

表2-3. OBPAの皮膚感作性試験の結果

惹起濃度	皮膚反応平均評価点(陽性反応率%)				
	0 ppm	5 ppm	50 ppm	500 ppm	5000 ppm
OBPA					
0 ppm	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3 ppm	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10 ppm	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
30 ppm	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1(10)
100 ppm	0.0	0.0	0.0	0.1(10)	0.4(30)
VZPG (OBPA相当濃度)					
0.011 % (3 ppm)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.036 % (10 ppm)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.108 % (30 ppm)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.358 % (100 ppm)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表2-4. OBPAを溶解したプロピレングリコール(PG)溶液に関する皮膚感作性試験の結果

惹起濃度	皮膚反応平均評価点(陽性反応率%)	
	0 ppm	5000 ppm
OBPA		
30 ppm	0.0	0.0
100 ppm	0.0	0.4(30)
300 ppm	1.8(100)	1.8(100)
PG溶液*	(OBPA相当濃度)	
0.108 %	(30 ppm)	0.0
0.358 %	(100 ppm)	0.0
1.08 %	(300 ppm)	0.8(80)
		0.6(60)

*: OBPAを2.8%を含有するプロピレングリコール溶液

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

III. 抗菌剤の生殖・発生毒性の整理と評価

—抗菌剤の内分泌かく乱活性の *in vitro* スクリーニング法による評価—

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

内分泌系が未発達な胎児や未熟な幼児、小児では化学物質による内分泌かく乱作用に対する抵抗性が低いと考えられている。特に、胎児や新生児においては、内分泌系の器官の形成に異常や遅滞を来すことにより不可逆的な影響を及ぼす可能性も考えられる。故に、家庭用品に使用される抗菌剤について内分泌かく乱作用を評価することは重要なことである。そこで本研究では、抗菌剤 20 化合物について、*in vitro* における内分泌かく乱物質のスクリーニング法であるヒトのエストロゲンレセプター(ER)を用いた ER 結合試験と組換え酵母を使用した YES 試験を行い、その活性を測定し、抗菌剤に関する内分泌かく乱作用についての評価を行った。その結果、今回採用した ER 結合試験および YES 試験により家庭用品に使用される抗菌剤の内分泌かく乱作用(エストロゲン作用)に関する評価が可能であることがわかった。本研究で ER 結合試験により陽性となった抗菌剤は 12 種、YES 試験で陽性となった抗菌剤は 1 種であった。これらの *in vitro* 試験で陽性となった抗菌剤についてはさらなるスクリーニング法による評価が必要と考えられる。

A. 研究目的

近年、ヒトや野生動物の内分泌系をかく乱する可能性がある化学物質についての報告が多くなされており、ポリカーボネート樹脂の原料であるビスフェノール A や樹脂の添加剤あるいは界面活性剤と使用しているノニルフェノールなどについてエストロゲン活性が報告されている。このような活性を持つ化学物質の影響としてホルモン依存性のガンの形成、生殖管の異常、精子数と精液量の減少などの生殖系の異常などが起こると考えられている。とりわけ内分泌系が未発達な胎児や未熟な幼児、小児では化学物質による内分泌かく乱作用に対する抵抗性が低いと考えられている。特に胎児や新生児においては、内分泌系の器官の形成に異常や遅滞を来すことにより不可逆的な影響を及ぼす可能性も考えられる。著者らはラットの胎児期あるいは新生児期にビスフェノール A あるいはノニルフェノールを暴露させることにより、雌雄ラットの生殖系臓器に形態的な変化を誘発することを報告した(清水ら、2003)。このように胎児期や新生児期においてはより重大な影響が引き起こされる可能性があり、故に我々を取り巻いている生活環境に存在する多くの化学物質のホルモン様作用を評価することは重要なことである。

このような背景から化学物質のホルモン様作用を評価するための *in vitro* (試験管)あるいは *in vivo* (生体)におけるスクリーニング法の開発がされている。OECD や US-EPA は内分泌かく乱作用の評価として *in vivo* 試験を推奨しているが、短期の *in vivo* 試験法はまだ確立されておらず、二世代繁殖性試験が最終的な評価手段となっている。しかし、ラット・マウス等の実験動物を使用する内分泌かく乱作用物質の評価には、多くの経費・時間・労力が必要である。さらに動物愛護の観点から、内分泌かく乱物質の 1 次スクリーニングとして、簡便で安価な *in vitro* における試験法が求められている。

