

表6. 各種毒性試験の結果

Chemical	CAS number	Acute toxicity*		Cytotoxicity		Irritation*		Skin sensitization (GPMT)			Gene mutation					
		Oral (mg/kg)		Dermal or Inhalation	IC50 (µg/ml)	Classification	Skin	Eye	MID (ppm)	SR (%)	MED (ppm)	Test data			RTECS data*	
		Rat	Mouse								A	B	C	A	B	D
BNPD	52-51-7	180	270	○	7.7	Strong	Moderate		5000	10	5000	×	○			
OBPA	58-36-6	40	42	○	4.2	Strong	Severe					×	○			
PCMC	59-50-7	1830	600		89.9	Moderate			5	100	50				○	
CAA	79-07-2	138	155		47.5	Moderate			500	100	1600				○	
PCMX	88-04-0	3830			37.0	Moderate		Moderate	5	90	5000				○	
HICHO	499-44-5	500		○	29.0	Strong							○			
DMPFS	1085-98-9	500	1250	○	8.7	Strong									○	○
TPN	1897-45-6	10000	3700	○	0.65	Strong			0.5	100	0.5	×	○		○	○
BIT	2634-33-5	1020	1150		4.0	Strong	Mild		50	50	50	×	○		○	
MBIC	10605-21-7	6400	7700	○	23.1	Strong									○	○
ZPT	13463-41-7	177	160	○	0.42	Strong						×			○	
TCMTBT	21564-17-0	2000	445	○	1868	Weak	Moderate	Moderate	10	100	1	○	○			
DMO	51200-87-4	950		○	46.0	Moderate			5000	100	50000	○	○			○
IPBC	55406-53-6				2.9	Strong			5	100	100	×	○			
IBTA	115-31-1	1000			32.3	Strong						×	○			
FPI	719-96-0				14.1	Strong										
TCMSP	13108-52-6		770		1.32	Strong						×	○			
BBIT	4299-07-4				6.6	Strong			5000	20	500		○			
TCC	13208-22-5				407	Weak						○	×	○		
CPIP	29772-02-9				6.2	Strong			5	100	50	×	○			
BECDIP	77352-88-6				1.7	Strong						○	○			
TMBCDPB	Unknown				6.8	Strong			100	100	1000	×	×			
HMBCDPB	Unknown				7.0	Strong			10	100	1000	×	×			
HO	Unknown				16.2	Strong			5000	50	5000	×	×			

\* RTECS上を調査

○は陽性またはデータ有り、×は陰性、空欄は試験未実施

細胞毒性試験(IC50値と強度評価)

Strong  
Moderate  
Weak

GPMT  
MID: 最低感作濃度  
SR: 感作率  
MED: 最低惹起濃度

変異原性試験

A: 細菌を用いる復帰突然変異試験  
B: 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験  
C: マウスリンフォーマTK試験  
D: 動物を用いたin vivo投与試験

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・第三試験室長）

要旨

本研究の目的は、家庭用品として用いられている抗菌剤に関する遺伝毒性の評価について、その被験物質の特異性を考慮した戦略を構築することにある。一般に医薬品をはじめ、化学物質の遺伝毒性を評価する場合には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、げっ歯類を用いる小核試験が標準的な組み合わせとして試験、評価がなされている。しかし、抗菌剤に関しては、それ自体のもつ効能としての抗菌作用があるため、細菌が対象であると遺伝子突然変異を正しく評価できない場合がある。そこで、ほ乳類培養細胞を用いる突然変異試験系を用いることが試みられており、細菌を用いる復帰突然変異試験が適切に実施できない場合に、マウスリンフォーマ TK 試験を行うことが考えられる。両試験に関する情報を整理し、抗菌剤に関する遺伝毒性評価の戦略について検討を行った。

A.目的

家庭用品としての抗菌剤の遺伝毒性を評価する場合、通常は他の家庭用品を含む化学物質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組み合わせ試験の結果を基に遺伝毒性に関する評価がなされてきた。しかし、抗菌剤や殺菌剤についての遺伝子突然変異誘発性を評価するために、細菌を用いる復帰突然変異試験を行うことは、抗菌剤や殺菌剤が本来の作用である抗菌性、殺菌性のため正確な突然変異誘発性の評価を行えない場合がある。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に関して注意

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<sup>1)</sup>、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。遺伝子突然変異誘発性を検出するためのほ乳類培養細胞を用いる試験系の一つにマウスリンフォーマ TK 試験がある<sup>2)</sup>。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。本年度は、細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ TK 試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果の相関性等について検討する。

## B. 方法

最近、1000 種に近い化学物質の *in vitro* 遺伝毒性に関するデータベースが作成された<sup>3)</sup>。データベースは化学物質のがん原性の認められたものと、認められなかったものに大別され、遺伝毒性の基本的なバッテリーを構成する *in vitro* 試験結果をまとめたものである。試験系としては、細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ TK 試験、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験、および *in vitro* 小核試験である。本年度の研究のためのデータベースとしては、試験の指標が同じものであることから、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験と *in vitro* 小核試験をまとめて、*in vitro* での染色体異常誘発性とした。すなわち、どちらかの試験で陽性を示したものを陽性とし、両方の試験系で陰性であったもの、または片方の試験で陰性であるが、他方の試験が行われていないものに関して陰性としてデータベースをまとめなおした。

