

表13. 家庭用品に対する分析例

Chemical name	CAS No.	分析法	対象品目	検出例	用途例**
2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol	52-51-7	GC	切削油、化粧品	×	用廃水、冷却水、繊維、皮革、紙パルプ、化粧品
1,2-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	GC	壁紙用接着剤	×	水系製品全般の防霉、塗料、金属
N-n-Butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one	4299-07-4				プラスチック、塗料、金属加工油
Methyl-N-(2-benzimidazolyl)carbamate	10605-21-7				塗料、プラスチック、木材、シーリング材
4,4'-Dimethyl-1,3-oxazoline	51200-87-4	GC	切削油	○	金属加工油、塗料、エマルジョン、化粧品
3,4,4'-Trichlorocarbamide	13208-22-5	HPLC	繊維製品、化粧品	○	化粧品、繊維製品、消毒剤
3-Iodo-2-propynylbutylcarbamate	55406-53-6	GC	防カビ剤	○	木材、プラスチック、用廃水、医用光学機器、食品工業、医環境、環境
N-Dimethyl-N'-phenyl-N'-(fluorodichloromethylthio)sulfamide	1085-98-9	GC	塗料	○	非水系塗料、木材、ブルーステイン防止剤、プライマー、ステインリッカー
2-(Thiocyanomethylthio)benzothiazole	21564-17-0	HPLC	農薬、塗料、壁紙用接着剤	×	塗料、スライムコントロール、農業用殺菌剤
2-Hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one	499-44-5				繊維、紙、化粧品
2,4,5,6-Tetrachloroisophthalonitrile	1897-45-6	GC	壁紙用接着剤	○	プラスチック、農業用殺菌剤
Zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide)	13463-41-7	HPLC	シャンプー、リンス	○	化粧品、皮革、船底塗料、接着剤、石膏ボード、用水、紙、木材、プラスチック
2,3,5,6-Tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine	13108-52-6	HPLC	塗料		プラスチック、塗料、紙
4-Chloro-3,5-dimethylphenol (p-Chloro-m-xyleneol)	88-04-0	GC, HPLC	防虫・防カビ剤、殺菌剤	○*	防カビ剤、家庭用防虫剤、医薬、化粧品、医環境、環境
4-Chloro-3-methylphenol (p-Chloro-m-cresol)	59-50-7	GC, HPLC	防虫・防カビ剤		防カビ剤、塗料、接着剤、繊維、皮革、切削油、ワックス
N-(Fluorodichloromethylthio)phthalimide	719-96-0	GC	寝具	○	塗料、プラスチック
p-Chlorophenyl-3-iodopropargylformal	29772-02-9	GC	防カビ・防虫塗料	○	繊維、木材、皮革、塗料
1-Bromo-3-ethoxycarbonyl-1,2-diodo-1-propene	77352-88-6	GC	壁紙用接着剤	○	木材防霉・防黴
4,4'-Tetramethylene-bis(4-carbomoyl-1-decylpyridinium bromide)	Unknown	HPLC	塗料、壁紙用接着剤	×	医用光学機器、食品工業、医環境、環境、塗料
N,N'-Hexamethylenebis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide)	Unknown	HPLC	塗料、壁紙用接着剤	×	医用光学機器、食品工業、医環境、環境、塗料、紙パルプ
2-Chloroacetamide	79-07-2				防カビ剤、接着剤、皮革、靴みがき剤、化粧品
Isobornyl thiocyanacetate	115-31-1	GC	繊維製品	×	抗菌剤
10,10'-Oxy-bis(phenoxarsine)	58-36-6	HPLC	PVC人工皮革	○	抗菌剤
Hiba oil	Unknown	GC	繊維製品	○	抗菌剤

* 市販製品の品質記載欄より確認。

** 防菌防霉剤事典-原体編一より抜粋

表14. 金属材料に使用される抗菌防黴剤(細見の報告¹¹⁾を改変)

種別	原体名 化合物	略号	商品名	急性経口毒性 LD50(mg/kg)
ハロゲン系	テトラクロロイソフタロニトリル	TPN	Nopocide N-96	10000 ラット
	ジヨードメチル-p-トリルスルホン		Amical 48	10000 マウス
	3-ヨード-2-プロパギルカルバミン酸ブチル	IPBC	Troysam p-100	1470 ラット
	4-クロロフェニル-3-ヨードプロパギルホルマール		IF-1000	1250 マウス
イミダゾール系	2-(4-チアゾリル)ベンゾイミダゾール	TBZ	Metasol TK-100	3600 マウス
	2-ベンゾイミダゾールカルバミン酸メチル	BCM	Carbendazole	6400 ラット
チアゾール系	1-(ブチルカルバモイル)-2-ベンゾイミダゾールカルバミン酸メチル		Benomyi	5000 マウス
	2-n-オクチル-4-イソチアゾリン-3-オン	OIT	Skane M-8	550 マウス
	4,5-ジクロロ-n-オクチル-4-イソチアゾリン-3-オン	Cl-OIT	RH-287	2600 ラット
	2-(4-チオシアノメチルチオール)-1-オキシド	TCMTB	Preventol CR	1590 ラット
ピリジン系	亜鉛2-ピリジンチオール-1-オキシド		Zn-Omadine	200 ラット
イミド系	2,3,5,6-テトラクロロ-4-(メチルスルホニル)ピリジン		Densil S-100	700 ラット
	N-(フルオロジクロロメチルチオ)フタルイミド		Preventol A3	2900 ラット
スルファアミド系	N,N'-ジメチル-N-(フルオロジクロロメチルチオ)-N-フェニルスルファアミド		Preventol A4	1000 ラット
ヒ素化合物	10,10'-オキシビスフェノキシアルシン		Vinyzene	1750 ラット
窒素イオウ系	メチレンビスチオシアネート			79 ラット
			Dichlofluanide	
			OBPA	
			MBTC	

表15. 抗菌剤の規制状況と評価 (RTECSより)