in vitro における 1 次スクリーニングの方法としては、エストロゲンレセプター(ER)への化学物質の親和力を指標とする ER 結合試験(Bolger et al., 1998; Danzo, 1997)や遺伝子導入を行った酵母によって化学物質の ER への親和力と遺伝子発現能力を検討する yeast estrogen screen (YES)試験法(Routledge & Sumpter, 1996; Zacharewski, 1997; Coldham et al., 1997; Arnold et al., 1996)、ヒト乳ガン細胞 MCF-7 の増殖を指標とする MCF-7 細胞増殖試験(Breinholt & Larsen, 1998)と、YES 試験で使用する酵母と類似の遺伝子を導入した乳ガン細胞を使用する MVLN assay(Edmunds et al., 1997; Meek, 1998)などが開発されている。

今回、抗菌作用のある抗菌剤の内分泌かく乱作用を *in vitro* における 1 次スクリーニング試験法で評価が可能であるかどうかを、さらに各種の抗菌剤に関して内分泌かく乱作用の有無やその程度を、ER 結合試験ならびに YES 試験法を用いて検討してみた。

B. 実験方法

1. 被検物質

表 3-1 に示した抗菌剤をジメチルスルホキシド (DMSO)により溶解し試料溶液とした。MBIC のみ 5,000 µg/mL とし、他の抗菌剤は 10,000 µg/mL で試料溶液を調製した。陽性対照として 2×10^{-7} M (0.054 µg/mL) 17β-エストラジオール(SIGMA 社製)を DMSO により調製した。

2. ER 試験

2-1. エストロゲン-R(α)コンペチタースクリーニングキット

ER 結合試験にはヒト型 ER を利用したキットが商品化されている。ヒト型 ER を固相化したマイクロプレート上で、蛍光標識されたエストラジオールを含む試薬を用いて競合的に ER に対する親和性を持つ化学物質を検出できる。今回、ヒト型 ERα をレセプターとして利用しているエストロゲン-R(α)コンペチタースクリーニングキットを和光純薬工業(株)から購入し、用いた。

2-2. 活性の測定

96 ウェルのマイクロプレート上で原液から DMSO で 3 倍希釈を繰り返した試料を調製し、原液と希釈調製した試料をすべてのウェルから 6 µL ずつ新しい 96 ウェルプレートに移した。そこにキットの Reaction Solution 114 µL を加え、混合した。混合液 100 µL をキットの ERα 固相化ドライマイクロプレートに移し、室温で 2 時間静置した。洗浄液で洗浄後、蛍光強度(励起波長: 485 nm/ 蛍光波長: 535 nm)を測定した。蛍光強度の測定は、蛍光プレートリーダーの代用として ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems Inc.製)で蛍光波長: 535 nm の測定を行った。

2-3. 判定基準

本キットでは検体化学物質の ERα への親和力を蛍光標識エストラジオールと競合させることにより測定しているため、測定された蛍光強度が弱ければ、検体が ERα に多く結合したことになる。試料それぞれの濃度における蛍光強度を次式によって、蛍光エストラジオール結合阻害率として計算し、プロットした。

$$\text{阻害率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{試料添加時の蛍光強度}}{\text{無添加時の蛍光強度}} \right) \times 100$$

グラフにおいて、濃度依存的に ERα に親和性を示した抗菌剤を陽性と判断した。上記の条件

が満たされない場合は陰性と判断した。陽性結果が得られた場合、阻害率 30 %を示す試料濃度を IC₃₀ (µg/mL)として求め、次式によりエストラジオールの IC₃₀を 100 とし、試料の ERα への相対結合活性 (RBA: relative binding activity)値を計算した。

$$\text{RBA (\%)} = \frac{\text{エストラジオールのIC}_{30}}{\text{試料のIC}_{30}} \times 100$$

3. YES 試験

3-1. 試験菌株

遺伝子導入された酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)は Glaxo Wellcome (Stevenage, Herts, U.K.)から分譲を受けた。この酵母はヒトの ERα 遺伝子および estrogen response element (ERE)とレポーター遺伝子を導入されたものである。

表 3-2 の酵母培養用培地において 28°C で 24 時間培養した酵母を前培養酵母とし、新しい培地に一部加え、更に 28°C で 24 時間培養した。酵母を遠心(4°C で 10 分間、2,000g)して集菌し、終濃度 5 %になうように glycerol を加えた培地に再懸濁し、分注後、-20°C で保存したものを保存菌とした。

3-2. 活性の測定

実験は Routledge & Sumpter の手法(Routledge & Sumpter, 1996)に従い、一部改変して行った(中間ら, 1999)。酵母培養用培地は(株)機能性ペプチド研究所(山形市)において調製・ろ過滅菌されたものを使用した。

