血液回路から溶出する内分泌攪乱物質 Di-(2-ethylhexyl) phthalate の溶出の実態とハイパフォーマンス膜による除去についての検討

大 橋 篤 日比谷 信 中 上 寧 加 藤 政 雄*
芳 川 博 人** 鳥 羽 貴 子** 久志本 浩子** 勝 又 秀 樹**
村 上 和 隆** 長谷川みどり** 富 田 亮** 長谷川 寛**
鹿 野 昌 彦** 川 島 司 郎**
藤田保健衛生大学・短期大学 同腎センター* 同腎臓内科**

key words : 内分泌攪乱物質, フタル酸エステル, 血液回路, 血液透析, ハイパフォーマンス膜

〈要旨〉

近年、一部の化学物質が内分泌攪乱物質として問題となっているが、塩化ビニル製血液回路から溶出するフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) はその1つである。我々は、血液透析の際に DEHP 量を測定し、ハイパフォーマンス膜 (HPM) が DEHP 除去に有用であることを明らかにした。

まず、体外実験で、血液回路にアルブミン (Alb) 溶液を灌流させ、DEHP 濃度を測定した。次に、回路に再生セルロース (CU) 膜、セルローストリアセテート (CTA) 膜を各々装着し、Alb 溶液を灌流して、最終的な DEHP 溶出量を測定した。その結果、回路からの DEHP 溶出量は 0.95 mg であり、回路に CU (AMFP 110) 膜を装着した場合の DEHP 溶出量は 0.72 mg、CTA (FB 90 U) 膜では 0.17 mg であった。次に、膜の細孔径の違いが DEHP の溶出量に及ぼす影響をみるために、膜素材 (CTA) は同じであるが、細孔径が異なる FB-E (55 Å) と FB-F (75 Å) の比較を行った。その結果、DEHP の溶出量は、FB 50 E が 0.47 mg、FB 50 F は 0.29 mg であり、細孔径の大きな膜では溶出量が減少した。

臨床実験で、CU 膜、CTA 膜、および PS 膜で 1 年以上血液透析を施行した患者の HD 前、後の動脈血液中 DEHP 濃度を測定した。HD 前の DEHP 濃度は、全ての患者で感度以下であったが、透析終了時には、CU 群 0.69 ± 0.31 mg/l に対し、CTA 膜群 0.41 ± 0.07 mg/l、PS 膜群 0.25 ± 0.21 mg/l で有意に低値であった。以上の結果より、親水性の CU 膜では DEHP の除去能は低い、疎水性の高い HPM は DEHP を吸着除去でき有用である。

High performance membranes are useful in the removal of Di-(2-ethylhexyl) phthalate eluted from blood circulating tubes

Atsushi Ohashi, Makoto Hibiya, Yasushi Nakagami, Masao Kato*, Hirohito Yoshikawa**, Takako Toba**, Hiroko Kushimoto**, Hideki Katsumata**, Kazutaka Murakami**, Midori Hasegawa**, Makoto Tomita**, Hiroshi Hasegawa**, Masahiko Shikano**, Shiro Kawashima**
Fujita Health University・College, Kidney Center*, Department of Nephrology**

This study was designed to clarify if high performance membranes are effective in removing Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by measuring DEHP, which is an endocrine disrupter.

During *in vitro* experiments, we circulated albumin solution in blood tubes and measured DEHP concentrations. Also, we circulated albumin solution in blood tubes connected to regenerated cellulose membranes (CU) or cellulose triacetate membranes (CTA). DEHP eluted from the tubes was 0.95 mg. It consisted of 0.72 mg from a CU membrane (AMFP 110), and 0.17 mg from a CTA membrane (FB 90 U).

Furthermore, we compared two different models of CTA dialyzers (FB-E (55 Å) and FB-F (75 Å)) to observe the influence of different pore sizes on DEHP removal. The quantity of DEHP was 0.47 mg in FB 50 E, and 0.29 mg in FB 50 F, the lower value found in the membrane with a larger pore size.

