

C. 実験結果

1. LLNA を用いた感作誘導に関する検討

GPMT で陽性であった 17 種の抗菌剤の感作性を LLNA で検討したところ、13 種が陽性反応を示した。結果に不一致のみられた 4 種のうち、BIT、BBIT および BECDIP の 3 種については、リンパ細胞増殖の指標値（SI 値）は皮膚刺激性が観察される濃度においてのみ有意に増加した。本法では刺激性物質と感作性物質による細胞増殖を区別することはできず、これらについては陰性と判定した。また残る CAA については、オクタノール/水分係数が他の抗菌剤に比べて小さく、従って皮膚透過性が不十分であることが予想され、このことが LLNA での陰性判定の一要因と思われた。

13 種の抗菌剤の最低誘導濃度は TPN の 0.01% から HO の 30% の濃度範囲に分布した。図 1-1 に、各抗菌剤を最低誘導濃度が 0.1% 未満と、0.1% 以上の 2 つのグループに分けて、誘導濃度に対する SI 値の用量反応性を示した。

2. GPMT と LLNA での成績の比較

両試験で陽性であった 13 種の抗菌剤の成績を比較検討した。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（図 1-2）。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的な相関がみられた（ $r=0.73$ 、図 1-3）。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。

D. 考察

近年、human repeat-insult patch test (HRIPT) や human maximization test (HMT) などのヒトの感作誘導試験で得られた種々の感作性物質の成績と、マウスを用いた感作誘導試験である LLNA での成績の間には高い相関性があり、ヒトにおける最低誘導濃度を LLNA で得られた値で代用できるとする報告がなされている (Griem et al., 2003)。一方、古くからの感作性試験である GPMT に関しては、得られた成績をヒトやマウスでの成績と比較するという試みは従来殆どなされていない。今回種々の抗菌剤について GPMT と LLNA での成績を比較したところ、GPMT で陽性であった 17 種中 13 種が LLNA でも陽性反応を示すという相同性を示した。

GPMT と LLNA で求められた各抗菌剤の最低感作誘導濃度の間には一定の関係性はみられなかった。GPMT は感作誘導に際して検体をアジュバントと混合し、また皮内投与を行うという非現実的手法を用いており、両者の成績が一致しなかったことはむしろ自然とも

いえる。感作誘導の程度によって、その後の惹起反応の程度が左右されることが知られており、従って多用量 GPMT で複数の感作誘導群を設定することの意義は、最も強く感作の成立する群を選び出し、その群を用いて惹起反応について検討することにある。GPMT の最高感作群で得られた惹起閾値濃度とマウス LLNA で得られた最低誘導濃度の間には比較的良好な相関がみられた。最低誘導濃度に関する情報に比較して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。

図 1-3 において全ての点は $y=x$ で表される対角線の下側に位置したが、これは各抗菌剤のモルモットでの惹起に要する最低濃度が常にマウスでの最低誘導濃度よりも低濃度であることを意味する。従って、もし仮に感作性物質へのヒトの暴露が新たな感作誘導が起こらないように制御されたとしても、既にある物質への感作が成立しているヒトにおいては惹起反応が十分に発生しうる可能性があると考えられる。このような状況下においては、惹起反応のリスク評価に際して惹起閾値濃度以外の指標が必要になる。先に我々は、感作性物質の相対的惹起力価の指標として惹起濃度と皮膚反応強度との間の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、上のような状況下では、惹起反応に関する個々の物質のリスクをよく反映する指標と考えられる。

E. 結論

種々の抗菌剤について、多用量 GPMT と非放射性 LLNA での成績を比較した結果以下の結論を得た。

1. GPMT で陽性の 17 種中 13 種が LLNA で陽性反応を示した。
2. GPMT と LLNA で求められた最低誘導濃度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なかった。
3. 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 ($r=0.73$)。
4. 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。

F. 研究発表

論文発表

1. Yamano T, Shimizu S, Noda T. Allergenicity evaluation of Bioban CS-1135 in experimental animals. *Contact Dermatitis* 2004; 50: 339-343.

学会発表

1. 山野哲夫、清水充、野田勉、モルモットおよびマウスを用いた皮膚感作性の定量的評価法の比較、第41回全国衛生化学技術協議会年会（2004）
2. 清水充、山野哲夫、野田勉、家庭用品に使用される抗菌剤等のモルモットにおける皮膚感作性（その8）、第41回全国衛生化学技術協議会年会（2004）

G. 知的財産権の出願・登録の状況

なし

参考文献

1. Griem, P., Goebel, C., Scheffler, H. Proposal for a risk assessment methodology for skin sensitization based on sensitization potency data. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2003; 38: 269-290.
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. OECD. OECD Chemicals testing guideline 429. Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay (2002)
5. Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett* 2001; 119: 203-208.
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.

これまでの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-iodopropargilformyl(CPIP) および 1-bromo-3-ethoxycarbonyloxy-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: 77-86.
10. 野田 勉、山野哲夫、清水 充. 抗菌剤 methylene-bis(thiocyanate)のモルモットにおける皮膚感作性. 生活衛生 2004: 48: 276-282.
11. Yamano T, Shimizu S, Noda T. Allergenicity evaluation of Bioban CS-1135 in experimental animals. Contact Dermatitis 2004: 50: 339-343.