96 ウェルのマイクロプレート上で原液から DMSO で 3 倍希釈を繰り返した試料を調製し、原液と希釈調製した試料をすべてのウェルから 10 µL ずつ新しい 96 ウェルプレートに移した。一方、50 mL 培地に 0.5 mL の 10 mg/mL Chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG; ベーリンガーマンハイム)と 8×10⁷ 個の前培養した酵母を添加する。酵母と発色基質を含むこの培地を、前述の試料を 10 µL ずつ移したプレートに 200 µL ずつ分注した。シーリングをして、2 分間激しく攪拌後、32°C で二晩培養した。培養途中ウェルの底に沈殿した酵母を拡散するために 2 分間激しく攪拌した。測定前に 2 分間激しく攪拌し、1 時間静置した後、プレートリーダー(Titertek Multiskan MCC)ですべてのウェルの 540 nm と 640 nm の吸光度を測定した。

3-3.増殖阻害の評価

使用する化学物質が抗菌剤ということで、YES 試験に使用する酵母に対する抗菌剤の影響を酵母の濁度によって評価した。YES 試験の手順に従って、培養を開始して 2 日後の濁度を測定し、コントロール(無処理)における酵母の濁度と比較した。最も希釈された抗菌剤試料(試験最高濃度の 3^{11} 倍希釈)における濁度が、コントロールの濁度の 2 分の 1 以下を示している場合は、酵母に対する増殖阻害により評価できないと判断した。

3-4. 判定基準

酵母内で ER α と検体が結合した後、核外にあるプラスミド上の ERE に結合するとレポーター遺伝子である β -ガラクトシダーゼが発現する。実験中に培地に加えられた CPRG はこの酵素により分解し、培地は赤色に変色する。この赤色がレポーター遺伝子の発現量であるが、酵母が存在するため濁度の補正を行わなければならない。補正は次式によって行った。

$$\text{補正吸光度} = \text{試料吸光度}(540 \text{ nm}) - [\text{試料吸光度}(620 \text{ nm}) - \text{ブランク吸光度}(620 \text{ nm})]$$

補正を行った吸光度と添加試料濃度によるプロットを行った。グラフにおいて、濃度依存的に吸光度が高まった抗菌剤を陽性と判断した。上記の条件が満たされない場合は陰性と判断した。陽性結果が得られた場合、試料の最大吸光度の 50 %の効果を示す試料濃度を EC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) として求め、次式によりエストラジオールの EC₅₀ を 100 とし、試料の相対活性(RP: relative potency)値を計算した。

$$\text{RP} (\%) = \frac{\text{エストラジオールのEC}_{50}}{\text{試料のEC}_{50}} \times 100$$

C. 結果

1. ER 試験

濃度依存的に阻害率が高まった抗菌剤が 12 種観察された。それらを陽性と判断し、それぞれの IC₃₀ と RBA を表 3-3 に示した。エストラジオールでは 9.7×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$ という極めて低い濃度によって 30%阻害がおこったが、阻害を示した 12 種の抗菌剤では 2~445 $\mu\text{g/mL}$ という濃度を必要とした。RBA は 0.0003~0.000002 とエストラジオールの 30 万~5000 万分の 1 の活性で

あった。また、最も濃い添加濃度における阻害率は試料によってばらつきがあり、HO, DMO, IPBC では 40 %程度の、BECDIP, TPN, TCMSp, CPIP, HMBCDPB では 60~70 %の阻害率が認められた。PCMX, TCMTBT, PCMC, TMBCDPB では 80~90 %の高い阻害率が観察された。

2. YES 試験

2-1. 酵母の増殖阻害

ZPT、TCMSp、HMBCDPB は 2.7×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3^{11} 倍希釈)において酵母の増殖を阻害した(表.3-4)。よってこれら 3 種の抗菌剤は YES 試験において評価できないと判断した。MBIC は 2.4×10^2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても酵母に対し増殖阻害は示さなかった。その他の抗菌剤も濃度に差はあるもののいずれも増殖阻害活性が認められたが、影響を受けない希釈倍率の試料がいずれの試料にも存在することから、YES 試験を行うことが可能と判断した。