Chemical	CAS No.	Standard and Regulation	Status in USA	Review
2-Bromo-2-nitropropane-1,3-diol	52-51-7	1 2: RED Completed		
1,3-Benzisothiazolin-3-one	2634-33-5	1 2: Supported		
Methyl-N-(2-benzimidazolyl)carbamate	10605-21-7	2: Active registration OEL-RUSSIA: STEL 0.1 mg/m ³ , JAN1993	EPA GENETOX PROGRAM 1988, Inconclusive: Aspergillus-recombination EPA GENETOX PROGRAM 1988, Positive: Aspergillus-aneuploidy; Mouse spot test EPA GENETOX PROGRAM 1988, Positive: S cerevisiae gene conversion; S cerevisiae- homozygosis	
4,4-Dimethyl-1,3-oxazolidine	51200-87-4	1		
3-Iodo-2-propynylbutylcarbamate	55406-53-6	1 2: RED Completed		
N,N-dimethyl-N'-(fluorodichloromethylthio)- N"-phenylsulfamide	1085-98-9		EPA GENETOX PROGRAM 1988, Inconclusive: B subtilis rec assay EPA GENETOX PROGRAM 1988, Negative: S cerevisiae gene conversion	
2-(4-Thiocyanomethylthio)benzothiazole	21564-17-0	1		
2-Hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one	499-44-5		EPA TSCA Section 8(b) CHEMICAL INVENTORY EPA TSCA TEST SUBMISSION (TSCATS) DATA BASE, JANUARY 2001	

表15. 続き(1)

Chemical	CAS No.	Standard and Regulation	Status in USA	Review
2-Hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one	499-44-5	OEL-AUSTRIA: Suspected Carcinogen, JAN1999	EPA TSCA TEST SUBMISSION (TSCATS) DATA BASE, JANUARY 2001	IARC Cancer Review: Group 2B
Zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide)	13463-41-7	1 2: Supported	NCI Carcinogenesis Bioassay (feed); clear evidence: rat	IARC Cancer Review: Human Inadequate Evidence
2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine	13108-52-6	1 2: Cancelled	NCI Carcinogenesis Bioassay (feed); no evidence: mouse	IARC Cancer Review: Human No Adequate Data
4-Chloro-3,5-dimethylphenol	88-04-0	1 2: RED Completed	On EPA IRIS database	
4-Chloro-3-methylphenol	59-50-7	1 2: RED Completed		
2-Chloroacetamide	79-07-2	OEL-SWEDEN: TWA 3 mg/m ³ , STEL 6 mg/m ³ , JAN1999	EPA GENETOX PROGRAM 1988, Positive: Cell transform.-SA7/SHE	
Isobornyl thiocyanacetate	115-31-1	1 2: Cancelled	EPA TSCA Section 8(b) CHEMICAL INVENTORY	
			EPA TSCA TEST SUBMISSION (TSCATS) DATA BASE, JANUARY 2001	

表15. 続き(2)

Chemical	CAS No.	Standard and Regulation	Status in USA	Review
10,10'-Oxy-bis(phenoxyarsine)	58-36-6	1 2: RED Completed OEL-RUSSIA: STEL 0.02 mg/m ³ , OSHA PEL (Construc):8H TWA 0.5 mg(As)/m ³ OSHA PEL (Fed Cont):8H TWA 0.5 mg(As)/m ³ OSHA PEL (Gen Indu):8H TWA 0.5 mg(As)/m ³ OSHA PEL (Shipyards):8H TWA 0.5 mg(As)/m ³		

1 = EPA FIFRA 1988 PESTICIDE SUBJECT TO REGISTRATION OR RE-REGISTRATION

2 = EPA FIFRA 1998 STATUS OF PESTICIDES

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

抗菌剤の変異原性の整理と評価、抗菌剤のマウスリンフォーマ試験による変異原性の評価

分担研究者 林 真 医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部 部長)
協力研究者 中嶋 圓 (財)食品農医薬品安全性評価センター・遺伝毒性グループ
リーダー)

要旨

本研究の目的は、抗菌剤 18 化合物について、細菌を用いる復帰突然変異試験および一部についてはマウスリンフォーマ TK 試験に関する情報を整理し、遺伝毒性に関する評価を行った。これまでは家庭用品の遺伝毒性に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験とは乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が中心に行われてきたが、抗菌剤に関しては細菌を用いる試験では評価しがたい場合もあり、ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異を検出する試験系の導入が必要と考えられた。

A.目的

抗菌剤の遺伝毒性を検討する場合、通常は他の家庭用品と同様の試験が行われてきた。すなわち、細菌を用いる復帰突然変異試験、およびほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験を中心とする *in vitro* 試験バッテリーである。しかし、抗菌剤についての細菌を用いる復帰突然変異試験結果を評価、解釈する場合には化学物質の特性との関係において注意する必要がある。医薬品に関しては、ICH で遺伝毒性試験の組み合わせが合意されているが、その中で細菌を用いる復帰突然変異試験に関しては、利用の限界について記載があり、細菌に対し強い毒性を示す化合物の場合、遺伝毒性の評価において適切あるいは十分な情報が得られない場合がある、とされている。抗菌剤はまさにこのカテゴリーに入るものであり、細菌を用いる復帰突然変異試験結

果のみでは十分な情報が得られない場合がある。同じ指標を検討するために開発された、ほ乳類培養細胞を用いる試験系の一つがマウスリンフォーマ TK 試験である。この試験を適用することにより、細菌を用いる試験系に特異的な限界にとらわれずに抗菌剤の遺伝毒性を評価することが可能となる。

B.方法

1. 被験物質（抗菌剤）

国立医薬品食品衛生研究所より配布された以下の 18 化合物を試験に用い、各化合物は冷暗所（15℃ 以下）に保存した。各化合物（抗菌剤）の CAS 番号を表 1 に示した。ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解あるいは良好に懸濁するため、溶媒として DMSO を用い、連続希釈により被験物質液を調製した。

1. Hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one [HICHO]
2. 3,4,4'-Trichlorocarbanilide [TCC]
3. Isobornylthiocyanoacetate [IBTA]
4. 1,2-Benzisothiazolin-3-one [BIT]
5. 2,4,5,6-Tetrachloroisophthalonitrile [TPN]
6. 3-Iodo-2-propargylbutylcarbamate [IPBC]
7. 10,10'-Oxy-bis(phenoxyarsine) [OBPA]
8. *p*-Chlorophenyl-3-iodopropargylformyl [CPIP]
9. 1-Bromo-3-ethoxycarbonyloxy-1,2-diiodo-1-propene [BECDIP]
10. Hiba oil [HO]
11. 2,3,5,6-Tetrachloro-4(methylulphonyl)pyridine [TCMSP]
12. *N-n*-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one [BBIT]
13. 2-(Thiocyanomethylthio) benzothiazole [TCMTBT]
14. 4,4'-Tetramethylene-bis(4-carbomoyl-1-decylpyridinium bromide) [TMBCDPB]
15. 2-Bromo-2-nitropane-1,3-diol [BNPD]
16. 4,4'-Dimethyl-1,3-oxazoline [DMO]
17. *N, N'*-Hexamethylene-bis(4-carbomoyl-1-decylpyridinium bromide) [HMBCDPB]
18. Zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide) [ZPT]

IPBC	55406-53-6
OBPA	58-36-6
CPIP	29772-02-9
BECDIP	77352-88-6
HO	不明
TCMSP	13108-52-6
BBIT	4299-07-4
TCMTBT	21564-17-0
TMBCDPB	不明
BNPD	52-51-7
DMO	51200-87-4
HMBCDPB	不明
ZPT	13463-41-7

表1 各被験物質のCAS No.