各試験法の概要を以下に示す。

### 1. 細菌を用いる復帰突然変異試験

試験菌株はネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び大腸菌 (*Escherichia coil*) WP2uvrA の 5 菌株が一般的に用いられている。また、S9 mix はアルクロールまた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ラットの肝臓より調製されるものに、コ

ファクター等を加えたものである。一般的な S9 mix の組成は、4 mM NADPH, 4 mM NADH, 5 mM G-6-P, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl, 100 mM ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH7.4), 10%S9 である。

被験物質溶液、溶媒および陽性対照物質溶液 0.1ml と S9 mix あるいは 0.1M 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、恒温槽中で振盪するプレインキュベーション法、または、直接トップアガーを加える方法が用いられている。固化したプレートに 37°C で 48 時間、恒温培養器で培養した後、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が測定される。

判定基準としては、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、陽性と判定される。

### 2. マウスリンフォーマ TK 試験 (MLA)

マウスリンフォーマ TK 試験には 11 番染色体に存在するチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子をヘテロに持つ (TK+/-) L5178Y3.7.2c-TK+/-細胞が用いられる。S9 mix に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験とほぼ同じものが用いられる。

対数増殖期にある細胞を被験物質で処理し、一定時間細胞を培養し、突然変異体の検出が行われる。MLA は染色体異常試験と同様、短時間処理法、連続処理法が実施される。短時間処理法では 3 時間、連続処理法では 24 時間の被験物質処理が一般的である。被験物質処理後、48 時間の発現時間をおいた後、96 穴プレートにトリフルオロチ

ミジン(TFT)存在下で一定細胞数を播種する。10~13日間細胞を培養後、コロニーを含む穴の数を数え、突然変異誘発率を計算する。

判定基準は、染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群に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、陽性と判定される。

### 3. 染色体異常試験

試験に用いられる細胞に関する規定はないが、ヒトの末梢リンパ球初代培養細胞や、チャイニーズ・ハムスター肺由来の CHL/IU 細胞などが多く用いられている。S9 mix に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験とほぼ同じものが用いられる (S9 mix 1 mL 中の組成は、G-6-P が 5  $\mu$ mol/0.1 mL, NADP が 4  $\mu$ mol/0.1 mL, MgCl<sub>2</sub> が 5  $\mu$ mol/0.1 mL, KCl が 33  $\mu$ mol/0.1 mL, HEPES (pH7.2) が 4  $\mu$ mol/0.2 mL, 蒸留水が 1 mL, S9 が 0.3 mL)。細胞増殖抑制試験を予備試験として実施し、細胞の増殖が 50%抑制される濃度を参考に試験の用量設定がなされる。

染色体標本の作製の一例としては、培養終了の 2 時間前にコルセミドを最終濃度が 0.2  $\mu$ 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 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、乾燥させる。

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われる。通常プレートあたり 100 個 (用量あたり 200 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される。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。

判定基準は、染色体異常をもつ細胞の出現頻度が陰性対照群に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、陽性と判定される。

(倫理面の配慮): 本研究はデータベースを用いての解析研究であるので、倫理上の問題はない。

### C. 結果

全体のまとめをがん原性物質と非がん原性物質に分けて表 1~8 に示す。また、それぞれおよび全体について、細菌を用いる復帰突然変異試験とマウスリンフォーマ TK 試験結果の一致性を表 9 に示す。

表 1 と 5 は、それぞれがん原性物質と非がん原性物質について、細菌を用いる復帰突然変異試験とマウスリンフォーマ TK 試験で共に陽性となった物質の名前と CAS 番号、および in vitro における染色体異常誘発性の結果をまとめてある。

表 2 と 6 は、それぞれがん原性物質と非がん原性物質について、細菌を用いる復帰突然変異試験では陰性の結果であったが、マウスリンフォーマ TK 試験で陽性となった物質の名前と CAS 番号、および in vitro における染色体異常誘発性の結果を、また、

表 3 と 7 には細菌を用いる復帰突然変異試験で陽性、マウスリンフォーマ TK 試験で陰性となったものを示す。表 4 と 8 では、細菌を用いる復帰突然変異試験、マウスリンフォーマ TK 試験共に陰性であったものについてまとめた。

表 9 には、細菌を用いる復帰突然変異試験とマウスリンフォーマ TK 試験の一致率をまとめてある。がん原性物質については 215 化学物質のデータが有り、同一結果を与えた化学物質が 139 種類あった。従って、一致率は 64.7%であった。また、同様に非がん原性物質については 92 化学物質の内一致したものが 50 物質であり、一致率は 54.3%であった。また、両者を合計した全体については、297 化学物質に関するデータがあり、両試験系の結果が一致したものが 189 化学物質であり、その一致率は 63.6%であった。

#### 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。抗菌剤について考えると、そもそも細菌を用いる試験系を適用すること自体に問題があると考えられる。実際、試験菌株に対する抗菌作用が強すぎ、適切な復帰突然変異誘発性に関する情報が得られない場合がある。