2-2. エストロゲン活性評価

濃度依存的に吸光度が増加した抗菌剤は PCMC のみであった。これを陽性と判断し、 EC_{50} と RP を表 3-5 に示した。エストラジオールの EC_{50} は 9.06×10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$ ときわめて低濃度であった。陽性であった抗菌剤 PCMC の EC_{50} は 33.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。RP は 0.00003 であり、エストラジオールの 330 万分の 1 の活性であることがわかった。陽性であった PCMC は酵母に対する増殖阻害の低い抗菌剤であった。また、PCMX においてわずかに吸光度の上昇が認められ、プレート観察によってもわずかに赤色が認められたが、濃度依存性がないことと吸光度が極めて低いことから疑陽性と判断した。

D. 考察

本研究で実施した ER 試験により 12 種の抗菌剤が ER に対して親和性を示したことから、これらの抗菌剤は内分泌かく乱作用を引き起こす可能性があるかと推測される。本方法は、蛍光プレートリーダーが必要であるが、市販されているキットを使用し、短時間に化学物質の ER への親和力の評価が行えることから、内分泌かく乱物質の 1 次スクリーニングとしては最も簡便な方法であると考えられる。しかし、ER 試験は単に ER と化学物質が親和性を示したということのみを示している。すなわち、生体内においては引き続いて起こる遺伝情報の発現等を考えていない。また、生体内で引き起こされる化学物質の代謝なども考慮されていない。そこで ER への化学物質の結合能力とその ER+化学物質複合体の遺伝情報の発現活性を調べることができる YES

試験はより生体内に近い試験と考えられる。

本研究で採用した YES 試験を用いて既に Sumpter らにより、フタル酸エステル(Harris et al., 1997)やアルキルフェノール化学物質(Routledge & Sumpter, 1997)など、Perez らによりジフェニルアルケン(Perez et al., 1998)のエストロゲン活性についての検討が行われている。また、種々の環境化学物質のエストロゲン活性のラット S9 の薬物代謝酵素の有無の条件下での検討も行われている(中間ら, 1999)。過去の報告された化学物質の構造とエストロゲン活性との関係においては、フェノール構造とそれにつづく種々の炭素骨格構造を持つ化合物がエストロゲン活性を持つ可能性が高いといわれている。今回試験を行った抗菌剤の中でその構造に当てはまるものは、PCM_X と PCM_C がある(図 3-1)。PCM_C は YES 試験で陽性を示し、さらに、PCM_C も疑陽性を示しており、これらのエストロゲン活性は構造からも裏付けられる。また、YES 試験において陽性であった PCM_C の活性の強さを、内分泌かく乱物質として広く知られているビスフェノール A(EC₅₀ = 9 µg/mL)やノニルフェノール(EC₅₀ = 0.4 µg/mL)の EC₅₀(中間ら, 1999)で比較すると(表 3-5)、ビスフェノール A の 4 分の 1 程度の、ノニルフェノールの 80 分の 1 程度の活性しか持たないことがわかった。

一方、本試験に用いた試料は抗菌剤であるためその抗菌作用による YES 試験における酵母の増殖への影響が懸念された。本試験において ZPT、TCMSP、HMBCDPB は非常に低濃度において酵母の増殖を阻害したため、YES 試験への適用は出来ないと判断した。このように抗菌剤の YES 試験への適用には酵母に対し増殖阻害を十分に考慮する必要があることがわかった。

抗菌剤の YES 試験における酵母への増殖阻害作用と抗菌剤の細胞毒性試験(五十嵐良明, 2004)とを比較すると、ZPT はいずれにおいても最も強い細胞毒性作用および酵母の増殖阻害作用を示した。今回検討したいずれの抗菌剤も細胞毒性試験および YES 試験でも培養細胞および酵母に対して同じような毒性および増殖阻害作用が観察されたが、酵母に対し増殖阻害作用が観察されなかった MBIC は、細胞毒性では強い活性(IC₅₀ = 23.1 µg/mL)が認められている。また、HO においても同様の傾向が認められる。これらの差は酵母と培養細胞の膜などの構造上の違いや代謝系の違いなどによって毒性および増殖阻害作用の差が現れたものと考えられる。

抗菌剤を対象に行った 2 つの *in vitro* 試験の結果を表 3-6 にまとめた。まず、ER 試験では 20 種の抗菌剤のうち 12 種の抗菌剤(60%)が陽性であり、YES 試験では 1 例のみが陽性、1 例は疑陽性となった。これらの試験の検出率の差異は、その作用機序の精度の差によるものと考えられる。すなわち、ER 試験は単に ER と化学物質が親和性を示したということのみを示している

が、YES 試験では酵母に組み込まれたレポーター遺伝子の発現という一連の生体内での応答を利用することで、エストロゲン活性をより高精度で評価できるものと考えられている。従って、YES 試験で陽性となった抗菌剤に関する安全性評価における意義は大きいと思われる。