被験物質名	CAS No.
HICHO	499-44-5
TCC	101-20-2
IBTA	115-31-1
BIT	2634-33-5
TPN	1897-45-6

2. 復帰突然変異試験

2-1. 試験菌株

試験菌株はネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA の5菌株を用いた。入手した菌株は Ames ら¹⁾ 及び Maron ら²⁾ の方法に従い遺伝的性質を調べた後、遺伝的性質が適切である菌株を保存した。保存は、静止期まで培養した菌前培養液に DMSO を 8.0% になるように加え、凍結用バイアルに小分けし -80°C で保存した。試験には小分けした保存菌株を解凍し、解凍菌液をニュートリエントブロス (OXOID #2) に 1/500 の接種量で植え、37°C で 8 時間振盪培養 (静止期の初期に相当する) した菌前培養液を用いた。

2-2. S9 および S9 mix

S9 mix はフェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導した Sprague-Dawley ラットの肝臓より調製された市販品 (キッコーマン株式会社製造) を購入して用いた。

S9 mix の組成は、4 mM NADPH, 4 mM NADH, 5 mM G-6-P, 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 100 mM ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH7.4), 10% S9 である。

2-3. 処理方法

「新規化学物質に係る試験の方法について」の一部改正等について（環保安第 287 号, 衛生第 127 号, 平成 09・10・31 基局第 2 号平成 9 年 10 月 31 日および環保安第 946 号, 医薬発第 1271 号, 平成 13・11・01 製局第 1 号, 平成 13 年 11 月 21 日）の基準に従い, Ames ら¹⁾ 及び Maron ら²⁾ の方法に準拠し, 以下の示したプレインキュベーション法³⁾ で実施した。

被験物質溶液, 溶媒または陽性対照物質溶液 0.1 mL と S9 mix あるいは 0.1 M Na-リン酸緩衝液 0.5 mL と試験菌株の前培養液 0.1 mL を試験管に入れ, 良く混合し 37°C で 20 分間, 恒温槽中で振盪した(プレインキュベーション)。プレインキュベーションした後, 2 mL のトップアガーを加え, ただちに最少グルコース寒天平板培地 (プレート) 上に広げて固めた。固化したプレートを 37°C で 48 時間, 恒温培養器で上下を転倒し遮光して培養した後, 被験物質の試験菌株への抗菌作用 (生育阻害) 並びに被験物質の沈殿状況を調べ, 復帰変異コロニー数を測定した。

2-4. 判定基準

復帰変異数が用量依存的に上昇しかつ陰性対照値の 2 倍以上に復帰変異コロニー数が誘発され, 用量依存性あるいは再現性が得られる場合に, 陽性と判定した。上記の条件が満たされない場合は陰性と判定した。

陽性結果が得られた場合, 次式を用いて比活性値を算出した。

比活性値 = [(当該濃度での平均コロニー数) - (陰性対照での平均コロニー数)] / 当該濃度値 (mg)

3. 染色体異常試験

3-1. 細胞

試験には, チャイニーズ・ハムスター肺由来の CHL/IU 細胞を用いた。CHL/IU 細胞を, 国立医薬品食品衛生研究所より入手 (1984 年 11 月入手) し, 継代後, 液体窒素 (-196°C) 中に凍結保存した。その細胞 (倍加時間約 18 時間, マイコプラズマの汚染なし) を, 解凍後, 継代 16 および 20 代で試験に用いた。

培養には, 仔牛血清 (CS, Invitrogen Corp.) を 10% 添加したイーグル MEM 培養液を用い, CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 37°C) 内で培養した。

3-2. S9 および S9 mix

フェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導した Sprague-Dawley ラットの肝臓より調製された S9 に, 補酵素を添加した市販品 (S9 mix : キッコーマン株式会社製造) を購入して用いた。

S9 mix 1 mL 中の組成は, G-6-P が 5 μmol/0.1 mL, NADP が 4 μmol/0.1 mL, MgCl₂ が 5 μmol/0.1 mL, KCl が 33 μmol/0.1 mL, HEPES (pH7.2) が 4 μmol/0.2 mL, 蒸留水が 1 mL, S9 が 0.3 mL である。

3-3. 処理方法

「新規化学物質に係る試験の方法について」の一部改正等について（環保安第 287

号, 衛生第 127 号, 平成 09・10・31 基局第 2 号平成 9 年 10 月 31 日および環企第 946 号, 医薬発第 1271 号, 平成 13・11・01 製局第 1 号, 平成 13 年 11 月 21 日) の基準に従い, 石館ら⁴⁾の方法に準拠して以下に示した手順で実施した。

細胞増殖抑制試験では CHL/IU 細胞を細胞培養用マルチプレート 12 ウェルに播種 (8×10^3 個/well) し, 染色体異常試験では組織培養用シャーレに播種 (4×10^4 個/6 cm dish) した。それぞれ 3 日間培養した後, プレートあたり被験物質液を 1 vol% 添加し, 短時間処理法および連続処理法による処理を行った。短時間処理法では, 培地交換したのち, S9 mix 非添加および添加条件下で既存天然添加物を加えて 6 時間処理した。処理終了後, 細胞をダルベッコリン酸緩衝液で洗浄し, 培養液でさらに 18 時間培養した。また, 連続処理法では, 被験物質を加えて 24 時間連続処理した。