During *in vivo* experiments, we measured DEHP in arterial blood before and after hemodialysis sessions. DEHP was not detected in the serum of any patients dialyzed with CU, CTA, or PS membranes over a long period. However, DEHP was detected in the serum of post-hemodialysis patients, and its concentration was 0.69 ± 0.31 mg/l in CU, while it was 0.41 ± 0.07 mg/l in CTA, and 0.25 ± 0.21 mg/l in PS. It was significantly lower in CTA and PS membranes, compared to CU.

In conclusion, we can state that high-performance membranes are useful in the removal of DEHP eluted from blood circulating tubes.

緒 言

塩化ビニル (PVC) 製品は、医療用分野では 40 年間にわたり幅広く使用され、透析用回路、人工心肺回路、血液バッグ、輸液回路などにも使用されている。この PVC 製品には、フタル酸エステル類の 1 つである Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) が可塑剤として 30~40% の割合で添加されている¹⁾。

DEHP の生体への影響として、動物実験では性周期の延長と排卵障害²⁾、精巣萎縮^{3,4)}や、ペルオキシゾーム増殖因子物質として肝臓腫瘍の誘発⁵⁾などの報告が数多くなされている。

1996 年に、Colborn らの論文 Our Stolen Future⁶⁾で、環境汚染物質のダイオキシン、PCB、ビスフェノール A、DEHP などおよそ 70 種類の化学物質が生態系に影響を与える可能性が指摘され、これらが外因性内分泌攪乱化学物質と命名されて以来、動物への影響が注目され、現在、多くの研究機関で分析調査が行われている。

今回、著者らは、血液回路から溶出する DEHP 量を測定し、さらに透析膜の素材や細孔径の違いで DEHP による暴露量が異なること、特に、ハイパフォーマンスタジアライザー (HPM) が DEHP の除去に有用であることも明らかにした。

I. DEHP の測定法

方法：DEHP の測定は、Dine ら⁸⁾の HPLC 法に準拠した。分析条件は、カラム：ODS-UG-5 {4.6×100 mm (野村科学社製)}、移動相：95%アセトニトリル (アセトニトリル 95 容：蒸留水 5 容)、流速：0.8 ml/min、測定波長 254 nm である。

試料からの DEHP の抽出操作は、DEHP が溶出しないガラス容器を使用し、試料 100 μ l に氷冷したアセトニトリル 200 μ l を加え、5 分間激しく攪拌後 3,000

G で 10 分間 (4°C) 遠心分離し、その上清 50 μ l を HPLC システムに注入し測定した。回収率は、DEHP が検出感度以下であることを HPLC 法で確認した健康者の血清 2 ml に DEHP を 20 mg 添加し、超音波振盪機にて 5 分間混和し乳化させ、さらに同一血清で 100 倍希釈し DEHP 添加血清 (終濃度：100 mg/l) を作成した。次に、この血清を正確に 100 μ l ずつ 5 本のガラス試験管に分注し、上記の抽出操作で DEHP 濃度を測定した。

結果：DEHP のピーク面積と、DEHP 量との 1 次回帰式は $Y = 25 \times 10^{-6} \times X - 0.0014$, $R = 0.998$ ($p < 0.01$) の良好な相関関係が得られ、これを検量線とした。また、検出限界は 0.06 mg/l であった。平均回収率は $93.8 \pm 4.1\%$ ($n=5$)、変動係数は 4.4% であり良好な結果が得られた (図 1)。