研究協力者

大阪市立環境科学研究所

山野 哲夫

野田 勉

厚生労働科学費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

Ⅱ．抗菌加工製品中の皮膚感作性物質の検索法と実用例への適用

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は十分に検討されているとはいえない。これらの家庭用品に使用される抗菌剤の一種である有機ヒ素系抗菌剤で抗菌加工された人工皮革椅子によるヒトにおけるアレルギー性接触皮膚炎の症例が報告されている。しかし、有機ヒ素系抗菌剤を含む市販の抗菌剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験では皮膚感作性が確認されなかった。そこで、抗菌加工製品中の皮膚感作性物質の検索法と実用例への適用に関する研究として、以下の研究を行った。(1) 市販抗菌剤から有機ヒ素系抗菌剤を抽出し、単離した有機ヒ素系抗菌剤に関するモルモットマキシミゼーション法 (GPMT) による皮膚感作性試験を行った。(2) 有機ヒ素系抗菌剤を含む 5 種の抗菌剤 (有機ヒ素系 1 種、第四アンモニウム塩 2 種、イソチアゾリン系 2 種) に関する質量分析計付き高速液体クロマトグラフ (LC/MS) を用いた検出法を開発し、LC/MS が抗菌剤の簡易スクリーニングに応用できるかを検討した。

その結果、市販抗菌剤から単離した有機ヒ素系抗菌剤について GPMT を実施した結果、皮膚感作性を有することが確認された。従って市販抗菌剤では皮膚感作性が確認できなかったが、原因とされる抗菌剤の単離により実験動物で皮膚感作性が再現できたことから、抗菌剤の単離が重要であると思われた。

抗菌剤の簡易スクリーニング法に関して、選択した 5 種の抗菌剤は有機金属系化合物や 4 級アンモニウムを含む化合物を含み、質量分析計付きガスクロマトグラフ (GC/MS) による一斉検出は困難であったが、LC/MS では極性有機溶媒系 GPC カラムにより分離を行うことにより、有機ヒ素系抗菌剤を含むこれらの抗菌剤のピークが同時に得られた。従って種々抗菌剤の一斉検出が可能であり、様々な抗菌加工製品についても応用が可能であると思われた。

A. 目的

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は十分に検討されているとはいえない。これら抗菌剤の多くに、皮膚感作性を有する物質があることを前年度で報告した。一方、これらの家庭用品に使用される抗菌剤の一種である有機ヒ素系抗菌剤 10,10'-オキシ-ビス(フェノキシアルシン) (OBPA) はポリ塩化ビニル樹脂、ポリウレタン樹脂などのプラスチック用抗菌剤であり、さらにソファやダイニングテーブルの椅子地のポリ塩化ビニルをベースとした人工皮革にも使用されている。ヒトで OBPA によって抗菌加工された人工皮革椅子によるアレルギー性接触皮膚炎の症例が報告されている(鹿庭、五十嵐、1998)。しかし、著者らが実施した OBPA を含む市販の抗菌剤のモルモットを用いた皮膚感作性試験では皮膚感作性が確認されなかった(清水ら、2002)。

そこで抗菌加工製品中の皮膚感作性物質の検索法と実用例への適用に関する研究として以下の研究を行った。

1. 市販抗菌剤から単離した OBPA の皮膚感作性
2. LC/MS による抗菌剤の検出とスクリーニングへの応用

1の研究では OBPA を含む抗菌剤から OBPA を抽出し、単離した OBPA に関する皮膚感作性の有無についてモルモットマキシミゼーション法(GPMT)の Nakamura らによる改良法を用いて検討した。2の研究では OBPA を含む5種の抗菌剤(有機金属系1種、第四アンモニウム塩2種、イソチアゾリン系2種)を取り上げ、OBPA を含む抗菌剤に関する LC/MS による簡易スクリーニング法を検討した。

B. 実験方法

1. OBPA に関する皮膚感作性試験

1-1. 試料

OBPA を単離した試料はバイナジン BP5-2PG (VZPG、モトインタージャナル) である。本試料は OBPA を含むプロピレングリコール溶液である。

1-2. OBPA の抽出および単離法

市販品 VZPG から OBPA を抽出した。VZPG 100 ml に *n*-ヘキサン 200 ml を加えて攪拌し、-20°C で一晩放置し OBPA 結晶を析出させた。これを吸引ろ過し、さらに *n*-ヘキサンで洗浄して、デシケータに保存した。抽出した OBPA を融点測定装置にて融点を測定したところ、文献値(Budavari, 1996)とほぼ一致した。

1-3. 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。

1-4. 多用量モルモットマキシミゼーション法(GPMT)

GPMT は皮内注射および閉塞貼付による2回の感作誘導を行い、一定期間後に数段階の濃度の被験物質を一度に開放塗布する惹起暴露により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。判定は惹起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。

なお、先行して行った予備試験の結果OBPAは皮膚感作性があると推定された。この予備試験では第2次感作暴露のみで軽度な皮膚反応が認められたので、本試験では第1次感作濃度と第2次感作濃度を同一に変化させた用量を設定し、用量反応性の検討を行った。

2. LC/MSによる抗菌剤の検出

2-1. 試料

本研究に用いた試料は表2-1に示した。OBPAは市販製品Vinylzene BP5-2PG(モトシユク-ナショナル)から再結晶法により単離したものを使用した。TMCBDPBは市販製品ダイマー136(イヌイ(株))、HMBCDPBはダイマー38(イヌイ(株))をそのまま使用した。BITはセネガ製のProxel PL、BBITはアビシア(株)製の市販品Vanquish 100を用いた。アセトニトリルはHPLCグレードを用いた。

2-2. 分析法

LC/MSはアプライドバイオ社製API 2000を用いた。液体クロマトグラフはアジレント製HP1200シリーズを使用した。質量分析計の条件を表2-2に示す。カラムには東ソーTosoh-VMPAK(2.0 x 150mm)を用いた。移動相はアセトニトリルと水(酢酸アンモニウム2mM、酢酸2mL/L)を用い、アセトニトリルの比率が0-10分では10%に固定し、10-20分で90%まで上昇させ、20-30分で90%に固定した。

C. 実験結果

1. OBPAに関する皮膚感作性試験

表2-3にOBPAの皮膚感作性試験の結果を示した。OBPAの第1次感作濃度500ppmおよび5000ppmの各群にOBPAの惹起により皮膚反応が観察され、5000ppm感作群では最高非刺激性濃度である惹起濃度100ppmで10例中3例に、さらに惹起濃度30ppmでも1例に皮膚反応が観察された。従ってOBPAはGPMTで皮膚感作性を示し、最低感作誘導濃度は500ppm、最低惹起濃度は30ppmであった。

一方、惹起濃度がOBPA 100ppmに相当し、かつ最高非刺激性濃度であるVZPGの0.358%で惹起してもいずれの感作群でも皮膚反応が観察されなかった。さらに、単離したOBPAをプロピレングリコールに再溶解し、市販抗菌剤VZPGと同濃度のOBPAプロピレングリコール溶液(2.8%)を作成した。この溶液を用いて惹起を行ったが、OBPAの100ppmに相当する濃度では陽性反応はみられなかった(表2-4)。