3-4. 細胞増殖抑制作用の測定

細胞増殖抑制作用測定の各ウェルについては, 10 vol%ホルマリン溶液で固定し, 0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。色素溶出液 (30%エタノール+1%酢酸) を各ウェルに加えて 5 分間放置した後, 分光光度計を用いて 580 nm の吸光度を測定した。陰性 (溶媒) 対照群と比較した各処理群の相対増殖率を計測算出し, 増殖率の指標とした。染色体異常試験においては ATP フォトメーターを用いて細胞増殖に関するデータを採取した。

3-5. 染色体標本の作製

培養終了の 2 時間前にコルセミドを最終

濃度が $0.2 \mu\text{g/mL}$ となるように添加した。培養終了後, 0.25%トリプシン液をプレートあたり 2 mL 加えて細胞をはがし, 遠心分離 (1000 rpm, 5 分) 後, 37°C に暖めておいた 5 mL の 0.075 mol/L KCl 水溶液を加え, 約 16 分間低張処理を行った。低張処理後, 固定液 (メタノール: 酢酸 = 3 : 1 (v/v)) を加えて細胞を固定した。細胞浮遊液をスライドガラス上に滴下し, 乾燥させた。スライド標本を 1.2%ギムザ液 (pH 6.8 の $1/100 \text{ mol/L}$ ナトリウム・リン酸緩衝液で希釈調製) で染色し, 水洗後, 乾燥させた。

3-6. 染色体分析

染色体異常の分析は, 標本をコード化して, 処理条件が分からない状態で行った。

プレートあたり 100 個の分裂中期像を顕微鏡下で観察し, 染色体の構造異常の有無を分析し, 異常の種類別に記録した。ギャップについては, 染色分体幅よりも狭い非染色性部位と定義し, 構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

また, プレートあたり 100 個の分裂中期像を観察し, 倍数性細胞の出現数についても計数した。

3-7. 判定基準

染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群と比較して明らかに増加し, 濃度依存性又は再現性が得られる場合に, 陽性と判定した。

陽性結果が得られた場合, D_{20} 値 (観察細胞の 20%に何れかの異常がみられる濃度: $\mu\text{g/mL}$) を算出した。

4. マウスリンフォーマ TK 試験

4-1. 細胞

試験細胞株としてマウスリンパ腫細胞株 (L5178Y *tk*^{+/-} 3.7.2C) を選択した。1994年6月16日に財団法人食品薬品安全センターから本細胞の分与を受け DMSO を容量比で 10% 添加した後、液体窒素中で保存した。

培養には RPMI 1640 液体培地 (IWAKI : 旭テクノグラス株式会社) 971.8 mL に、ピルビン酸ナトリウム溶液 (11 mg/mL) 18.2 mL およびペニシリン-ストربتマイシン溶液 (Invitrogen Corp., ペニシリン : 10000 単位/mL, ストレプトマイシン : 10000 μ g/mL) 10 mL を用いた。

4-2. S9 および S9 mix

G-6-P (ロッシュ・ダイアグノスティック株式会社) 180 mg/mL 水溶液および NADP (ロッシュ・ダイアグノスティック株式会社) 25 mg/mL 水溶液を調製し、フィルター濾過除菌した後、等量を混合した。さらに 150 mmol/L 塩化カリウム溶液を、先の混合液の 1/2 容量加え補酵素溶液とした。補酵素溶液と S9 を所定量 (3 : 2) 混合し、試験に使用した。

4-3. 処理方法

ICH ガイドライン⁵⁾に従い、以下に示した手順で実施した。

容量 30 mL のポリプロピレン製コニカルチューブに、R-10 培養液を用いて 1×10^6 細胞/mL に調製した細胞浮遊液 5 mL を分注する。次いで 3.5 mL の R-0 培養液および 150 mmol/L 塩化カリウム溶液あるいは S9 mix を 0.5 mL 添加し、陰性対照あるいは被験物質液 1 mL を加える。引き続き低速斜面振盪

機 (FY-2 : 東京硝子株式会社, 17.5 往復/分) を用いて 37°C の条件で 3 時間振盪培養した。培養終了後、細胞を培養液で 1 回洗浄し、細胞数を計数した後、 2×10^5 細胞/mL の細胞浮遊液を調製した。細胞培養用マルチプレート (96 ウェル) の各ウェルに 200 μ L ずつ細胞浮遊液を播種した後、37°C, 5%CO₂ の条件で 10~14 日間培養した。先の細胞浮遊液をフラスコ (培養面積 75 cm²) に移し、37°C, 5%CO₂ の条件で 48 時間培養した。培養開始後 20~24 時間に培養液の一部を分取し、処理群ごとの細胞数をフローサイトメータ (MICROCYTE[®]: Optoflow AS) あるいは血球計算盤を用いて計数した。さらに、培養終了時 (培養開始後 45~48 時間) についても同様に細胞数を計数した。

4-3. 細胞生存率の算出 (用量設定試験)

各処理群につき、1 ウェル当たりの播種細胞数におけるコロニー形成率 (平板効率 : PE ; Plating efficiency) をポアソン分布の式に従い算出した。次に、陰性対照群でのコロニー形成率を 100% とし、陰性対照群に対する各用量群でのコロニー形成率の比を細胞生存率 (RS : Relative Survival) として算出した。最終的に 1 日当たりの細胞増加率および培養期間中の細胞増加率 (RSG : Relative Suspension Growth) を以下のように求めた。

4-4. 突然変異コロニーの選択

用量設定試験とほぼ同様の手順でプレートを準備した。ただし、突然変異頻度測定用のプレートには 3 mg/mL のトリフルオロチミジン (TFT : Sigma Chemical Co.) 溶液を最終濃度で 3 μ g/mL となるように添加

した。培養終了後、各プレートにつき、コロニーの有無を判定し、コロニー未形成のウェル数を計数した。突然変異観察頻度を処理後 2 日のコロニー形成率 (PE2) で除することにより、突然変異率 (MF: Mutant frequency) を求めた。

陽性結果が得られた場合、対照群に対する MF 倍数を算出した。

(倫理面の配慮)：本研究は細菌あるいはほ乳類培養細胞を用い *in vitro* 条件下にて試験を行っていることから、動物愛護上の配慮ならびにヒト組織利用の倫理上問題となることはない。

C. 結果

18 種類の抗菌剤に関する細菌を用いる復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、およびマウスリンフォーマ TK 試験に関する情報を表 2 に示す。表 2 において数字の入っているものが陽性であり、「—」は陰性、空欄は情報が得られなかったことを示している。