II. 体外実験

目的：DEHP は親油性であるので、血液回路から蒸留水や生理食塩水には溶出しないが、アルブミン (Alb) とは結合して溶出するとの報告がある⁷⁾。そこで、血液回路からの DEHP の溶出の実態とその経時的变化をみるため、血液回路に Alb 溶液を灌流させ、経時的に灌流液中の DEHP 濃度を測定した (体外実験 ①)。さらに、血液回路にダイアライザーを装着した場合、DEHP が限外濾過や、膜に吸着される可能性があるため、膜素材 (体外実験 ②) や、細孔径 (体外実験 ③) の異なるダイアライザーを装着し、DEHP の溶出量を比較した。

1. 血液回路から溶出する DEHP 量の測定 (体外実験 ①)

方法：図 2 に示す体外実験回路を作成し、未使用血液回路 (プライミング量 90 ml, ニプロ社製) を 1 L の生理食塩水 (生食水) で洗浄した後、5% Alb 溶液 (ブミネート, Baxter 社) 200 ml で置換し、回路内を 200 ml/min (37°C) で灌流させた。灌流開始後 1, 2, 3,

図 1 HPLC クロマトグラム

図 2 体外実験の回路図

体外実験①

回路のみの DEHP 溶出量測定時にはダイライザーを装着しない

体外実験②

膜素材	ダイライザー
CU	AM-FP110
PMMA	BK-1.0U
PS	PS-10.UW
CTA	FB-90U

体外実験③

細孔半径	ダイライザー
55 Å	FB-50E
70 Å	FB-50U
75 Å	FB-50F

図 3 透析膜素材別の DEHP 溶出量の比較(体外実験①, ②)

4 時間に容器内の Alb 溶液の一部を採取してその DEHP 濃度を測定し、総溶液量を乗じて溶出量を求めた。また、体外実験は各々 2 回行い、各値は 2 回の平均値である。

結果：血液回路を洗浄した生食水中の DEHP 濃度は検出感度以下であった。

Alb 溶液内への DEHP 溶出量は、実験開始後 1 時間で 0.58 mg まで急激に上昇し、以後 2 時間 0.77 mg, 3 時間 0.85 mg, 4 時間で 0.95 mg に達した(図 3 の太線)。

2. 膜素材別の DEHP 溶出量の比較(体外実験②)

方法：前記と同じ体外実験回路に、それぞれ膜素材は異なるが膜面積および限外濾過率が同程度のダイア

ライザー {再生セルロース (CU) 膜 (AM-UP-10, 旭化成社製), ポリメチルメタクリレート (PMMA) 膜 (BK-1.0 U, 東レ社製), セルローストリアセテート (CTA) 膜 (FB-90 F, ニプロ社製), ポリスルホン (PS) 膜 (PS-1.0 UW, 川澄化学社製)} を装着し, ダイアライザーの血液側と透析液側を各々1Lの生食水で洗浄した. 次に, 限外濾過の影響を除くため (QF = 0 ml/min) ダイアライザーの透析液側の生食水は排出せずに密閉し, 血液側の生食水のみ排出し, 5% Alb 溶液 200 ml を 200 ml/min で灌流させた. 経時的に Alb 溶液の一部を採取し, DEHP の溶出量を比較した. さらに, 実験終了後に透析液側を開放し, 限外濾過を行って濾液を得, その DEHP も測定した.

結果：血液回路に CU 膜を装着した場合の DEHP の溶出量は, 1 時間で 0.32 mg, 2 時間 0.50 mg, 3 時間 0.62 mg, 4 時間で 0.72 mg に達した. 4 時間の体外実験中に透析膜で除去された DEHP 除去量を算出するため, 血液回路のみの DEHP 溶出量から, 各透析膜を装着した場合の溶出量を減じると, CU 膜の除去量は 0.23 mg であった. 同様に PMMA 膜の除去量は 0.64 mg, PS 膜は 0.71 mg, CTA 膜は 0.84 mg であり, CU 膜に比し, PMMA, PS, CTA 膜では DEHP の除去量が多かった (図 3). また, この実験で得た濾液の DEHP も測定したが, 全て検出感度以下であった. したがって, DEHP は透析膜に吸着除去されたと考えられる.