今回の試験でOBPAは皮膚感作性が認められたので、他のヒ素化合物との交差反応性も調べた。そこで5000ppm感作群を用いて、交差反応性試験を実施した。交差反応性試験に

はヒ素化合物である亜ヒ酸ナトリウム、ヒ酸ナトリウム、モノメチルアルソン酸、ジメチルアルシナルシン酸およびトリメチルアルシンオキサイドを用いた。しかし、いずれのヒ素化合物で惹起しても皮膚反応は観察されなかった。

2. 抗菌剤の LC/MS を用いた簡易スクリーニング

2-1. 抗菌剤のマスペクトラム

OBPA を含む 5 種の抗菌剤のマスペクトルをエレクトロスプレーイオン化法のポジティブイオンモードを用いて測定を行った。各抗菌剤のアセトニトリル溶液 (100 ppm) を用い、フローインジェクション法によりマスペクトルを得た。OBPA は砒素と酸素の結合が切れたフラグメントイオン (m/z 243) がベースピークとして観測された。TMCBDPB、HMBCDPB ではそれぞれの二価イオンが得られた。BIT と BBIT についてはプロトンが付加したイオン $[M+H]^+$ が検出された。各抗菌剤のマスペクトルを図 2-1~2-3 に示した。

2-2. 抗菌剤の LC 分離

5 種の抗菌剤について ODS カラムを用いた分離分析を検討した。TMCBDPB と HMBCDPB に関してはまったくピークが得られなかった。これは ODS のシラノール残基とこれら化合物の 4 級アミン部位が強く相互作用するためであると考えられる。さらに、OBPA ではピークにテーリングの現象が見られた。そこで、ビニルポリマーを基材とした充填剤を用いた極性有機溶媒系 GPC カラムである VMPAK25 を用いたところ、比較的良好的な形状のピークがいずれの抗菌剤についても得られた。得られたマスクロマトグラムを図 2-4 に示した。

2-3. 抗菌剤の LC/MS による測定

LC/MS を用い、5 種の抗菌剤の検量線を作成した。検量線は SIM モードで行った (選択したイオンは OPBA: m/z 243、TMCBDPB: m/z 290、HMBCDPB: m/z 304、BIT: m/z 152、BBIT: m/z 208)。いずれの抗菌剤についても 10-1000ng/mL の濃度範囲で $r^2 > 0.999$ の良好的な直線性を示した。

この測定条件を用いて、実試料について抗菌剤の簡易スクリーニングに用いることができなにか検討を行った。試料として椅子の背もたれに用いられている合成人工皮革を用いた。種々の椅子から人工皮革を採取し ($n=4$)、5 種の抗菌剤に関する LC/MS による分析を行った。抽出方法は OBPA 分析における五十嵐らの方法 (2000) を参照した。すなわち細かく切った人工皮革 (1g の試料を約 1mm x 1mm となるように鋏で裁断する) にメタノール 5mL を抽出溶媒として加え、30 分間振とう抽出した。溶液をろ過し、LC/MS に注入して測定を行った。しかし今回、分析を行った人工皮革から 5 種の抗菌剤はいずれも検出されなかった。

D. 考察

1. OBPA に関する皮膚感作性試験

著者らが実施した OBPA を含有する市販抗菌製剤を用いた研究では、この抗菌製剤は皮膚感作性が認められなかった(清水ら、2002)。一方、ヒトで OBPA によって抗菌加工された人工皮革椅子によるアレルギー性接触皮膚炎の症例が報告され、OBPA の皮膚感作性が疑われている(鹿庭、五十嵐、1998)。今回の研究では市販抗菌製剤から単離した OBPA についてモルモットを用いて皮膚感作性試験を実施した結果、OBPA が皮膚感作性を有することが確認された。このように抗菌剤を含む市販製品ではモルモットで皮膚感作性が確認できなかったが、原因物質とされている抗菌剤を単離することにより実験動物で皮膚感作性が確認された。

今回の研究において、OBPA の濃度として 100 ppm に相当する VZPG で惹起をしても感作性がみられなかった。このことは、製剤の主な担体であるプロピレングリコールが OBPA による感作性に影響を及ぼす可能性が考えられる。事実、OBPA を市販製品と同濃度のプロピレングリコール溶液を作成し、このプロピレングリコール溶液を用いてモルモットに惹起を行っても陽性反応は認められなかった(表 2-4)。

以上のように市販製品では皮膚感作性が確認できなかったが、原因とされる化学物質の単離により実験動物で皮膚感作性が確認された。すなわち、原因とされる化学物質の抽出および単離が原因の究明に重要であると思われる。

2. 抗菌剤の LC/MS を用いた簡易スクリーニング

OBPA の分析法に関して五十嵐ら(2000)は HPLC を用いた分析法を報告している。彼らの方法では UV 検出法の選択性の低さから OBPA のピークがマトリックスピークと区別するのが困難である点であった。しかし、本研究で示した LC/MS による分析法は MS を検出器として用いた結果、UV 検出と比較し、選択性が高く、マトリックスの影響を受けにくい。実際、OBPA に対応する m/z 243 における SIM モードのマスキロマトグラムにおいては、実試料の測定でもほとんどマトリックス由来のピークは見られなかった。

本研究は OBPA を含む 5 種の抗菌剤に関する一斉スクリーニングに LC/MS を用いる手法を示した。本法は定量に用いるためには抽出方法などについてさらなる検討が必要なものの、簡易スクリーニング法として様々な試料についても応用が可能であると考えられる。

抗菌剤には皮膚感作性を示すものが少なくないが、抗菌加工製品にどのような抗菌剤が使用されているか、さらに製品中の含有量が不明であるものが多い。これら抗菌加工製品によるアレルギー性接触皮膚炎症例が起こった際、本法は原因物質を特定するために有用な手法となると考えられる。

E. 結論

今回、市販抗菌製剤から単離した OBPA についてモルモットを用いて皮膚感作性試験を実施した結果、OBPA に皮膚感作性を有することが確認された。市販抗菌製剤では皮膚感作性が確認できなかったが、原因とされる抗菌剤の単離により実験動物で皮膚感作性が再現