細菌を用いる復帰突然変異試験で陽性となったものは TCC, BECDIP, TCMTBT, DMO の 4 種類のみであった。その内、TCC は比活性値が非常に高く、強い遺伝子突然変異を誘発する作用のあることを示している。一方、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験に関しては、TCC, HO, TMBCDPB, HMBCDPB のみが陰性でその他の 14 種類の抗菌剤は陽性の結果であった。マウスリンフォーマ TK 試験の成績があるのは TCC, IBTA, BIT, TPN の 4 種の抗菌剤についてであり、全て陽性の結果を示している。この

うち、TCC 以外の 3 種は細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性であり、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性であった。TCC に関してはほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で陰性であり、遺伝子突然変異誘発作用が強いものと考えられた。

表 2 比活性値 (細菌を用いる復帰突然変異試験)、D₂₀ 値 (ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験)、対照群に対する突然変異率の倍数 (マウスリンフォーマ TK 試験)

化合物	比活性値	D ₂₀ 値	倍率
HICHO	—	0.00030	
TCC	3563941	—	3.0
IBTA	—	0.13	5.3
BIT	—	0.062	5.2
TPN	—	0.0012	10.1
IPBC	—	0.0090	
OBPA	—	0.023	
CPIP	—	0.049	
BECDIP	5270	0.0035	
HO	—	—	
TCMSP	—	0.0089	
BBIT	—	0.0053	
TCMTBT	700	0.015	
TMBCDPB	—	—	
BNPD	—	0.032	
DMO	4922	0.013	
HMBCDPB	—	—	
ZPT	—	0.00038	

—：陰性、空欄は試験未実施

D. 考察

遺伝毒性には大きく分けて 2 つの指標がある。すなわち遺伝子突然変異と染色体異常誘発性である。化学物質の遺伝毒性を検討する

場合、少なくともこれら2つの指標を試験する必要がある。現在最も一般的に用いられているのは、細菌を用いる復帰突然変異試験（エイムス試験）およびほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で、化学物質の性質としての遺伝毒性を *in vitro* で検討するものである。また、生体内での反応を見るためには、げっ歯類を用いる小核試験が一般的であり、染色体異常誘発性を評価している。通常、以上の3試験を組み合わせてバッテリーとして総合的な評価に用いる場合が多い。

医薬品に関してはこれらの試験の国際的調和が図られており、組み合わせについての合意も得られている。医薬品においても、抗生物質のように細菌を死滅させる目的の化学物質が有り、その遺伝毒性評価には細菌を用いる復帰突然変異試験はなじまないことが明記されている。細菌に特有な構造等を標的とする場合には、細菌以外の生物を用いての試験が必要となる。この場合、ほ乳類培養細胞を用いる突然変異試験が有効な場合が多い。その一つとして、マウスリンフォーマ TK 試験が国際的にも広く用いられている。さらに、マウスリンフォーマ TK 試験は遺伝子突然変異と染色体異常誘発性の両者を検出出来る試験系としても知られている。従って、家庭用品においても抗菌剤の遺伝毒性を評価するには、通常バッテリー試験に加えて、マウスリンフォーマ TK 試験を実施することが望ましいと考える。今回評価した18化合物についても、細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性でありながら、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験で陽性の結果となっているものが多く認められる。これも、細菌を用いる復帰突然変異試験の限界を示すものと考えることが出来る。さらに、4化合

物のみであるが、マウスリンフォーマ TK 試験で陽性の結果が得られている。TCC に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験でも強い陽性であったが、IBTA, BIT, TPN に関しては細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性であった。また、これら3化合物についてはほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験でも陽性の結果であった。

抗菌作用のない化学物質に関しては、標準的なバッテリー試験を行うことが効率的であると考えられるが、今回の検討結果からもわかるように、マウスリンフォーマ TK 試験を加えることは非常に意義のあるものと考えることが出来る。

E. 結論

家庭用品の遺伝毒性を評価するための試験として、これまでは細菌を用いる復帰突然変異試験とほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験が一般的に用いられてきた。抗菌活性を示さない化学物質に関しては、この組み合わせでハザードとしての遺伝毒性は的確に評価出来るものとする。しかし、抗菌剤に関しては、試験に用いるバクテリア生育を抑えるのが目的の化学物質であり、細菌を用いる復帰突然変異試験では的確な遺伝子突然変異の評価が難しいものとする。ほ乳類培養細胞を用いる遺伝子突然変異を検出する試験系としてマウスリンフォーマ TK 試験が広く使われるようになってきた。家庭用品の抗菌剤を評価する場合にも、標準的な組み合わせにマウスリンフォーマ TK 試験を追加することにより、よりの確な遺伝毒性の評価が可能になる。

F. 引用文献

- 1) Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki (1975): Method for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, 31, 347-364.
 - 2) Maron, D.M. and B.N. Ames (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
 - 3) Matsushima, T., M. Sawamura, K. Hara and T. Sugimura (1976): Safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system, In : F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot (Eds.), "In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing", Elsevier / North-Holland, Amsterdam, pp. 85-88.
 - 4) 石館 基 監修 (1987) : <改定> 染色体異常試験データ集, エル・アイ・シー
 - 5) ICH guideline S2B (1997): Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing for Pharmaceuticals
- G. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Hamada, S., K. Nakajima, T. Serikawa and M. Hayashi (2003) The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay, *Mutagenesis*, 18, 273-275
 - 2) Hamada, S., K. Nakajima, C. Namiki, T. Serikawa, and M. Hayashi (2003) Sex differences in the chemical induction of micronuclei in the rat, *Environ. Mutagen. Res.*, 25, 33-37.
 2. 学会発表
 - 1) Kirkland, D.J., M. Hayashi, J.T. MacGregor, L. Müller, L.M. Schechtman, and T. Sofuni (2003) Summary of major conclusions—the 3rd International Workshop on Genotoxicity Testing—, *Mutat. Res.*, 540, 123-125.
 - 2) Müller, L., D. Blakey, K.L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. MacGregor, J.M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka, D. Tweats, and H. Yamasaki (2003) Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutat. Res.*, 540, 177-181.
 - 1) M. Honma, M. Izumi, M. Sakuraba, S. Tadokoro, H. Sakamoto, W. Wang, F. Yatagai, and M. Hayashi: Deletion, rearrangement, and gene conversion; the genetic consequences of chromosomal double strand breaks in human cells. EEMS, Aberdeen, 2003.
 - 2) M. Hayashi: Advantages and limitations of micronucleus assay- validation studies on in vivo micronucleus assay using other than haemopoietic cells-. 5th International Symposium on Chromosomal aberrations, Essen, 2003.
 - 3) M. Hayashi: Plenary lecture—In vivo micronucleus assay: historical review and