医薬品に関しては国際的調和が図られた

中で、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り、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おり、家庭用品においても抗菌剤に関しては、細菌を用いる復帰突然変異試験ではなくマウスリンフォーマ TK 試験を用いることが、より適切な突然変異誘発性に関する情報を提供するものと考えられる。

また、マウスリンフォーマ TK 試験は遺伝子突然変異誘発性のみならず染色体異常誘発性も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、通常の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。

本年度は、細菌を用いる復帰突然変異試験とマウスリンフォーマ TK 試験の相関性について、最近入手したデータベースを用いて検討した。215 種類のがん原性物質に関して、両試験系の結果が一致したものは 64.7%であり、92 種の非がん原性物質に関しての一致率は 54.3%であった。がん原性に関する分類を無視し、合計で見るとその一致率は 63.6%となる。がん原性物質についてみると、陽性結果を与える化学物質の数はマウスリンフォーマ TK 試験で 171 であったのに対し、細菌を用いる復帰突然変異試験では 117 となり、マウスリンフォーマ TK 試験のほうが多くがん原性物質を検出出来ることになる。一方、非がん原性物質を陰性とする特異性に関し

ても、92 非がん原性物質の内マウスリンフォーマ TK 試験で陰性となったものが 39, 細菌を用いる復帰突然変異試験で陰性となったものが 71 であり、この面においては細菌を用いる復帰突然変異試験が優れていることとなった。ただし、これらの解析結果は、用いるデータベースに依存するところが大きく、これらの結果のみを持ってマウスリンフォーマ TK 試験が優れているとの結論を出すのは早計であろう。

さらに、マウスリンフォーマ TK 試験はほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験の代替法として使われることもあり、応用範囲の広い試験系であると考えられる。ただし、本誌検法も細胞毒性に関してはかなりセンシティブで、細胞毒性が強くなるようなところでの陽性結果は慎重に判断する必要がある。細胞の生存率が 10%を下回るような用量での陽性結果は、生物学的な意義に乏しいと考えられており、総合的に判断する必要がある。

## 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、細菌を用いる試験系で、復帰突然変異誘発性を正確に評価できるとは考えがたい。そのため、細菌を用いる復帰突然変異試験の代替法としてマウスリンフォーマ TK 試験が考えられる。これら両試験の結果の一致率に関しては、全体で 63.6%であり、また、より多くのがん原性物質に対して陽性結果を与えることが

判明し、ハザード同定法としては適用可能なものとする。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) Müller, L., Kikuchi, Y., Probst, G., Schechtman, L., Shimada, H., Sofuni, T., and Tweats, D. (1999) ICH-harmonised guidances on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact, *Mutat. Res.*, 436, 195-225.
- 2) Honma, M. and Sofuni, T. (2001) The mouse lymphoma assay (MLA) using the microwell method: in W.N Choy ed., *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*, Marcel Dekker, Inc., New York・Basel.
- 3) Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L. and Müller, L. (2005) Evaluation of the ability of a battery of 3 *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I. Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutat. Res.* (in press)

## 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
2. 学会発表
- 1) M. Hayashi: Newly development of in vivo micronucleus assay . ASIATOX III , Chiang Mai, 2004.
- 2) M. Hayashi: Strategy for safety assessment of food and related chemicals based on genotoxicity assay data. International Symposium on Risk Assessment Strategy in Genotoxicity of Food and Related Substances, Tokyo, 2004.
- 3) M. Hayashi: Regulatory perspective on data gaps in Japan, HESI Workshop on DNA Adducts: Biological Consequences and Application to Risk Assessment, Washington DC, 2004.
- 4) 林 真:げっ歯類を用いる小核試験の基礎研究ならびにその行政面への応用, 第33回日本環境変異原学会, 長崎, 2004.
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表1 Ames試験陽性, MLA試験陽性のがん原性物質