できたことから、原因とされる抗菌剤の単離が重要であると思われた。

OBPA を含む 5 種の抗菌剤について LC/MS を用いた検出法を開発し、LC/MS が抗菌剤の簡易スクリーニングに応用できるかを検討した。選択した 5 種の抗菌剤は有機金属系化合物や 4 級アンモニウムを含む化合物を含み、GC/MS による一斉検出は困難である。一方、LC/MS では極性有機溶媒系 GPC カラムにより分離を行うことにより、これらの抗菌剤のピークが得られた。本研究により 5 種の抗菌剤の一斉検出が可能であり、様々な抗菌加工製品についても応用が可能であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 清水 充、山野哲夫、野田 勉：10,10'-oxibis-10*H*-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
2. 森脇 洋、清水 充、田中正宣、鶴保 謙四郎：LC/MS によるアレルギー性化学物質の検出とスクリーニングへの応用、全国環境研会誌、2004: 29: 121-125

2. 学会発表

1. 清水 充、山野哲夫、野田 勉：市販抗菌剤から単離した有機金属系抗菌剤の皮膚感作性、第 41 回全国衛生化学技術協議会年会(2004)

G. 知的財産権の出願・登録の状況

なし

参考文献

1. Budavari, S. ed., "The Merck Index 12 th," Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, p. 1194-1195 (1996)
2. 五十嵐良明、鹿庭正昭、中村晃忠：椅子張り地に用いられる人工皮革中の抗菌剤 10,10'-Oxibis-10*H*-phenoxarsine の分析、薬学雑誌、2000: 120: 795-799
3. 鹿庭正昭、五十嵐良明：合成皮革製椅子によるアレルギー性接触皮膚炎、第 35 回全国衛生化学協議会年会講演要旨集、p.216-217 (1998)

研究協力者

大阪市立環境科学研究所

森脇 洋

田中正宣

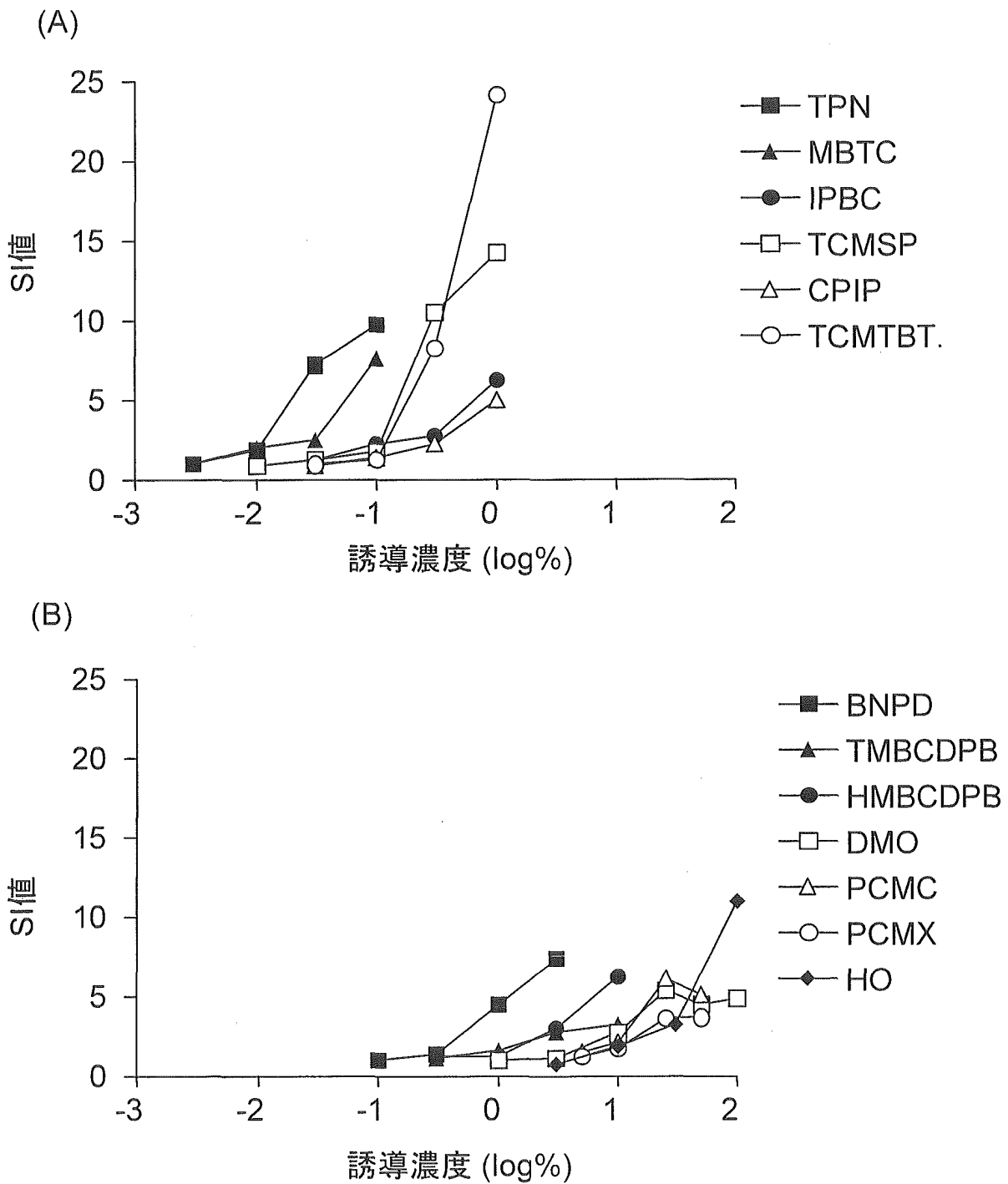


図1-1. 種々の抗菌剤のLLNAにおける誘導濃度に対する用量反応性
 (A) 最低誘導濃度が0.1%未満のグループ
 (B) 最低誘導濃度が0.1%以上のグループ