- | | |
|---|-----------------|
| current improvement. JEMS-KEMS Joint Symposium, Seoul, 2003. | 1. 特許取得
なし |
| 4) M. Hayashi: Some topics on risk assessment of carcinogenic chemicals- Mutagenicity testing-. 第30回日本トキシコロジー学会, 神奈川, 2003. | 2. 実用新案登録
なし |
| 5) 林 真: 小核試験. 第17回日本動物実験代替法学会, 神奈川, 2003. | 3. その他
なし |

H. 知的所有権の取得状況

厚生科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

抗菌剤の皮膚感作性および生殖・発生毒性に関する研究

分担研究者 清水 充 大阪市立環境科学研究所 研究主任

研究要旨

近年の清潔志向により抗菌加工製品は日常的に定着化しつつあるが、抗菌剤の安全性に関して十分に検討されているとはいえない。抗菌加工製品に使用されている抗菌剤への接触を原因とするアレルギー性皮膚炎は、重要な健康障害問題のひとつである。そこで、20種の抗菌剤の皮膚感作性をモルモットマキシミゼーション法を用いて調べたところ16種が陽性反応を示した。これらの抗菌剤の陽性反応を示した動物の比率に従ってMagnusson and Kligman（1969）法に基づく感作性物質の程度を比較すると、グレードⅠ（弱い感作性物質）が1種、グレードⅡ（軽度な感作性物質）が2種、グレードⅢ（中等度の感作性物質）が2種、グレードⅤ（非常に強い感作性物質）が11種となった。さらに、感作性リスクをより定量的に評価するために、Nakamuraらによる改良法を用いて個々の抗菌剤の感作誘導および惹起反応に関する用量反応性を検討した。その結果、16種の抗菌剤について感作誘導の用量反応性の特性はA. 最高濃度群でのみ陽性反応がみられるグループ、B. 一次誘導濃度に対して皮膚反応が単純に増加するグループ、C. 一次誘導濃度に対して皮膚反応が増加するが、最高濃度では反応が低下するグループの3つのグループに分かれた。これらの抗菌剤の最低感作誘導濃度は0.5 ppm から5000 ppmの濃度範囲にわたった。また、最も強く感作した群を用いて惹起反応の用量反応性を検討したところ、惹起濃度の対数値と皮膚反応平均評価点との間に良好な関係性のある回帰直線が得られた。すなわち、惹起反応の評価に際しては惹起閾値濃度のみならず回帰直線の傾きも考慮することにより、感作性リスクをより定量的に評価できると考えられた。

抗菌剤の安全性に関して生殖・発生毒性、とくに催奇形性は重要である。そこで各種の抗菌剤を妊娠ラットの器官形成期に投与した催奇形性試験について整理および評価を行った。その結果、抗菌剤9種中1種にラット胎児に骨格奇形を誘発する可能性が示唆された。これらの抗菌剤の妊娠動物に対するNOAEL（無毒性量）は2.7 mg/kg から300 mg/kgの投与量の範囲であった。また、抗菌剤のラット胎児に対するNOAELも2.7 mg/kg から300 mg/kgの投与量の範囲であった。しかし、妊娠動物に対するNOAEL/胎児に対するNOAEL比（A/D比）はいずれも1以下であった。

以上のように、抗菌加工製品に使用される抗菌剤に関する皮膚感作性および催奇形性の評価は抗菌剤の安全性確保に重要であることが示唆された。

1. 抗菌剤のモルモットマキシミゼーション法による皮膚感作性の整理と評価

—抗菌加工製品中の皮膚感作性物質の検索法の確立と実際例への適用—

A. 研究目的

家庭用品に種々の目的で使用されている化学物質への接触を原因とするアレルギー性皮膚炎は、重要な健康障害問題のひとつである。低分子の化学物質が皮膚感作を引き起こすためには、生体内でまず高分子のタンパク質と結合し、免疫源として認識される必要がある。多くの抗菌剤はその固有の性質として内在タンパク質との反応性を有しており、このことは抗菌剤が皮膚感作性を有する可能性を示唆している。実際、医薬品、化粧品をはじめ身の回りのゴム製品や繊維製品に使用されている種々の抗菌剤を原因とする皮膚感作事例が報告されている (Jacobs et al., 1995; Schnuch et al., 1998; 鹿庭, 1999)。生体が皮膚感作性の化学物質に暴露されると、まずこれを認識するTリンパ球が誘導され、その後の再暴露時にこの感作Tリンパ球を中心とした一連の免疫応答が発現し、発赤、かぶれなどの皮膚反応が惹起されることになる。従って抗菌加工製品のリスクを評価するためには、個々の抗菌剤の感作誘導および惹起反応に関する用量反応性を明らかにすることが重要になる。

感作性を評価する動物実験の標準法として、モルモットマキシミゼーション法 (GPMT) がある。GPMT は高感度に感作性を検出できる反面、結果は定性的に表現されるという欠点がある。Nakamura ら (1994) は、GPMT の原法を改良し、感作誘導および惹起反応の用量反応性を評価する手法を提案した。

本研究の目的は、抗菌加工製品中の皮膚感作性物質の検索法の確立とその実際例への適用を図ることであり、今年度の報告では、Nakamura らの多用量モルモットマキシミゼーション法による皮膚感作性試験の定量的評価法を用いてこ

れまでに検討した 20 種の抗菌剤の感作性 (皮膚感作性に関する抗菌剤関連論文リスト参照) について、その成績を整理して評価した。

B. 実験方法

1. 被験物質

試験に用いた 20 種の抗菌剤を表 1 に示した。

2. 使用動物

日本 SLC (株) より Std:Hartley 系雌モルモットを購入し、6 週齢で実験に用いた。

3. 多用量モルモットマキシミゼーション法 (GPMT、図 1)