以上のように、今回採用した ER 結合試験および YES 試験により家庭用品に使用される抗菌剤の内分泌かく乱作用(エストロゲン様作用)に関する評価が可能であることがわかった。これらの *in vitro* 試験で陽性となった抗菌剤についてはさらなるクリーニング法により評価が必要と考えられる。

E. 結論

抗菌剤の内分泌かく乱作用を *in vitro* における1次スクリーニング試験法で評価が可能であるかどうかを、さらに 20 種の抗菌剤に関して内分泌かく乱作用の有無やその程度を調べるために、ER 結合試験ならびに YES 試験法を用いて検討した。

1. ER 試験では 20 種の抗菌剤のうち 12 種で陽性であった。すなわち、ヒト ER(α)への結合が認められた。しかし、その活性はエストラジオールの 30 万～5000 万分の 1 であった。
2. YES 試験では 20 種の抗菌剤のうち 1 種で陽性であった。すなわち、ヒト ER(α)への結合と遺伝子の発現が認められた。しかし、その活性はエストラジオールの 330 万分の 1 であった。
3. 以上のように、今回採用した ER 結合試験および YES 試験により家庭用品に使用される抗菌剤の内分泌かく乱作用(エストロゲン様作用)に関する評価が可能であることがわかった。これらの *in vitro* 試験で陽性となった抗菌剤についてはさらなるスクリーニング法により評価が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉: ラットの胎生期および新生児期に 4-nonylphenol あるいは bisphenol A を暴露したときの雌雄生殖器官への影響—雌雄生殖器官の組織学的変化—, 大阪市環境科学研報告 2003: 65: 17-23
2. 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉: 異なる週齢のラットを用いた子宮肥大試験と Hershberger 試験, 大阪市環境科学研報告 2003: 65: 9-16

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録の状況

なし

参考文献

1. Arnold, S. F., Rovinson, M. K., Notides, A. C., Guillette, L. J., Jr and McLachlan, J. A.: A yeast estrogen screen for examining the relative exposure of cells to natural and xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*, 1996: 104, 544-548.
2. Bolger, R., Wiese, T. E., Ervin, K., Nestich, S. and Checovich, W.: Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environmental Health Perspectives*, 1998: 106, 551-557.
3. Breinholt, V. and Larsen, J. C.: Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay. *Chemical Research in Toxicology*, 1998: 11, 622-629.
4. Coldham, N. G., Dave, M., Sivapathasundaram, S., McDonnell, D. P., Connor, C. and Sauer, M. J.: Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environmental Health Perspectives*, 1997: 105, 734-742.
5. Danzo, B. J.: Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environmental Health Perspectives*, 1997: 105, 294-301.
6. Edmunds, J. S. G., Fairey, E. R. and Ramsdell, J. S.: A rapid and sensitive high throughput reporter gene assay for estrogenic effects of environmental contaminants. *NeuroToxicology*, 1997: 18, 525-532.
7. Harris, C. A., Henttu, P., Parker, M. G. and Sumpter, J. P.: The estrogenic activity of phthalate esters in Vitro. *Environmental Health Perspectives*, 1997: 105, 802-811.
8. Meek, M. D.: Ah receptor and estrogen receptor-dependent modulation of gene expression by extracts of diesel exhaust particles. *Environmental Research (sec. A)* 1998: 79, 114-121.
9. Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V. and Olea, N.: The estrogenicity of bisphenol A- related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environmental Health Perspectives*, 1998: 106, 167-174.

10. Routledge, E. J. and Sumpter, J. P.: Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996: 15, 241-248.
11. Routledge, E. J. and Sumper, J. P.: Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogeinc activity. *Journal of Biological Chemistry*, 1997: 272, 3280-3288.
12. Zacharewski, T.: In Vitro bioassays for assessing estrogenic substances. *Environmental Science & Technology*, 1997: 31, 613-623.
13. 五十嵐良明. 抗菌剤の優先順位リストの作成及びそのための基礎データの収集. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)「抗菌加工製品における安全性評価及び製品情報の伝達に関する調査研究」研究報告書(2004)
14. 中間昭彦, 船坂邦弘, 北野雅昭, 川越保徳, 芳倉太郎, 福永勲. YES 試験法を用いた生活環境中の estrogen 活性を持つ化学物質のスクリーニング. *大阪市立環科研報告*, 1999: 61, 64-71.