3. 膜孔径別の DEHP 溶出量の比較 (体外実験 ③)

方法：透析膜を CTA (面積: 0.5 m², ニプロ社製) 膜に統一し, 平均膜孔径 55 Å の FB-50 E と, 70 Å の FB-50 U および 75 Å の FB-50 F をセットし, 上記体外実験と同様に 5% Alb 溶液を灌流し, 各ダイアライザーによる DEHP の除去能を比較した.

結果：上記実験同様に各膜での濾液中の DEHP 濃度は, 全て検出感度以下であった.

FB-50 E を装着した場合, 5% Alb 溶液中の DEHP 量は 4 時間で 0.47mg, FB-50U は 0.40mg, FB-50F

では 0.29 mg であり, DEHP の吸着量は膜の細孔径により影響を受けた (図 4). この結果は, 膜孔径が拡大すると膜内外表面での DEHP の吸着面積が増大するためその吸着量が増加したと考えられる.

III. 臨床実験

1. 血液透析前および後における膜素材別での血中 DEHP 濃度の比較

目的：健常者に比べ長期血液透析患者では血中 DEHP 濃度が高い可能性があるため, 健常者と, 透析患者の血中 DEHP 濃度を測定した. 次に, 実際の透析患者を膜素材別に群分けし, 透析前と後における血中 DEHP 濃度を比較した.

対象：健常者 10 名 (男 5 名, 女 5 名, 年齢 35±5.2 歳) と, 透析歴, 体重, 除水量がほぼ同等の 4 群の慢性血液透析患者 28 名を対象とした. 対象のプロフィールは表に示す通りである.

方法：同じダイアライザーを 1 年以上使用している透析患者を膜素材 {CU 膜, セルロースジアセテート (CDA) 膜, CTA 膜, PS 膜} により群分けした. 透析開始時と終了時に動脈側穿刺部から血液を採取し, 血

図 4 細孔径が異なる CTA 膜における DEHP 溶出量 (体外実験 ③)

表 症例のプロフィール

	ダイアライザー	対象 (名)	年齢 (歳)	透析歴 (年)	基礎体重 (kg)	除水量 (L/4 h)	血中 DEHP (mg/l)
健常者	—	男 5, 女 5	35.0±5.2	—	55.8±11.1	—	N. D.
CU 膜群	AM-SD-130	男 6, 女 4	57.8±11.5	11.2±2.4	55.4±4.6	2.5±0.7	N. D.
CDA 膜群	M-150 D	男 2, 女 4	50.8±7.9	10.4±4.7	54.9±6.2	2.5±0.5	N. D.
CTA 膜群	FB-150 E	男 2, 女 4	57.2±6.5	10.9±2.6	53.6±4.7	2.5±0.5	N. D.
PS 膜群	PS-1.3 UW	男 2, 女 4	53.3±10.9	11.1±3.2	52.4±7.3	2.6±0.6	N. D.

(mean±S.D.) N.D.: not detected
(<100 μg/l)

図 5 各透析膜による透析の終了時における血中 DEHP 濃度

図 7 血液回路の動、静脈側における DEHP 濃度と分時溶出量

図 6 臨床実験の対象と血液回路図

中 DEHP 濃度を測定した。各膜群間の統計学的な比較は、One-way fractional ANOVA and multiple comparison test を用い $p < 0.05$ 以下を有意とし検定した。

結果：健康者および透析患者における透析開始時の血中 DEHP 濃度は、全症例において測定感度以下であった。しかし、透析終了時の血中 DEHP 濃度は、CU 膜群 0.69 ± 0.31 mg/l (mean $\pm$ S. D.), CDA 膜群 0.50 ± 0.16 mg/l, CTA 膜群 0.41 ± 0.07 mg/l, PS 膜群 0.25 ± 0.21 mg/l であり、体外実験の結果と同様 CU 膜群に比し、CTA 膜群 ($p < 0.05$) と PS 膜群 ($p < 0.01$) は有意に低値であった (図 5)。