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	CA/MN
1	C.I. Basic red 9 (pararosaniline HCl)	569-61-9	+	+	-
2	C.I. Disperse yellow 3	2832-40-8	+	+	-
3	1,3-dichloropropene (AKA Telone II)	542-75-6	+	+	-
4	Dimethylvinyl chloride	513-37-1	+	+	-
5	2,4-dinitrotoluene	121-14-2	+	+	-
6	4,4'-methylenebis(N,N-dimethylaniline)	101-61-1	+	+	-
7	Nitrofen	1836-75-5	+	+	-
8	Pentachloroanisole	1825-21-4	+	+	-
9	2,4-toluene diisocyanate	584-84-9	+	+	-
10	N-acetoxy-2-acetylaminofluorene	6098-44-8	+	+	+
11	2-Acetylaminofluorene	53-96-3	+	+	+
12	Acrylonitrile	107-13-1	+	+	+
13	4-aminobiphenyl	92-67-1	+	+	+
14	2-amino-4-nitrophenol	99-57-0	+	+	+
15	4-amino-2-nitrophenol	119-34-6	+	+	+
16	2-amino-5-nitrothiazole	121-66-4	+	+	+
17	5-azacytidine	320-67-2	+	+	+
18	Benzidine	92-87-5	+	+	+
19	Benzidine 2HCl	531-85-1	+	+	+
20	Benzo[a]pyrene	50-32-8	+	+	+
21	Benzyl chloride	100-44-7	+	+	+
22	Bis(2-chloro-1-methylethyl)ether, technical grade	108-60-1	+	+	+
23	Calcium chromate	13765-19-0	+	+	+
24	Captan	133-06-2	+	+	+
25	Chloral hydrate	302-17-0	+	+	+
26	3-(chloromethyl)pyridine HCl	6959-48-4	+	+	+
27	C.I. Disperse blue 1	2475-45-8	+	+	+
28	C.I. Disperse orange 2 (1-amino-2-methyl-anthrquinone)	82-28-0	+	+	+
29	Cyclophosphamide monophydrate	6055-19-2	+	+	+
30	Cytembena	21739-91-3	+	+	+
31	2,4-diaminoanisole sulphate	39156-41-7	+	+	+
32	2,4-diaminotoluene	95-80-7	+	+	+
33	1,2-dibromo-3-chloropropane	96-12-8	+	+	+
34	1,2-dibromoethane	106-93-4	+	+	+
35	Dichloroacetic acid	79-43-6	+	+	+
36	Dichloromethane	75-09-2	+	+	+
37	2,6-dichloro-p-phenylenediamine	609-20-1	+	+	+
38	1,2-dichloropropane	78-87-5	+	+	+
39	Dichlorvos	62-73-7	+	+	+
40	Diglycidyl resorcinol ether, technical grade	101-90-6	+	+	+
41	7,12-dimethylbenz[a]anthracene	57-97-6	+	+	+
42	3,3'-dimethylbenzidine	119-93-7	+	+	+
43	Dimethylcarbamoyl chloride	79-44-7	+	+	+
44	Dimethyl hydrogen phosphite	868-85-9	+	+	+
45	Epichlorhydrin	106-89-8	+	+	+
46	1,2-epoxybutane	106-88-7	+	+	+
47	Ethyl methanesulphonate	62-50-0	+	+	+
48	Formaldehyde	50-00-0	+	+	+
49	Furylfuramide (AF-2)	3688-53-7	+	+	+
50	Glycidol	556-52-5	+	+	+
51	Hydrazine sulphate	10034-93-2	+	+	+
52	Hydrogen Peroxide	7722-84-1	+	+	+
53	Methylazoxymethanol acetate	592-62-1	+	+	+



表1 Ames試験陽性, MLA試験陽性のがん原性物質 (続き)

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	CA/MN
54	3-methylcholanthrene	56-49-5	+	+	+
55	4,4'-methylenedianiline 2HCl	13552-44-8	+	+	+
56	Methyl methanesulphonate	66-27-3	+	+	+
57	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	70-25-7	+	+	+
58	Mitomycin C	50-07-7	+	+	+
59	2-naphthylamine	91-59-8	+	+	+
60	o-Nitroanisole	91-23-6	+	+	+
61	5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone (AKA Nitrofurazone)	59-87-0	+	+	+
62	1-[(5-nitrofurfurylidene)amino]hydantoin (AKA Nitrofurantoin)	67-20-9	+	+	+
63	Nitrogen mustard	51-75-2	+	+	+
64	2-nitro-p-phenylenediamine	5307-14-2	+	+	+
65	4-nitroquinoline-N-oxide	56-57-5	+	+	+
66	N-nitrosodiethylamine (diethylnitrosamine)	55-18-5	+	+	+
67	N-nitrosodimethylamine (dimethylnitrosamine)	62-75-9	+	+	+
68	p-Nitrosodiphenylamine	156-10-5	+	+	+
69	N-nitroso-N-methylurea	684-93-5	+	+	+
70	4,4'-oxydianiline	101-80-4	+	+	+
71	Phenobarbital	50-06-6	+	+	+
72	o-Phenylphenol	90-43-7	+	+	+
73	beta-Propiolactone	57-57-8	+	+	+
74	1,2-propylene oxide	75-56-9	+	+	+
75	Quercetin	117-39-5	+	+	+
76	p-Quinone dioxime	105-11-3	+	+	+
77	Selenium sulphide	7446-34-6	+	+	+
78	Styrene oxide	96-09-3	+	+	+
79	1,2,3-trichloropropane	96-18-4	+	+	+
80	Zinc dimethyldithiocarbamate (Ziram)	137-30-4	+	+	+
81	Chlorodibromomethane	124-48-1	+	+	+
82	4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)	101-14-4	+	+	+
83	2-aminoanthracene	613-13-8	+	+	+
84	Bis(dimethylamino)benzophenone (Michler's ketone)	90-94-8	+	+	
85	Iodinated glycerol	5634-39-9	+	+	
86	2-aminoanthraquinone	117-79-3	+	+	
87	2-aminofluorene	153-78-6	+	+	+
88	Benz[a]anthracene	56-55-3	+	+	
89	7-bromomethyl-12-methylbenz[a]anthracene	16238-56-5	+	+	
90	Chlordane, technical grade	12789-03-6	+	+	
91	Chlornaphazine	494-03-1	+	+	
92	p-chloroaniline HCl	20265-96-7	+	+	
93	C.I. Solvent yellow 3 (o-aminoazotoluene)	97-56-3	+	+	
94	Cyclopenta[c,d]pyrene	27208-37-3	+	+	
95	Dibenz[a,h]anthracene	53-70-3	+	+	+
96	3,3'-dimethoxybenzidine 2HCl	20325-40-0	+	+	
97	1,1-dimethylhydrazine	57-14-7	+	+	
98	Glycidaldehyde	765-34-4	+	+	
99	4-hydroxyaminoquinoline-N-oxide	4637-56-3	+	+	
100	ICR 170	146-59-8	+	+	
101	Methyl iodide	74-88-4	+	+	
102	N-nitrosomorpholine	59-89-2	+	+	+
103	N-nitrosopiperidine	100-75-4	+	+	
104	N-nitrosopyrrolidine	930-55-2	+	+	
105	Streptozotocin	18883-66-4	+	+	
106	Uracil (uracil mustard)	66-75-1	+	+	