研究協力者

大阪市立環境科学研究所

船坂 邦弘

中間昭彦

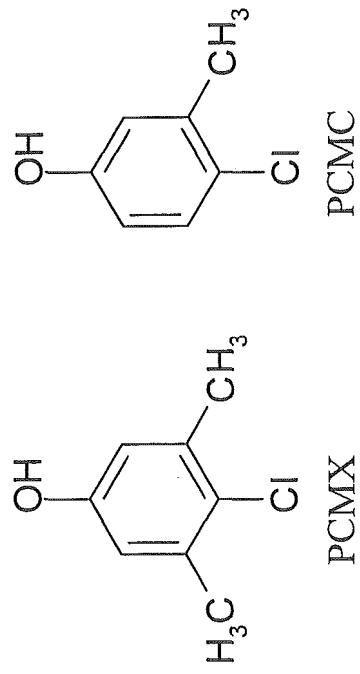


図3-1. PCMX, PCMCの化学構造

表3-2. YES試験用の酵母増殖培地の組成

	(mg/L)		(mg/L)
L-leucine	45	adenine	45
L-histidine	45	thiamine	0.4
L-arginine·HCl	18	pyridoxine	0.4
L-methionine	18	pantothenic acid	0.4
L-tyrosine	27	inositol	2
L-isoleucine	27	biotine	0.02
L-lysine·HCl	27	D-(+)-Glucose	20,000
L-phenylalanine	22.5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	369
L-glutamic acid	90	CuSO ₄ ·5H ₂ O	12.5
L-valine	135	Fe ₂ (SO ₄) ₃	0.72
L-serine	337.5	KH ₂ PO ₄	12,249
L-aspartic acid	100	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,782
L-threonine	192	KOH	3,780
			(pH 7.1)

表3-3. ER試験で陽性を示した抗菌剤およびエストラジオールの活性
(ERに対して親和性の強かった抗菌剤から順に表記)

番号	IC ₃₀ (μg/mL)	RBA (%)
17β-エストラジオール	9.7×10 ⁻⁶	100
11 TPN	2	0.0005
12 TCMSP	3	0.0003
10 PCMX	14	0.00007
15 PCMC	19	0.00005
18 CPIP	41	0.00005
9 HO	45	0.00002
13 TCMTBT	70	0.00001
5 BECDIP	116	0.000008
20 HMBCDPB	158	0.000006
19 TMBCDPB	186	0.000005
14 DMO	289	0.000003
17 IPBC	445	0.000002

IC₃₀: ERαへの蛍光ラベル17β-エストラジオールの結合を30%阻害する試料化学物質の濃度

$$\text{RBA: 相対結合活性(\%)} = \frac{\text{エストラジオールの IC}_{30}}{\text{試料の IC}_{30}} \times 100$$

表3-4. YES試験に使用する酵母に抗菌剤が増殖阻害を示す濃度
(阻害作用の強かった抗菌剤から順に表記)

番号	抗菌剤	($\mu\text{g/mL}$)
4	ZPT	$< 2.7 \times 10^{-3}$
12	TCMSP	$< 2.7 \times 10^{-3}$
20	HMBCDPB	$< 2.7 \times 10^{-3}$
3	OBPA	8.1×10^{-3}
18	CPIP	8.1×10^{-3}
8	BIT	2.4×10^{-2}
5	BECDTP	7.3×10^{-2}
13	TCMTBT	7.3×10^{-2}
11	TPN	2.2×10^{-1}
17	IPBC	2.2×10^{-1}
2	HICHO	6.5×10^{-1}
7	BBIT	6.5×10^{-1}
19	TMBCDPB	6.5×10^{-1}
6	BNDP	2.0×10^0
10	PCMX	5.3×10^1
16	CAA	5.3×10^1
9	HO	1.6×10^2
14	DMO	1.6×10^2
15	PCMC	1.6×10^2
1	MBIC	$> 2.4 \times 10^2$

酵母の濁度(増殖)が、無処理群の1/2以下の値を示した試料の最低濃度

表3-5. YES試験で陽性を示した抗菌剤とエストラジオールおよび既知内分泌かく乱物質の活性

番号	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	RP (%)
17 β -エストラジオール	9.06×10^{-6}	100
ノルフェネコール ¹⁾	0.4	0.002
ビスフェノールA ¹⁾	9	0.0001
15 PCMC	33.6	0.00003

$$\text{RP: 相対活性(\%)} = \frac{\text{エストラジオールの EC}_{50}}{\text{試料の EC}_{50}} \times 100$$

¹⁾ 中間ら (1999)