2. 血液透析中の DEHP の経時変化と分時溶出量ならびに総溶出量の測定

目的：体外実験では回路内に 5% Alb を灌流させて DEHP 溶出量を測定したが、本実験では透析中に血液回路から DEHP がどのように溶出し、透析 1 回当たりの DEHP の暴露量を求める。

対象と方法：慢性血液透析患者 (65 歳, 男性, 透析歴 10 年, 基礎体重 52 kg) を対象とし、患者に実験内容ならびに予想される副作用などを充分説明し、書面による同意書を得て、以下の実験を行った。通常の血液回路とは別に、ダイアライザーを経由しないバイパス回路を設置し、透析開始 5 分, 60, 120, 180, 240 分にダイアライザー側の血流を一時遮断し、Y 字管で血液を分流して、バイパス回路に送り、QB 200 ml で 5 分間灌流させた。そして、血液回路の動脈 (以下 A) 側および静脈 (以下 V) 側の穿刺部に一番近い採血ポートより血液を採取し、各部位での DEHP 濃度を測定した (図 6)。さらに、(V 側 DEHP 濃度 - A 側 DEHP 濃度) $\times$ 200 ml/min にて DEHP の分時溶出量を算出し、経時変化を求め、4 時間透析での総溶出量を算出した。

結果：血液透析中の動脈側および静脈側 DEHP 濃度は、開始 5 分での A 側が 1.37 mg/l, V 側は 2.66 mg/l であり、開始後 1 時間 (A 側 0.93 mg/l, V 側 1.53 mg/l), 開始後 2 時間 (A 側 1.40 mg/l, V 側 1.76 mg/l), 開始後 3 時間 (A 側 1.56 mg/l, V 側 1.81 mg/l), 透析終了時は A 側 1.63 mg/l, V 側 1.82 mg/l であった。また、DEHP の分時溶出量を計算すると、透析開始 5 分で 0.26 mg/min, 1 時間では 0.12 mg/min, 2 時間 0.07 mg/min, 3 時間 0.05 mg/min, 透析終了時には 0.04 mg/min であり、透析開始時に大量に溶出して、以後漸減した。また、透析 4 時間での総溶出量を計算すると約 24 mg であった (図 7)。

IV. 考 察

Huber ら⁹⁾は、DEHP によるラットの発癌実験において無作用量を 50~100 mg/kg/day としている。Gib-

son ら⁹⁾は5時間の血液透析における DEHP の暴露量は 150 mg であり、Pollack ら¹⁰⁾も 105 mg であったと報告している。今回の実験でも DEHP の暴露量は約 24 mg であり、体重 50 kg としても 0.5~3.0 mg/kg/day になるため、発癌因子となる危険性はないと考えられる。一方、大場ら¹¹⁾は DEHP による細胞増殖抑制限度を 25 mg/l 以上と報告している。Pollack ら¹⁰⁾の成績では透析中の血中 DEHP 濃度は 1.9 mg/l であり、今回の我々の成績でも透析開始5分で 2.7 mg/l であった。大場ら¹¹⁾の細胞増殖抑制濃度を精子数を減少させる境界値と考えると、血液透析による DEHP 濃度でも生殖機能への影響について楽観は許されない。

