の可塑剤と生理食塩液を添加した血液のACTを比較した結果、3種類の可塑剤が血液凝固能に影響をおよぼす可能性は非常に低いことがわかった。PVCチューブを浸して1 hインキュベートしたヒト血液血漿中のプロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、凝固因子(FVIII, FIX, FXII)の濃度におよぼすDEHPおよびDINCHの影響を検討した報告<sup>15)</sup>では、APTTがDINCHにより有意に延長し、DEHPとDINCHにより凝固因子FIXが有意に減少したとの結果

が得られている。しかし、DEHPを含むPVCチューブとDINCHを含むPVCチューブを浸した血漿のAPTTの間には有意な差がないことから、DEHPとDINCHが血栓形成におよぼす影響は同程度であると報告している。さらに、DEHPによりAPTTは延長されなかったこと、可塑剤がPTおよびFVIII, FXIIの濃度におよぼす有意な影響はなく、血小板活性の指標であるCD62Pにも可塑剤の影響がなかったことから、可塑剤は血栓形成には大きな影響をおよぼさないと考えられる。本研究で得られた結果と合わせて考えると、DEHPおよびTOTM、DINCHはどれも血液凝固能にはほとんど影響をおよぼさないと考えられる。

以上の結果は事前にウサギ血液で調査した結果と定性的には一致し、塩化ビニル可塑剤の影響を調査するためにはヒト血液の代わりにウサギ血液で代用できることが示された。

#### 5. 結言

DEHPおよびTOTM、DINCHを添加したヒト血液の溶血率と血液活性化凝固時間を測定し、生理食塩液を添加した血液と比較した結果、いずれの可塑剤も溶血性と血液の凝固系に影響をおよぼす可能性は非常に少なく、血液適合性は良好であることがわかった。

#### 参考文献

- 1) Van Dooren AA: PVC as pharmaceutical packaging material. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition* 13 (3), pp. 109-118, 1991.
- 2) Rahman M, Brazel CS: The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Prog Polym Sci.* 29. pp. 1223-1248, 2004.
- 3) 斉藤義明, 白美憲司, 大澤徳子, 永田伴子: 毒性病理学精巣毒性における空砲変性. *秦野研究所年報*27, pp. 8-14, 2004.
- 4) Welle F, Wolz G, Franz R: Migration of plasticizers from PVC tubes into enteral feeding solutions. *Res. & Dev.*, pp. 17-21, 2005.
- 5) 笠井憲雪, 吉川泰弘, 安居院高志: 現代実験動物学. 朝倉書店, pp. 118-119, 2009.
- 6) 鈴木正三, 池本卯典, 向山明孝: 比較血液型学. 裳華房, pp. 271-274, 1985.
- 7) 厚生労働省: 医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について, 薬食機発0301第20号, 2012.
- 8) 小島 幸一, 田中 憲徳: 医療用具の生物学的安全性試験のガイドライン, *秦野研究所年報*26, pp. 53-68, 2003.
- 9) 池崎弘之, 米谷聡: 心臓血管外科領域における凝固モニタリング-心臓手術中の止血困難に対してどう対処する

- かについての実践的アプローチ. 日臨麻会誌 33 (2), pp. 279-285, 2013.
- 10) 立原敬一, 石田等, 大塚徹, 諏訪邦夫: 血液浄化療法に用いられる抗凝固薬の種類, 帝京短期大学紀要 (16), pp. 141-144, 2010.
  - 11) Faouzi MA, Dine T, Gressier B, Kambia K, Luyckx M, Pagniez D, Brunet C, Cazin M, Belabed A, Cazin JC: Exposure of hemodialysis patients to di-2-ethylhexyl phthalate. *Int J Pharm.* 180 (1), pp. 113-121, 1999.
  - 12) 山川智之, 岡林和美, 山本忠司: DEHPフリー血液回路の有用性. *臨床透析* 20 (5), pp. 581-585, 2004.
  - 13) 日比谷信, 他14名: 体外循環用血液回路からの可塑剤溶出の基礎的検討—DEHPとTOTMの溶出の比較—. *体外循環技術.* 33 (1), pp. 16-19. 2006.
  - 14) Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, Niimi S: Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride. *J Biomed Mater Res Part B* 102B, pp. 721-728, 2014.
  - 15) Zhong R, Wang H, Wu X, Cao Y, He Z, He Y, Liu J: In vitro investigation of the effect of plasticizers on the blood compatibility of medical grade plasticized poly (vinyl chloride). *J Mater Sci: Mater Med* 24 (8), pp. 1985-1992. 2013.

# Blood Compatibility of Plasticizers for a Blood Circulation Tube

— Studies on human blood —

Hiroshi SHIBATA, Takuya DAIYOU\*, Yu KOSAKA\*, Yuta IMAMURA\*,

Daiki SUZUKI\*, Shingo OKAMOTO\*\*, Hironobu SUGIYAMA\*\*,

and Takeru NAIKI\*

*Graduate School of Engineering,*

*\* Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering,*

*Okayama University of Science,*

*1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan*

*\*\* Biomedical Engineering Center, Nikkiso Corporation*

(Received October 26, 2017; accepted December 4, 2017)

The conventionally used plasticizer di-2-ethylhexylphthalate (DEHP), used for polyvinyl chloride, for the manufacturing of blood circulation tubes was found to be associated with a risk for testicular toxicity. Thus, the development of blood circulation tubes by using other plasticizers such as trioctyl trimellite (TOTM) or Di-isononyl-cyclohexane-1, 2-dicarboxylate (DINCH) that is not associated with a risk for testicular toxicity has recently been under way. However, biocompatibilities such as blood compatibility of these plasticizers against human blood are not well known. In the present study, the activated coagulation time (ACT) and the hemolysis ratio of the blood samples added 3 types of plasticizers were measured to evaluate the blood compatibility of these plasticizers. The results showed negligible effects of each plasticizer on blood coagulation and hemolysis.

**Keywords:** plasticizer, ACT, blood dialysis tube, biocompatibility, biomedical material.