表2 Ames試験陽性, MLA陰性のがん原性物質

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	CA/MN
1	1-amino-2,4-dibromoanthraquinone	81-49-2	+	-	-
2	C.I. Acid red 114	6459-94-5	+	-	-
3	D&C Red 9	5160-02-1	+	-	-
4	Trifluralin, technical grade	1582-09-8	+	-	-
5	N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene	60-11-7	+	-	+
6	Isoniazid	54-85-3	+	-	+
7	Nitrite, sodium	7632-00-0	+	-	+
8	o-Toluidine	95-53-4	+	-	+
9	Urethane	51-79-6	+	-	+
10	1,3-butadiene	106-99-0	+	-	
11	C.I. Direct blue 14 (Trypan blue)	72-57-1	+	-	

表3 Ames試験陰性, MLA試験陽性であったがん原性物質

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	CA/MN
1	11-aminoundecanoic acid	2432-99-7	-	+	-
2	Benzofuran	271-89-6	-	+	-
3	o-Benzyl-p-chlorophenol	120-32-1	-	+	-
4	Butylated hydroxytoluene	128-37-0	-	+	-
5	Chlorobenzilate	510-15-6	-	+	-
6	Chloroform	67-66-3	-	+	-
7	C.I. Direct blue 218	28407-37-6	-	+	-
8	Cinnamyl anthranilate	87-29-6	-	+	-
9	Dicofol	115-32-2	-	+	-
10	N,N'-diethyl-2-thiourea	105-55-5	-	+	-
11	Ethylbenzene	100-41-4	-	+	-
12	Kepone (AKA Chlordecone)	143-50-0	-	+	-
13	Malonaldehyde sodium salt	24382-04-5	-	+	-
14	Methyl tert-butyl ether	1634-04-4	-	+	-
15	Piperonyl butoxide	51-03-6	-	+	-
16	Piperonyl sulphoxide	120-62-7	-	+	-
17	Toluene	108-88-3	-	+	-
18	Trichloroethylene (with and without epichlorohydrin)	79-01-6	-	+	+
19	2,4,6-trichlorophenol	88-06-2	-	+	-
20	Trimethylthiourea	2489-77-2	-	+	-
21	4-vinylcyclohexene	100-40-3	-	+	-
22	Acetaldehyde	75-07-0	-	+	+
23	Actinomycin D	50-76-0	-	+	+
24	Allyl isovalerate	2835-39-4	-	+	+
25	Benzaldehyde	100-52-7	-	+	+
26	Benzene	71-43-2	-	+	+
27	Bromodichloromethane	75-27-4	-	+	+
28	Cadmium sulphate	10124-36-4	-	+	+
29	Caffeic acid	331-39-5	-	+	+
30	Catechol	120-80-9	-	+	+
31	Chlorendic acid	115-28-6	-	+	+
32	Chlorinated paraffins: C12	108171-26-2	-	+	+
33	Chlorobenzene	108-90-7	-	+	+
34	3-chloro-2-methylpropene, technical grade	563-47-3	-	+	+
35	3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea (AKA monuron)	150-68-5	-	+	+
36	Chlorothalonil	1897-45-6	-	+	+
37	p,p'-DDE	72-55-9	-	+	+
38	Dieldrin	60-57-1	-	+	+
39	Diethylstilbestrol	56-53-1	-	+	+
40	N,N-dimethylaniline	121-69-7	-	+	+
41	Ethionamide	536-33-4	-	+	+
42	Ethyl acrylate	140-88-5	-	+	+
43	5-fluorouracil	51-21-8	-	+	+
44	Furan	110-00-9	-	+	+
45	Furosemide	54-31-9	-	+	+
46	Griseofulvin	126-07-8	-	+	+
47	Hydroquinone	123-31-9	-	+	+
48	Isophorone	78-59-1	-	+	+
49	2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	-	+	+
50	Mercuric chloride	7487-94-7	-	+	+
51	alpha-Methylbenzyl alcohol	98-85-1	-	+	+
52	Monocrotaline	315-22-0	-	+	+
53	Phenylbutazone	50-33-9	-	+	+