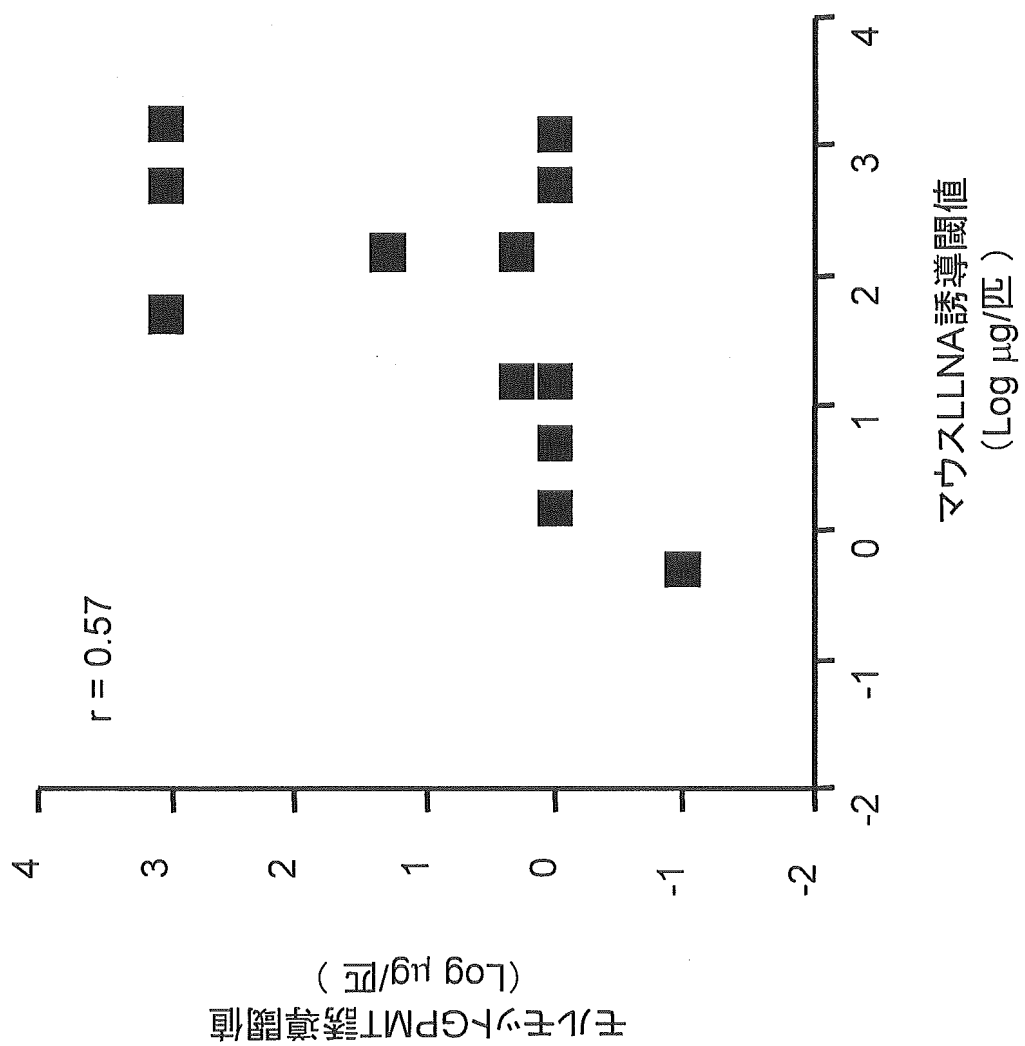


図1-2. 種々の種抗菌剤のGPMTにおける最低誘導濃度とLLNAにおける最低誘導濃度との関係

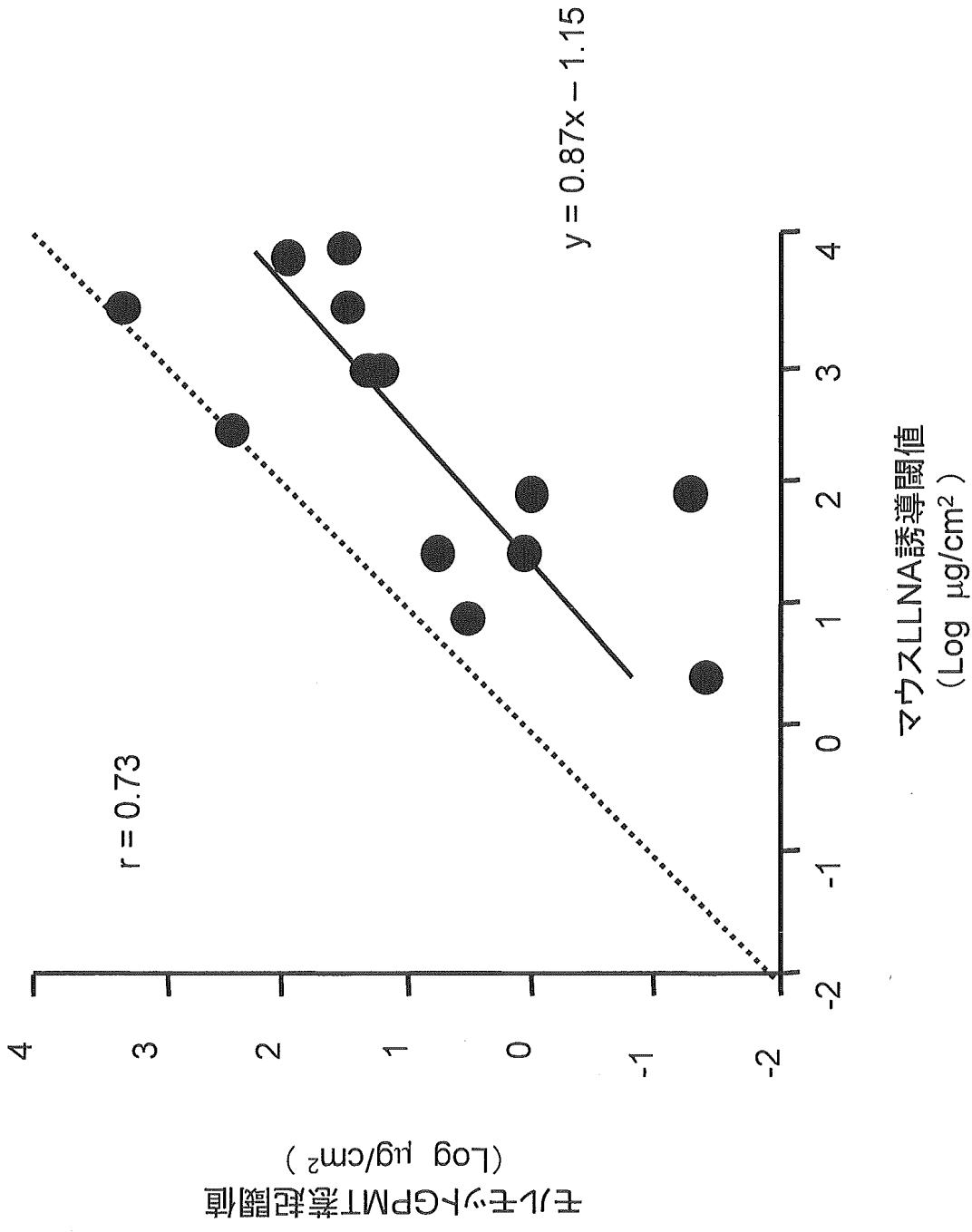


図1-3. 種々の抗菌剤のGPMTにおける惹起閾値濃度とLLNAにおける最低誘導濃度との関係
 実線は回帰直線、点線は $y = x$ で表される対角線を示す。

表1-1. 抗菌剤リストおよびそれらのGPMTとLLNAでの成績区分

No	略号	化学名	主な用途	GPMT	LLNA
抗菌剤1	TPN	2,4,5,6-テトラクロロイソフタロニトリル	プラスチック、農業用殺菌剤	陽性	陽性
抗菌剤2	MBTC	メチレンビスチオシアナート	水性塗料	陽性	陽性
抗菌剤3	IPBC	3-ヨード-2-プロピニルブチルカルバメート	木材、プラスチック	陽性	陽性
抗菌剤4	TCMSP	2,3,5,6-テトラクロロ-4-(メチルスルホニル)ピリジン	プラスチック、塗料、紙	陽性	陽性
抗菌剤5	CPIP	p-クロロフェニル-3-プロパジルフホルミル	繊維、木材、皮革、塗料	陽性	陽性
抗菌剤6	TCMTBT	2-(チオシアノメチルチオ)ベンゾチアゾール	塗料、スライムコントロール	陽性	陽性
抗菌剤7	BNPD	2-プロモ-2-ニトロプロパン-1,3-ジオール	用廃水、冷却水、繊維、皮革	陽性	陽性
抗菌剤8	TMBCDPB	4,4-(テトラメチレンジカルボニルジアミン)ビス(1-デシルピリジニウム プロマイド)	塗料	陽性	陽性