GPMT は、皮内注射 (第 1 次誘導) および閉塞貼付 (第 2 次誘導) による 2 回の感作誘導と、第 2 次誘導の 2 週間後に 4~6 段階の濃度の被験物質を一度に開放塗布し、各濃度における免疫反応 (紅斑、浮腫の発現) の程度を判定する惹起暴露より構成されている。皮膚反応の判定は佐藤らの評価法 (1981) に従って惹起 48 時間後に行い、各部位の皮膚反応を 0 点 (反応なし) から 7 点 (強度の紅斑と浮腫) までの 8 段階に採点した。さらに採点をもとに陽性反応率 (惹起濃度別の陽性反応動物の群内% : SR)、平均評価点 (惹起濃度別の皮膚反応評価点の群内平均値 : MR) を算出し皮膚反応の定量的指標とした。

C. 実験結果

20 種の抗菌剤の感作性を Nakamura らの改良法で検討したところ、16 種が陽性反応を示した (表 2)。Magnusson and Kligman (1969) の原法では、陽性反応を示した動物の比率に従って感作性物質を 5 つの等級に分けている。今回の成績をこの基準に当てはめると、グレード I (弱い感作性物質) が 1 種、グレード II (軽度な感作性物質) が 2 種、グレード III (中等度の感作性物質) が 2 種、グレード V (非常に強い感作性物質) が 11 種となった。

陽性反応を示した抗菌剤のうち、7 種の抗菌

剤では一次誘導を溶媒処置とし、二次誘導に最高濃度を適用した場合にも陽性反応がみられるという特性を示した。即ち、これらの場合には二次誘導を最高濃度で固定すると一次感作誘導濃度に関する用量反応性を検討できないことになる。そこで、これらの感作誘導に関する用量反応性の検討に際しては、二次誘導を最高濃度に固定せず、一次誘導濃度と同一濃度として変化させる手法を用いた。

図2にこれまでに感作誘導濃度に関する用量反応性を調べた12種の抗菌剤の成績を示した。図で横軸は各抗菌剤の一次感作誘導濃度の対数値であり、縦軸は各感作群をそれぞれの抗菌剤の非刺激性の最高濃度で惹起した時の48時間後の皮膚反応の平均評価点(MR)示している。感作誘導の用量反応性の特性は以下の3つのグループに分かれた。

- A. 最高濃度群でのみ陽性反応がみられるグループ
- B. 一次誘導濃度に対してMR値が単純に増加するグループ
- C. 一次誘導濃度に対してMR値が増加するが、最高濃度では反応が低下するグループ

図3に各種抗菌剤の最低感作誘導濃度の分布をグラフ化した。最も強いTPNの0.5 ppmから最も弱いDMOの5000 ppmまで(Log%で表記すると-4.3から-0.3)の10000倍の濃度範囲での分散がみられた。最低感作誘導濃度(Log%)が-3.5から-2.0の範囲と-0.5から0.0の2つの範囲に比較的多くの抗菌剤が集中する傾向がみられた。

次に惹起反応に関する用量反応性について検討した。図4に典型的な用量反応性がみられた6種の抗菌剤についての、それぞれの最も強く感作が成立した群における惹起濃度と各惹起濃度での皮膚反応の平均値との関係を示した。図に示すように、皮膚反応平均評価点を惹起濃度の対数値に対してプロットすると良好な直線性

のある回帰直線が得られた。この直線の横軸との切片を求めることにより、惹起反応に関する閾値濃度を求めた(表2)。図5に各種抗菌剤の惹起閾値濃度の分布をグラフ化した。最も強いTPNの0.5 ppmから最も弱いDMOの28300 ppmまで(Log%で表記すると-4.0から0.5)の約50000倍の濃度範囲でほぼ均一な分布がみられた。

D. 考察

1. 感作誘導能の評価

GPMTの原理は検体の皮内投与(一次誘導)および閉塞貼付(二次誘導)の2回の処置によりTリンパ球を誘導し、その後検体を皮膚に適用して惹起される皮膚反応を評価するものである。Magnusson and Kligman(1969)の原法では一次誘導、二次誘導および惹起暴露にそれぞれ適用可能な最高濃度を用いることになっており、従って定量的な評価が出来ない。また原法に従った感作性物質の等級分けを今回の20種の抗菌剤に当てはめると著しい偏りが認められ、さらに詳細な検討が必要と考えられた。Nakamuraらによる改良法(1994)では、一次誘導に公比10で変化する複数の投与群を設定し、また惹起反応の評価に際しては溶媒に溶かした公比10で変化する複数濃度の検体を同時に塗布するとしている(この時、二次誘導処置には用いることの出来る最高濃度を常に適用するとしている)。この方法により、一次誘導処置濃度および惹起暴露濃度に関する用量反応性が検討できる。

20種の抗菌剤の感作性をNakamuraらの改良法で検討したところ、16種が陽性反応を示した。ところがその中で7種の抗菌剤では一次誘導を溶媒処置とし、二次誘導に最高濃度を適用した場合に陽性反応がみられるという特性を示した。即ち、これらの場合には二次誘導を最高濃度で固定すると一次感作誘導濃度に関する用量反応性を検討できないことになる。従って予備試験において上記のような特性を示した物質

の感作誘導用量反応性の評価に際しては、二次誘導濃度を固定せず、一次誘導と同濃度として複数の群を設定する必要がある。

図1のCグループのように最高濃度群が必ずしも最も強く感作されない抗菌剤では、高濃度処置をした場合に明らかな壊死反応が起こらないまでも、局所の免疫応答が阻害されている可能性が考えられる。いずれにせよこの様に複数の感作誘導群を設定することにより、最高無感作濃度、最低感作濃度を求めることが出来る。また、惹起反応の用量反応性の検討には、設定した複数の感作誘導群の中で、最も強く感作が成立した群を用いる必要があり、このためにも、誘導濃度に対する用量反応性を詳細に検討することは重要である。

2. 惹起力価の評価

これまでに陽性反応がみられたいずれの抗菌剤に関しても、それぞれの最も強く感作が成立した群を用いて、横軸を惹起に用いた濃度の対数値、縦軸を各惹起濃度に対する皮膚反応平均評価点としてプロットすると良好な直線性のある回帰直線が得られた。Nakamura らは惹起力価の指標として、最高誘導濃度で感作された群において皮膚反応平均評価点1を与える惹起濃度 (b 値) を用いることを推奨している。しかしながら図2に示すように、各抗菌剤の回帰直線の傾き、即ち、惹起濃度の増加に対する皮膚反応の増加の度合いは抗菌剤によって大きく異なっている。このことは、惹起閾値濃度やあるいはNakamura らのb 値が同一の感作性物質であっても、ある濃度範囲の中でのトータルの危険性には隔たりがある可能性を示唆している。そこで我々は、感作性物質の相対的惹起力価の指標として回帰直線グラフにおける閾値濃度から惹起濃度 1% に及ぶ濃度範囲での直線下面積を用いることを提案した (Yamano et al., 2001)。この値はある感作性物質への惹起暴露濃度が閾値から 1% (現実的的最大暴露濃度) にまで変化すると考えた時の皮膚反応の累積値 (積分値)