表3 Ames試験陰性, MLA試験陽性であったがん原性物質 (続き)

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	CA/MN
54	Safrole	94-59-7	-	+	+
55	Triamterene	396-01-0	-	+	+
56	Pentachloroethane	76-01-7	-	+	+
57	4-chloro-o-toluidine HCl	3165-93-3	-	+	
58	Dimethyl methylphosphonate	756-79-6	-	+	
59	Thioacetamide	62-55-5	-	+	
60	Trichloroacetic acid	76-03-9	-	+	
61	Vinylidene chloride	75-35-4	-	+	
62	Benomyl	17804-35-2	-	+	+
63	1,4-benzoquinone	106-51-4	-	+	
64	FD&C Red 1 (Ponceau 3R)	3564-09-8	-	+	
65	Procarbazine HCl (Natulan)	366-70-1	-	+	

表4 Ames試験陰性, MLA試験陰性であったがん原性物質

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	CA/MN
1	3-amino-1,2,4-triazole (Amitrole)	61-82-5	-	-	-
2	tert-Butyl alcohol	75-65-0	-	-	-
3	5-chloro-o-toluidine	95-79-4	-	-	-
4	Decabromodiphenyl oxide	1163-19-5	-	-	-
5	Diethanolamine	111-42-2	-	-	-
6	Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	-	-	-
7	1,4-dioxane	123-91-1	-	-	-
8	17-B-Estradiol	50-28-2	-	-	+
9	DL-ethionine	67-21-0	-	-	-
10	Melamine	108-78-1	-	-	-
11	Methyl carbamate	598-55-0	-	-	-
12	Nitrilotriacetic acid	139-13-9	-	-	+
13	Nitrilotriacetic acid, trisodium salt, monohydrate	18662-53-8	-	-	-
14	N-nitrosodiphenylamine	86-30-6	-	-	-
15	Oxazepam	604-75-1	-	-	+
16	Progesterone	57-83-0	-	-	-
17	Pyridine	110-86-1	-	-	-
18	Reserpine	50-55-5	-	-	-
19	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	1746-01-6	-	-	-
20	1,1,2,2-tetrachloroethane	79-34-5	-	-	-
21	Titanium dioxide	13463-67-7	-	-	-
22	Tris(2-ethylhexyl)phosphate	78-42-2	-	-	-
23	DDT	50-29-3	-	-	+
24	Pentachloronitrobenzene	82-68-8	-	-	+
25	Saccharin, sodium	128-44-9	-	-	+
26	Zearalenone	17924-92-4	-	-	+
27	Dapsone	80-08-0	-	-	-
28	Di(2-ethylhexyl)adipate	103-23-1	-	-	-
29	5,5-diphenylhydantoin	57-41-0	-	-	-
30	Bemitradine	88133-11-3	-	-	-
31	Ethyl alcohol	64-17-5	-	-	-
32	Phenesterin	3546-10-9	-	-	-
33	Polybrominated biphenyl mixture	67774-32-7	-	-	-

表5 Ames試験陽性, MLA試験陽性の非がん原性物質

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	MN/CA
1	Dieldrin, photo-	13366-73-9	+	+	-
2	Fenaminosulf, formulated [AKA p-dimethylaminobenzenediazo sulphonic acid, sodium salt]	140-56-7	+	+	-
3	2-(Chloromethyl)pyridine.HCl	6959-47-3	+	+	+
4	2,5-Diaminotoluene sulfate	6369-59-1	+	+	+
5	2,6-Diaminotoluene.2HCl	15481-70-6	+	+	+
6	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	140-49-8	+	+	+
7	4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	+	+	+
8	8-Hydroxyquinoline [AKA 8-quinolinol]	148-24-3	+	+	+
9	Manganese (II) sulfate monohydrate	10034-96-5	+	+	+
10	p-Chloroaniline	106-47-8	+	+	+
11	p-Nitroaniline	100-01-6	+	+	+
12	p-Phenylenediamine.2HCl	624-18-0	+	+	+
13	3-Nitropropionic acid	504-88-1	+	+	
14	Bromomethane	74-83-9	+	+	
15	p-Anisidine.HCl	20265-97-8	+	+	
16	Hexamethylenetetramine	100-97-0	+	+	

表6 Ames試験陽性, MLA試験陰性の非がん原性物質

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	MN/CA
1	C.I. food red 3 [AKA Acid red 14]	3567-69-9	+	-	-
2	Cyanamide, calcium	156-62-7	+	-	-
3	Dioxathion [AKA phosphorodithioic acid, S,S'-p-dioxane-2,3-diyl-O,O',O',O'-tetraethyl ester]	78-34-2	+	-	-
4	N-(1-Naphthyl)ethylenediamine.2HCl [AKA PL-89779]	1465-25-4	+	-	+
5	Propylene [AKA propene]	115-07-1	+	-	