抗菌剤9	HMBCDPB	N,N'-ヘキサメチレンビス(4-カルバモイル-1-デシルピリジニウム プロマイド)	塗料	陽性	陽性
抗菌剤10	DMO	4,4'-ジメチル-1,3-オキサゾリン	金属加工油、塗料、エマルジョン	陽性	陽性
抗菌剤11	PCMC	4-クロロ-3-メチルフェノール	塗料、接着剤、繊維、皮革、切削油	陽性	陽性
抗菌剤12	PCMX	4-クロロ-3,5-ジメチルフェノール	医薬、化粧品、医環境、環境	陽性	陽性
抗菌剤13	HO	ヒバ油	化粧品、洗剤、壁紙、繊維製品	陽性	陽性
抗菌剤14	BIT	1,2-ベンゾイソチアゾリン-3-オン	水系製品全般の防腐、塗料、金属	陽性	陰性
抗菌剤15	BECDIP	1-プロモ-3-エトキシカルボニロキシ-1,2-ジヨード-1-プロペン	木材防腐・防黴	陽性	陰性
抗菌剤16	BBIT	N-n-ブチル-1,2-ベンゾイソチアゾリン-3-オン	プラスチック、塗料、金属加工油	陽性	陰性
抗菌剤17	CAA	2-クロロアセタミド	化粧品、医薬品、接着剤、皮革	陽性	陰性

Metz 4.7e6 cps

■ +01: 2.664 to 2.848 min from Sample 5 (OBPA) of Data20103103 (allergy.wiff (Turbo Spray))

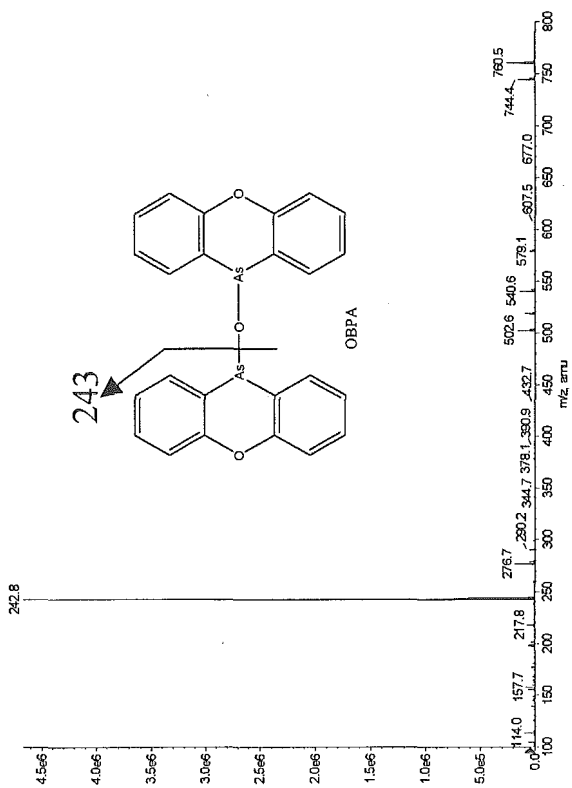
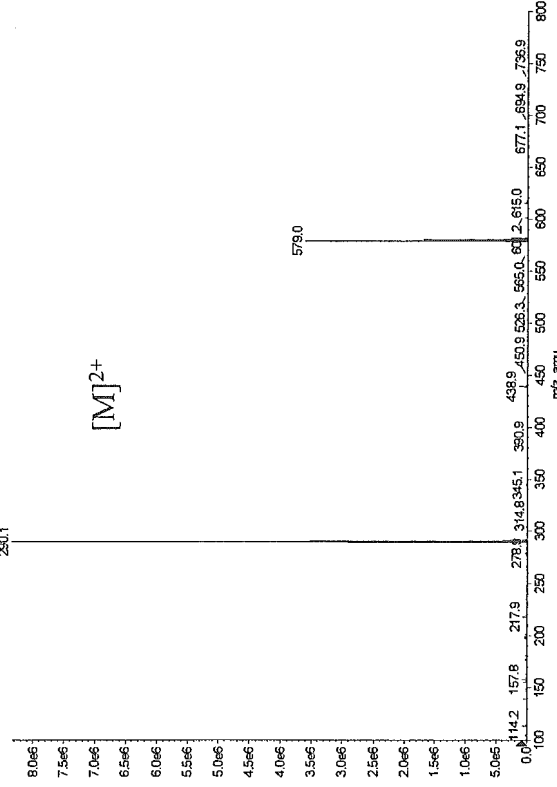