を示しており、閾値濃度が低い程、また傾きが大きいほど大きな値を取ることになり、惹起反応に関する個々の物質の特性をよく反映すると考えられる。

E. 結論

モルモットマキシミゼーション法の Nakamura らによる改良法を用いて 20 種の抗菌剤の皮膚感作性を評価した結果以下の結論を得た。

1. 20 種中 16 種が陽性反応を示した。
2. 感作誘導の用量反応性検討のための群設定に際しては、第 2 次誘導濃度を最高濃度で固定するか、あるいは第 1 次誘導濃度と同一濃度として変化させるかの区別をする必要がある。
3. 惹起反応の用量反応性の評価に際しては、感作誘導の用量反応性検討のために設定した複数の群の中で最も強く感作した群を用いる必要がある。
4. 惹起反応において惹起濃度の対数値と皮膚反応平均評価点との間には良好な関係性のある回帰直線が得られる。惹起反応の評価に際しては惹起閾値濃度のみならず、回帰直線の傾きも考慮することにより、より多くの情報が得られると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamano T, Shimizu S, Noda T.: Allergenicity evaluation of p-chloro-m-cresol and p-chloro-m-xyleneol by non-radioactive murine local lymph-node assay and multiple-dose guinea pig maximization test. Toxicology 2003; 190: 259-266.

2. 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充. 家庭用品に使用される化学物質の感作性試験 (VI) 抗菌剤 2-chloroacetamide,

2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol, zinc bis (2-pyridylthio-1-oxide)のモルモットにおける皮膚感作性. 生活衛生 2004: 48: 396-406.

2. 学会発表

1. 家庭用品に使用される抗菌剤

2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine の皮膚感作性. 野田勉, 山野哲夫, 清水充, 第40回全国衛生化学技術協議会年会 (2003)

G. 知的財産権の出願・登録の状況 なし

参考文献

1. Jacobs M C, White I R, Rycroft R J G, Taub N. : Patch testing with preservatives at St John's from 1982 to 1993. Contact Dermatitis 1985: 33: 247-254.
 2. Magnusson B, Kligman A M.: The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. J Invest Dermatol 1969: 52: 268-276.
 3. Nakamura A, Momma J, Sekiguchi H, Noda T, Yamano T, Kaniwa M, Kojima S, Tsuda M, Kurokawa Y.: A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test. Contact Dermatitis 1994: 31: 72-85.
 4. Sato Y, Katsumura Y, Ichikawa H, Kobayashi T, Kozuka T, Morikawa F, Ohta S. : A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. Contact Dermatitis 1981: 7: 225-237.
 5. Schnuch A, Geier J, Uter W, Frosch P J. : Patch testing with preservatives, antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicentre study. Br J Dermatol 1998: 138: 467-476.
 6. Yamano T, Shimizu S, Noda T. : Relative elicitation potencies of seven chemical allergens in the guinea pig maximization test. J Health Sci 2001: 47: 123-128.
 7. 鹿庭正昭 : 家庭用品と皮膚感作性, 中毒研究, 12, 269-274 (1999)
- これまでの皮膚感作性に関する抗菌剤関連論文リスト
1. 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充. : 家庭用品に使用される化学物質の感作性試験 (III) 2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile(TPN), 1,2-benzisothiazolin-3-one(BIT), 2-hydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one(HICHO) および 2,5-di-tert-amylhydroquinone(DAHQ)のモルモットにおける皮膚感作性. 大阪市環境科学研報告 1998: 60: 24-34.
 2. 野田 勉, 清水 充. 抗菌剤ヒバ油の安全性試験 1.皮膚感作性試験. 生活衛生 2000: 44: 13-19.
 3. 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉.: 家庭用品に使用される化学物質の感作性試験(IV) 3種のハロゲン系抗菌剤, 3-iodo-2-propyl butylcarbamate (IPBC), p-chlorophenyl-3-iodopropargilfomyl (CPIP) および bromo-3-ethxycarbinyloxy-1,2-diiodo-1- propene (BECDIP)のモルモットにおける皮膚感作性. 生活衛生 2000: 44: 129-138.
 4. 野田 勉, 清水 充.: 抗菌剤 N-n-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one の安全性試験 1.皮膚感作性試験. 生活衛生 2001: 45: 137-142.
 5. Yamano T, Shimizu S, Noda T: Allergenicity evaluation of N-(1-methylheptyl)-N'-phenyl-p-phenylenediamine and 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole by the guinea pig maximization test. J Health Sci 2001: 47: 331-338.
 6. 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉. :家庭用品に使用される抗菌剤の感作性試験 (V) 4,4'-(tetramethylenedicarbonyldiamino) bis

(1-decylpyridinium bromide)および
N,N'-hexamethylene bis (4-carbamoyl-1-
decylpyridinium bromide)のモルモットにおけ
る感作性試験. 大阪市環境科学研報告 2002:
64: 1-5.

7. 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉:
10,10'-oxybis-10H-phenoxarsine を含む抗菌剤
のモルモットにおける感作性試験. 大阪市環境
科学研報告 2002: 64: 54-57.

8. Yamano T, Shimizu S, Noda T. :
Allergenicity evaluation of p-chloro-m-cresol
and p-chloro-m-xyleneol by non-radioactive
murine local lymph-node assay and
multiple-dose guinea pig maximization test.
Toxicology 2003: 190: 259-266.

9. 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充. :家庭用品に使
用される化学物質の感作性試験(VI) 抗菌剤
2-chloroacetamide, 2-bromo-2-nitropropane-
1,3-diol, zinc bis (2-pyridylthio-1-oxide)のモルモ
ットにおける皮膚感作性. 生活衛生 2004: 48:
396-406.

研究協力者

大阪市立環境科学研究所

野田 勉

大阪市立環境科学研究所

山野哲夫