今回の実験によりダイアライザーの膜素材を CU 膜から CTA, PS 膜などの HPM に変えると、DEHP が軽減することが分かった。HPM による除去の機序として、回路から Alb と結合して溶出した DEHP は、Alb や他の蛋白成分とともに透析膜に吸着され減少した可能性が考えられる。しかし、内藤¹²⁾は、CTA や PMMA などの HPM では膜内表面に Alb が吸着するが、PS 膜では Alb の付着はほとんどみられなかったと報告している。今回の体外実験の結果で、Alb の吸着しにくい PS 膜でも DEHP の除去は顕著であったことからすると DEHP の除去が単に膜による Alb の吸着に起因するとは考え難い。疎水性の DEHP は膜の分子構造に親水性の水酸基を持つ CU 膜には吸着されにくく、水酸基がアセチル基に置換された結果疎水性が高まった CTA 膜や、疎水性部分と親水性部分を併せ持つ PS 膜では DEHP が疎水結合により吸着されたと考えられる。また、ハイパフォーマンス膜は膜表面の細孔径が大きく、かつ膜厚も厚いために吸着面積が増大し、吸着量が増加した可能性もある。

臨床実験による DEHP の分時溶出量をみると、透析開始初期に DEHP の溶出量が急激に増加し、以後減少している。これは、血液回路の血液側で表層付近の DEHP が溶出し、その部分の PVC が硬化して保護膜のように働いたため、あるいは回路表面にプロテインケーキが形成されたため時間の経過とともに溶出されにくくなったのであろう。

血液透析の際の DEHP による暴露を防ぐには、DEHP を用いない新材料の開発が望まれる。しかし、現状の PVC 回路を使用するのであれば、DEHP の溶出を防ぐために回路内面を何らかの素材によって被覆することや、回路を細く、かつ短くし、エアートラップを小さくするなどの改良を加える必要がある。さらに DEHP の吸着能が高い HPM を用いることによ

り除去効率を高めれば、DEHP による暴露量を軽減できると考えられる。

結論ならびに結語

1. 血液回路から溶出した DEHP の吸着除去能は親水性の CU 膜に比べ疎水性の PS 膜や CTA 膜で高かった。

2. 膜の細孔径が大口径なほど DEHP の吸着能は高かった。

3. 血液透析で PVC 製血液回路から溶出する DEHP 量は透析開始初期に大量に増加し、その総溶出量は約 24 mg であった。

文献

- 1) 日本医療機器協会(編)：やさしいプラスチック製医療材料, 4-54, 三光出版社, 東京, 1994
- 2) Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ : Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 128 : 216-223, 1994
- 3) Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J : Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J Toxicol Environ Health* 26 : 39-59, 1989
- 4) Gray TJ, Gangolli SD : Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ Health Perspect* 65 : 229-235, 1986
- 5) Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R : Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl) phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol* 26 : 365-481, 1996
- 6) Colborn T, Dumanoski D, Myers JP : Our Stolen Future : Dutton, New York, 1996
- 7) 池亀 守, 川井 薫, 別府秀彦：透析回路材質から溶出する可塑剤の定量について。 *Clinical Engineering* 17 : 357-361, 1996
- 8) Dine T, Luyckx M, Cazin M, Brunet C, Cazin JC, Goudaliez F : Rapid determination by high performance liquid chromatography of di-2-ethylhexyl phthalate in plasma stored in plastic bags. *Biomed Chromatogr* 5 : 94-97, 1991
- 9) Gibson TP, Briggs WA, Boone BJ : Delivery of di-2-ethylhexyl phthalate to patients during hemodialysis. *J Lab Clin Med* 87 : 519-524, 1976
- 10) Pollack GM, Buchanan JF, Slaughter RL, Kohli RK, Shen DD : Circulating concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate and its de-esterified phthalic acid products following plasticizer exposure in patients receiving hemodialysis. *Toxicol Appl Pharmacol*

79：257-267, 1985

- 11) 大場琢磨, 鈴木康雄, 大森義仁, 桑村 司, 山羽 力, 田中 彰, 小田嶋成和, 石館 基, 前川昭彦：医療用塩化ビニル樹脂の可塑剤フタル酸エステル—主に

DEHP—の安全性. 衛生試所報告 93：1-23, 1975

- 12) 内藤秀宗：膜吸着. 血液透析スタッフのための新しいハイパフォーマンスタライザー (竹沢真吾編), 210-225, 東京医学社, 東京, 1998