図 2-1 OBPAのマススペクトル

■ +Q1: 6.099 to 6.435 min from Sample 4 (TMCBDPB) of Data20031030allergy.wiff (Turbo Spray)

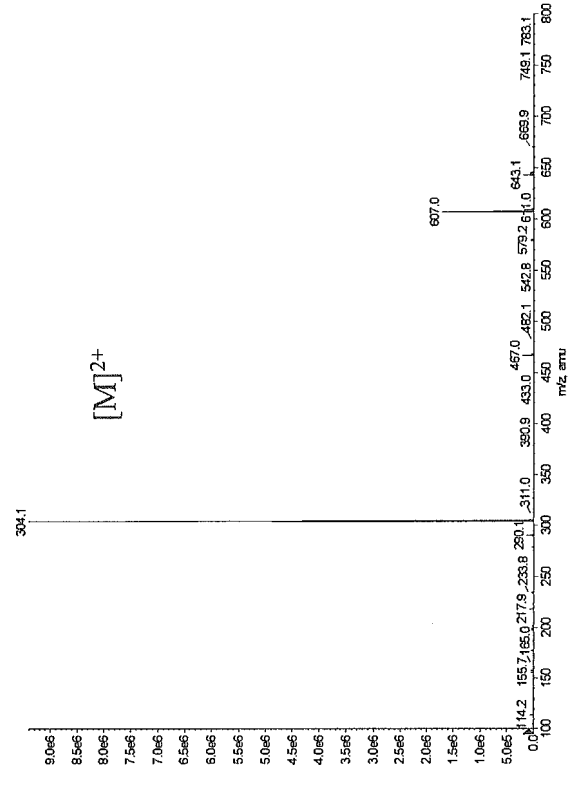
Max. 8.4e6 cps.



TMCBDP
B

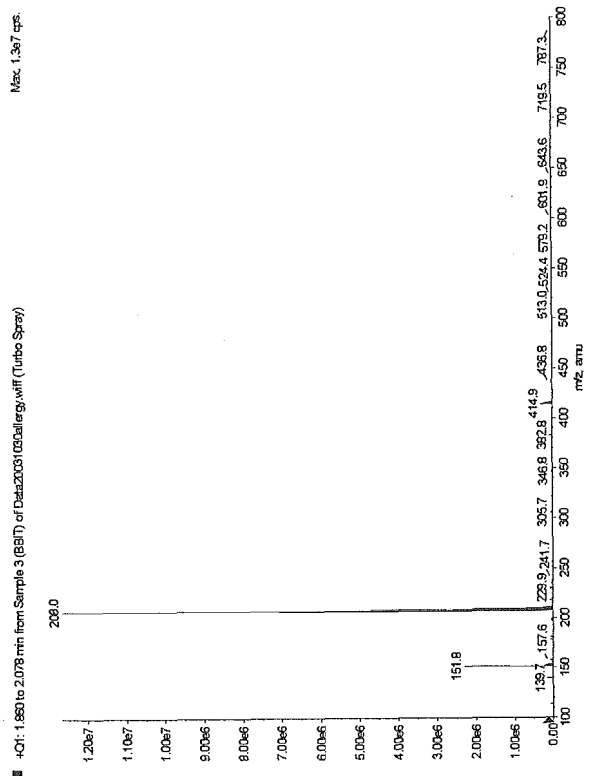
■ +Q1: 6.116 to 6.384 min from Sample 6 (HMBCDPB) of Data20031030allergy.wiff (Turbo Spray)

Max. 9.4e6 cps.