抗菌剤・抗菌加工製品による耐性菌の発生に関する評価、身体の部位別にみた皮膚常在菌の実態調査

分担研究者 高鳥浩介 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長

研究要旨

生活用品として抗菌製品が広く用いられている。これら抗菌製品は微生物に対する抵抗性を有しているが、長期接触による微生物の抗菌製品に対する抵抗性変化はほとんど知られていないのが現状である。そこで抗菌製品に広く使われている2抗菌剤の継続暴露による微生物抵抗性評価を実施した。

抗菌製品などに使われている抗菌剤としてbronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol), およびchloroxylenol (4-chloro-3,5-dimethylphenol), を用い、供試菌株として細菌:*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 真菌:*Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* IFO 6661を用いた。

継続暴露法は抗菌剤を各微生物に適した培地に添加し所定時間培養を繰り返した。すなわち、微生物の発育した抗菌剤最大濃度とする培地から鈎菌し、抗菌剤に対する抵抗性を継続暴露することにより評価した。また抗菌剤暴露による抵抗性株の表現形質による抵抗性変化について検討した。さらに抵抗性とタンパク発現性について基礎検討した。

その結果、供試した抗菌剤はいずれも長期継続暴露することにより抵抗性を示した。この抵抗性株について、抗菌剤に対する馴化または耐性獲得の関連性を確認したところ、抵抗性株で明らかなタンパク発現を認めており、このことが抵抗性とどのように関わるかさらに研究する必要がある。

A. 研究目的

生活環境には多数の抗菌加工製品があり、ヒトの清潔志向、健康志向と相まって市場では付加価値のある日常商品として利用されている。今日ではこうした抗菌加工製品は日常的であり、ヒトの生活環境の多くの場面で意識することなく使用されている。抗菌加工製品の機能は、抗菌活性を有していることであるが、市場に出回っている製品はこのような効果を維持しているか、不明な部分がある。同様に抗菌加工製品の長期利用により、抗菌活性の持続が得られるか十分に検討されていない。本研究は、これら抗菌加工製品の抗菌活性を再確認するために行われるものであるが、製品に添加される抗菌剤の抗菌活性を長期接触することによる影響を検討するために日常的にみられる微生物に関して長期接触による抗菌効果の変化を把握することとした。

生活用品として抗菌製品が広く用いられ、これら抗菌加工製品は微生物に対する抵抗性を有しているが、長期接触による微生物の抗菌加工製品に対する抵抗性変化はほとんど知られていないのが現状である。そこで本研究は抗菌加工製品に広く使われている抗菌剤の継続暴露による微生物抵抗性を検討した。

B. 研究方法

抗菌製品などに使われている抗菌剤として
1) bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol)
2) chloroxylenol (4-chloro-3,5-dimethylphenol)
供試菌株として

- 1) *Escherichia coli* ATCC25922,
- 2) *Staphylococcus aureus* ATCC25923,
- 3) *Candida albicans* ATCC10231,
- 4) *Aspergillus niger* IFO6661

を用いた。

以下に試験法をまとめた（図1）。

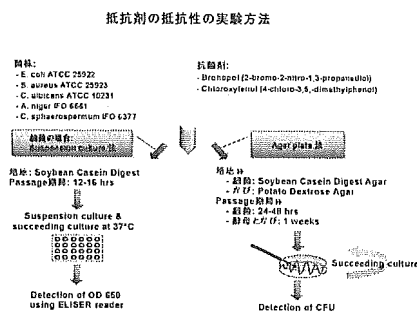


図1 抗菌剤の継続暴露による抵抗性評価

1) 前培養

各微生物に適した寒天培地（細菌：Soybean Casein Digest Agar, 真菌：Potato Dextrose Agar）を選択した。すなわち、細菌はSCD寒天培地で24時間培養し、けんたく液を調製、真菌はPD寒天培地に接種後25℃、7日間培養し孢子産生を確認したあと0.05%Tween80液で孢子液を調製した。

2) 継続暴露試験

抗菌剤の希釈系列を調製し、これを各微生物に適した寒天培地（細菌：Soybean Casein Digest Agar, 真菌：Potato Dextrose Agar）に添加し、細菌はSCD寒天培地で24-48時間培養により継代を繰り返し、真菌は予め前培養した0.05%Tween80液で孢子液を抗菌剤添加培地で継代を繰り返した。それぞれ30-35代繰り返しその時の抗菌剤抵抗性を評価した。