表7 Ames試験陰性, MLA試験陽性の非がん原性物質

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	MN/CA
1	1,2-Dichlorobenzene	95-50-1	-	+	-
2	4-Hexylresorcinol	136-77-6	-	+	-
3	Aldicarb	116-06-3	-	+	-
4	Anilazine	101-05-3	-	+	-
5	Barium chloride dihydrate	10326-27-9	-	+	-
6	FD & C yellow no. 6 [AKA Food yellow 3]	2783-94-0	-	+	-
7	Hydrochlorothiazide	58-93-5	-	+	-
8	Oxytetracycline.HCl	2058-46-0	-	+	-
9	Sodium diethyldithiocarbamate trihydrate [AKA carbamic acid, diethyldithio, sodium salt]	148-18-5	-	+	-
10	Sulfisoxazole	127-69-5	-	+	-
11	1-Phenyl-2-thiourea	103-85-5	-	+	+
12	Benzyl alcohol	100-51-6	-	+	+
13	C.I. acid orange 10	1936-15-8	-	+	+
14	Diallyl phthalate	131-17-9	-	+	+
15	Diazinon	333-41-5	-	+	+
16	Ethyl tellurac	20941-65-5	-	+	+
17	Eugenol	97-53-0	-	+	+
18	Methotrexate [AKA glutamic acid, N-(p-(((2,4-diamino-6-pteridiny)methyl)methylamino)benzoyl),-, L-]	59-05-2	-	+	+
19	Methyl methacrylate	80-62-6	-	+	+
20	Nickel (II) sulfate hexahydrate	10101-97-0	-	+	+
21	o-Anthranilic acid	118-92-3	-	+	+
22	Penicillin VK	132-98-9	-	+	+
23	Phenol	108-95-2	-	+	+
24	Phthalic anhydride	85-44-9	-	+	+
25	Propyl gallate	121-79-9	-	+	+
26	Resorcinol	108-46-3	-	+	+
27	Rotenone	83-79-4	-	+	+
28	Tetraethylthiuram disulfide [AKA disulfide, bis(diethylthiocarbamoyl)]	97-77-8	-	+	+
29	Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride	124-64-1	-	+	+
30	Tetrakis(hydroxymethyl)phosphonium sulfate	55566-30-8	-	+	+
31	Triphenyltin hydroxide	76-87-9	-	+	+
32	2,3,5,6-Tetrachloro-4-nitroanisole	2438-88-2	-	+	
33	alpha-Methyldopa sesquihydrate	41372-08-1	-	+	
34	Isopropyl-N-(3-chlorophenyl)carbamate\ s	101-21-3	-	+	
35	Malaoxon	1634-78-2	-	+	
36	Phenyl-beta-naphthylamine [AKA N-phenyl-2-naphthylamine]	135-88-6	-	+	
37	Rhodamine 6G [AKA basic red 1]	989-38-8	-	+	



表8 Ames試験陰性, MLA試験陰性の非がん原性物質

	Chemical	CAS No.	Ames	MLA	MN/CA
1	(2-Chloroethyl)trimethylammonium chloride	999-81-5	-	-	-
2	3-Sulfolene	77-79-2	-	-	-
3	Ampicillin trihydrate	7177-48-2	-	-	-
4	C.I. pigment yellow 12	6358-85-6	-	-	-
5	Cyclohexanone	108-94-1	-	-	-
6	Dimethyl terephthalate	120-61-6	-	-	-
7	Dimethylformamide	68-12-2	-	-	-
8	d-Mannitol	69-65-8	-	-	-
9	EDTA, trisodium salt trihydrate	150-38-9	-	-	-
10	Endrin	72-20-8	-	-	-
11	Ephedrine sulphate	134-72-5	-	-	-
12	Erythromycin stearate	643-22-1	-	-	-
13	Etodolac	41340-25-4	-	-	-
14	Fluometuron [AKA urea, 1,1-dimethyl 3-(alpha, alpha, alpha-trifluoro-m-tolyl)-]	2164-17-2	-	-	-
15	l-Tryptophan	73-22-3	-	-	-
16	N,N-Dicyclohexylthiourea	1212-29-9	-	-	-
17	n-Butyl chloride	109-69-3	-	-	-
18	Phenformin.HCl	834-28-6	-	-	-
19	Phthalamide	88-96-0	-	-	-
20	Tolbutamide	64-77-7	-	-	-
21	Tricresyl phosphate	1330-78-5	-	-	-
22	4,4'-isopropylidenediphenol	80-05-7	-	-	+
23	Acetohexamide	968-81-0	-	-	+
24	Benzoin	119-53-9	-	-	+
25	Diphenhydramine.HCl	147-24-0	-	-	+
26	FD & C red no. 3 [AKA fluorescein, 2', 4', 5', 7'-tetraiodo, disodium salt]	16423-68-0	-	-	+
27	Tetracycline.HCl	64-75-5	-	-	+
28	Tin (II) chloride	7772-99-8	-	-	+
29	1,1,1-Trichloroethane, technical grade	71-55-6	-	-	
30	Acetonitrile [AKA ethyl nitrile]	75-05-8	-	-	
31	Caprolactam	105-60-2	-	-	
32	FD & C green no. 3 [AKA C.I. Food green 3]	2353-45-9	-	-	
33	Omeprazole	73590-58-6	-	-	
34	Promethazine.HCl	58-33-3	-	-	