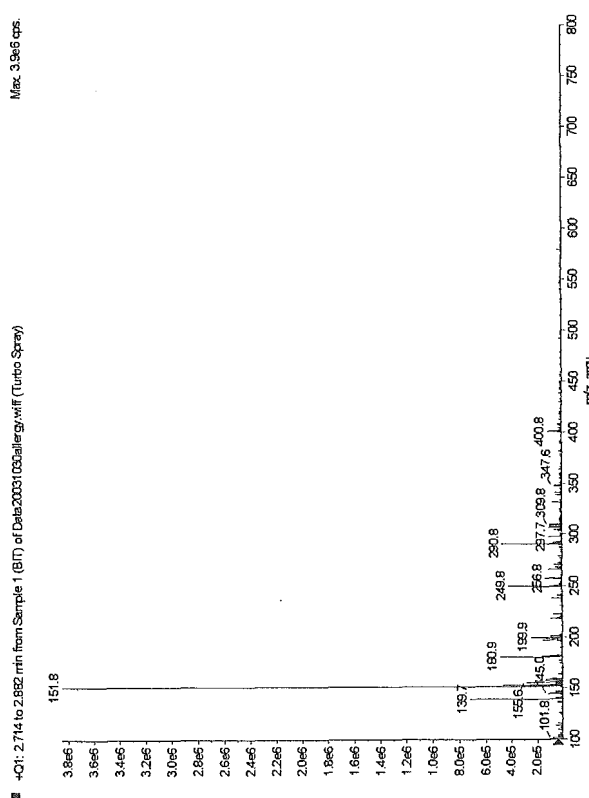


HMBCDPB

図.2-2 TMCBDPBおよびHMBCDPBのマススペクトル



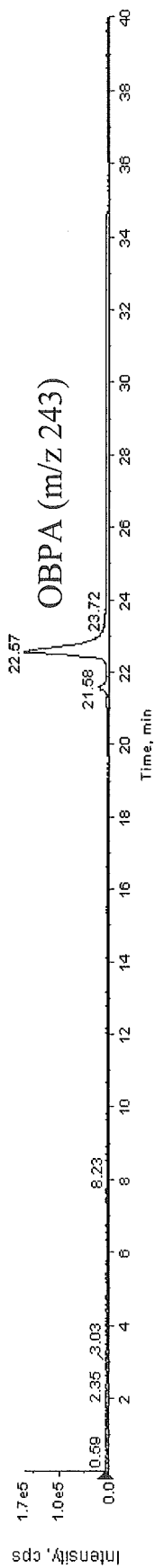
BBIT



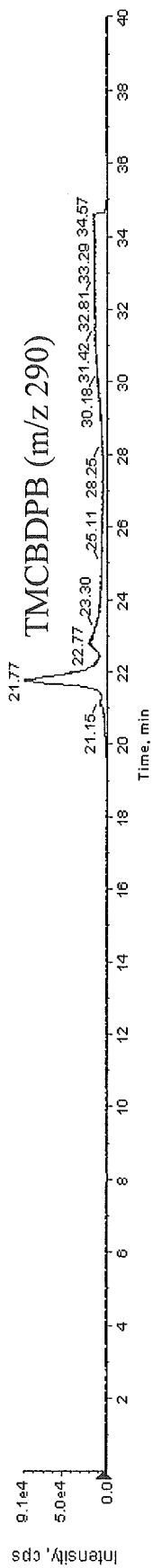
BIT

図.2-3 BITおよびBBITのマススペクトル

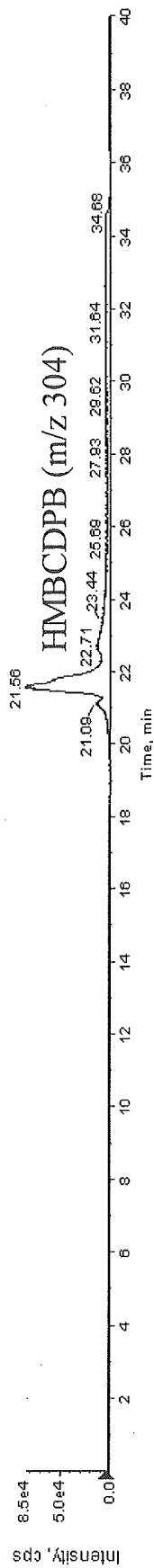
■ XIC of +Q1 M1 (6 ions): 243.0 amu from Sample 3 (200ppb) of Data2003110602.wiff (Turbo Spray)



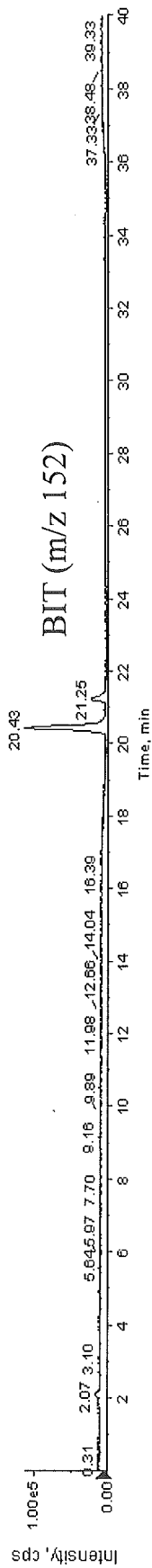
■ XIC of +Q1 M1 (6 ions): 290.0 amu from Sample 3 (200ppb) of Data2003110602.wiff (Turbo Spray)



■ XIC of +Q1 M1 (6 ions): 304.0 amu from Sample 3 (200ppb) of Data2003110602.wiff (Turbo Spray)



■ XIC of +Q1 M1 (6 ions): 152.0 amu from Sample 3 (200ppb) of Data2003110602.wiff (Turbo Spray)



■ XIC of +Q1 M1 (6 ions): 208.0 amu from Sample 3 (200ppb) of Data2003110602.wiff (Turbo Spray)

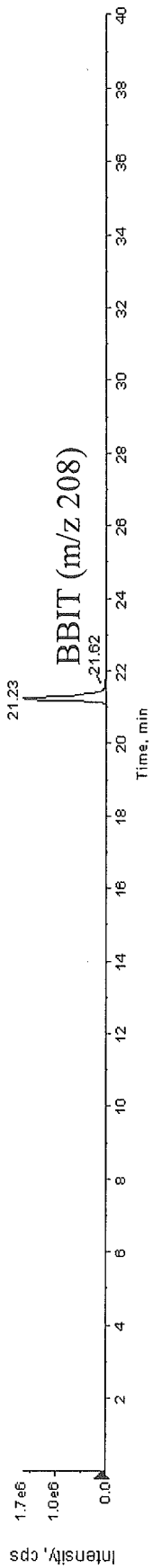


図.2-4 各種抗菌剤のマスキロマトグラム(200 ng/ml, 標準溶液, SIMモード)

表2-1. LC/MSの分析に用いた抗菌剤

抗菌剤	略号
10,10'-オキシビス(フェノキシアルシン)	OBPA
4,4'-(テトラメチレンジカルボニルジアミン)ビス(1-テシピリジニウム ブロマイド)	TMBCDPB
N,N'-ヘキサメチレンビス(4-カルボモイル-1-テシピリジニウム ブロマイド)	HMBCDPB
1,2-ベンゾイソチアゾリン-3-オン	BIT
N-n-ブチル-1,2-ベンゾイソチアゾリン-3-オン	BBIT

表2-2 主なMSの操作パラメータ

Parameter	Setting
イオン化法	エレクトロスプレー法 (ポジティブイオンモード)
イオンスプレー電圧	5.0 kV
カーテンガス	40 ^a
ベーパーライザー温度	500 °C
デクラスタ電圧	30, 50, 50, 20, 20 (それぞれOBPA、TMCBDPB、HMBCDPB、BIT、BBIT)

^a 機器の設定値