3) 継続暴露による生残菌数比較試験

継続暴露による生残菌数比較試験では液体培養法により評価した。すなわち細菌ではSoybean Casein Digest ブロス, 真菌ではPotato Dextrose ブロスを用い、抗菌剤添加培地で細菌12-16時間培養後、発育した抗菌剤最大濃度とする寒天培地からコロニーを拾い、このコロニーについて抗菌剤に対する抵抗性を生残菌数で評価した。

4) 真菌の抗菌剤抵抗性性状変化

供試真菌をポテト・デキストロース寒天斜面培地(PDA)にうえ、25℃、10日間培養後に0.01%ラウリル硫酸生食液を加え、以下常法に従って孢子浮遊液約 1×10^6 /mLを作製した。各希釈抗菌剤濃度とした寒天培地に孢子浮遊液0.1mLを加え、25℃にて培養し、これを継代繰り返した。判定は7-10日培養後におこなった。

C. 研究結果

1. 継続暴露試験

*E. coli*を用いたbronopolの継代試験を実施した。MICは12ug/mlであったが、35代では29.6ug/mlであり、明らかに抵抗性を維持した(図2)。ただし、途中の10代では初期時と変化なかった。

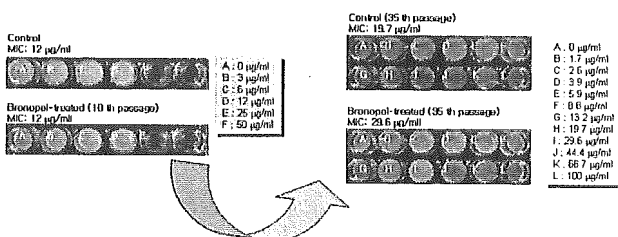


図2 *E. coli*のBronopol(2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol)に対する抵抗性(Agar Plate法)

*S. aureus*を用いたbronopolの継代試験を実施した。MICは*E. coli*と同じく12ug/mlであったが、10代では、25ug/mlであり、35代ではさらに抵抗性を示し44.4ug/mlであり、明らかに抵抗性を維持した(図3)。

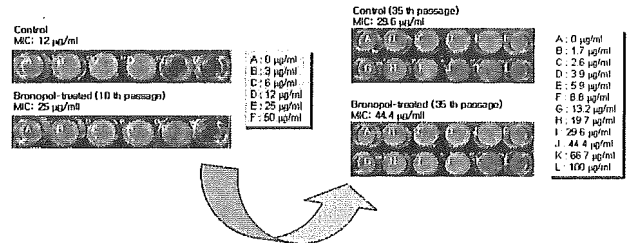


図3 *S. aureus*のBronopol(2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol)に対する抵抗性(Agar Plate法)

2. 継続暴露による生残菌数比較試験

そこで、はたして抗菌剤処理によりどの程度活性が低下しているか検討した。まず、抗菌剤処理による初代時での経日的生残性を検討した。*E. coli*, および*S. aureus*のbronopol各濃度での生残性を1, 2, 3および4日経過後に測定した。その結果、高濃度になるにつれ、さらに日数が進むにつれ生残性は低下した。しかし低下率は著しいものではなかった(図4, 図5)。

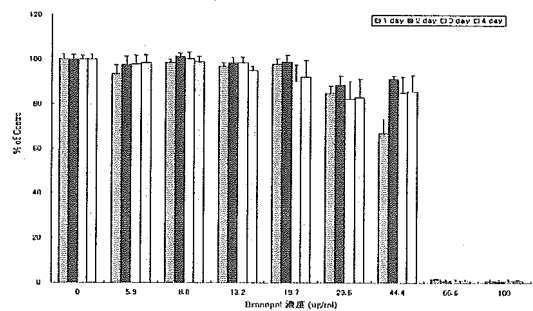


図4 *E. coli*に対するBronopol(2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol)の生残性変化

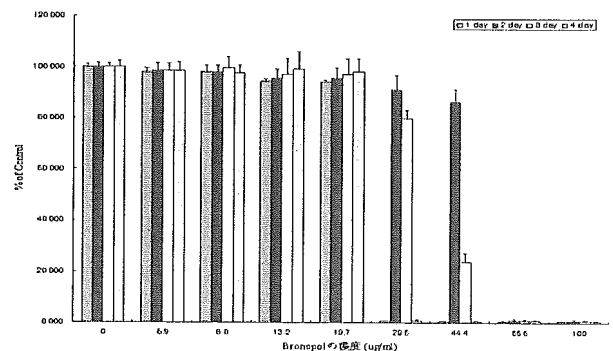


図5 *S. aureus*に対するBronopol(2-bromo-2-nitro-