表9 結果の一致率

がん原性物質

	MLA+	MLA-	
Ames+	106	11	117
Ames-	65	33	98
	171	44	215
	Concordance:		64.65

非がん原性物質

	MLA+	MLA-	
Ames+	16	5	21
Ames-	37	34	71
	53	39	92
	Concordance:		54.34

全体

	MLA+	MLA-	
Ames+	122	16	138
Ames-	92	67	159
	214	83	297
	Concordance:		63.63

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

I. 抗菌剤の皮膚感作性（モルモットマキシミゼーション法）の整理と評価  
—実験動物を用いた皮膚感作性の定量的評価法—

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

これまでにモルモットマキシミゼーション法（GPMT）を用いて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 17 種の抗菌剤について、マウスリンパ節増殖試験（LLNA）を用いて、その感作誘導能について評価し、両者の成績をリスク評価の側面から定量的に比較検討した。GPMT で陽性であった 17 種のうち 13 種が LLNA で陽性反応を示した。各抗菌剤の最低感作誘導濃度について、GPMT と LLNA で求められた値を動物当たりの投与量（ $\mu\text{g}/\text{匹}$ ）に換算した後に比較したところ、両者の間に一定の関係性はみられず、その比率（LLNA/GPMT）は最低で 0.05 倍、最高で 1250 倍と広範囲にわたっていた。同様に GPMT で求められた各抗菌剤の最低惹起濃度と LLNA で求められた最低誘導濃度をエリア濃度（ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ）に換算した後に比較したところ、両者には比較的良好な相関がみられた（ $r = 0.73$ ）。またその濃度比は最低で 1 倍、最高で 1466 倍であり、各抗菌剤のモルモットでの惹起に要する最低濃度は常にマウスでの最低誘導濃度よりも低濃度であった。近年、感作性物質へのヒトの最低誘導濃度は LLNA で得られる最低誘導濃度とよく相関するという報告がなされている。一方、ヒトの最低惹起濃度に関する知見は非常に限られている。以上の結果は、従来あまり検討されて来なかった感作性物質へのヒトの最低惹起濃度を LLNA のデータより推定できる可能性を示唆するものである。

## A. 研究目的

接触皮膚炎は感作誘導および皮膚惹起反応の 2 つの段階から成り立っているが、両者には閾値濃度が存在することが知られている (Kimber et al., 1999)。従って、感作性物質への暴露に関するリスク管理を行うためには、他の毒性物質の場合と同様にまず感作誘導および惹起反応の両者の用量反応性を検討し、最低作用濃度を検索することが重要と考えられる。2002 年に OECD は感作性物質の評価試験法としてマウスリンパ節増殖法 (LLNA) を採用した (OECD, 2002)。LLNA では化学物質の感作誘導能を定量的に評価することができる。近年、感作性物質へのヒトの最低誘導濃度は LLNA で得られる最低誘導濃度とよく相関するという報告がなされており、LLNA で求められた誘導力価に応じて感作性物質を分類することが推奨されている (Griem et al., 2003)。しかし LLNA では惹起反応に関する評価はできない。一方、古くからの標準試験法であるモルモットマキシミゼーション法 (GPMT) は、本来感作性物質を高感度で定性的に検出する手法であるが (Magnusson and Kligman, 1969)、我々は化学物質の感作誘導および惹起反応の両者の用量反応性を検討できるように GPMT のプロトコールを一部改良した手法 (多用量 GPMT) を開発した (Nakamura et al., 1994)。これまでに多用量 GPMT を用いて種々の抗菌剤の感作性を検討してきたが、それらのデータの LLNA のデータやあるいはヒトのデータとの関係は明らかではない。

今回、家庭用品に使用されている種々の抗菌剤について、LLNA を用いてその感作性を検討した。得られた成績を過去に報告した多用量 GPMT での成績と定量的に比較し、2 つの代表的な皮膚感作性動物実験法の関係性を明らかにすることを試みた。

## B. 実験方法

### 1. 被験検物質

試験に用いた 17 種の抗菌剤を表 1-1 に示した。

### 2. 多用量モルモットマキシミゼーション法 (GPMT)

Hartley 雌モルモットを用い、基本的に Nakamura らの方法 (1994) に従った。複数の第 1 次 (皮内投与) および第 2 次 (閉塞貼付) 感作誘導濃度 (基本的に 4 用量、1 群 10 匹) と、惹起濃度 (開放塗布、基本的に 5 用量) を設け、惹起後の皮膚反応強度を採点することにより感作誘導能および惹起反応の両者を定量的に評価した。

### 3. 非放射性マウスリンパ節増殖法 (LLNA)

BALB/c 雌マウスを用い、基本的に Takeyoshi らの方法の改良法 (Yamano et al., 2003) に従った。複数の感作誘導濃度 (開放塗布、基本的に 4 用量、1 群 4 匹) を設け、耳介外側への塗布による誘導処置後の耳介リンパ節細胞の増殖を、プロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込み量として測定することにより感作誘導能を定量的に評価した。