

1,3-propanediol)の生残性変化

次に液体培養による抗菌剤抵抗性変化をみた。*E. coli*を bronopol と処理して初代から20代まで継代した。その間の抵抗性は液体培養では著しい変化を認めないが、それでも抵抗性が確認された(図6)。

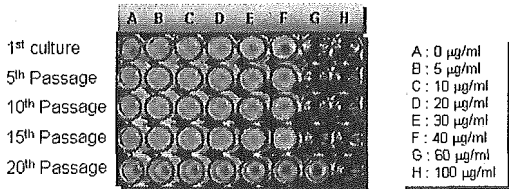


図6 *E. coli* の Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) に対する抵抗性(Suspension culture 法)

そこでさらに生残性を初代、5代、10代、20代継代することにより抗菌剤各濃度での生残率を比較した。その結果、抗菌剤低濃度では、初代から20代まで大きな生残率の変化を認めないが、抗菌剤が20, 30, 40, 60ug/ml と高濃度になるにつれ継代の多いほど生残率が高くなっている傾向にあった(図7)。

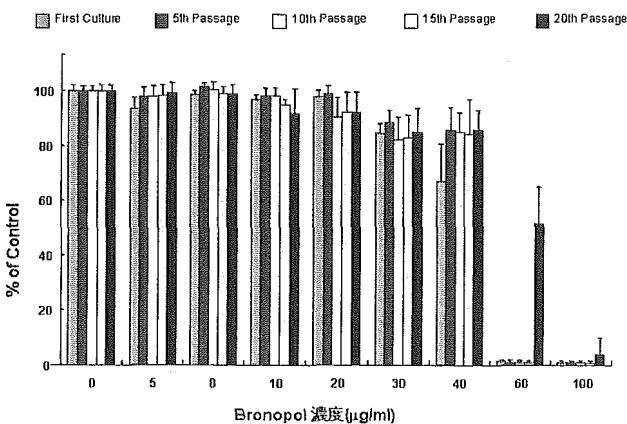


図7 *E. coli* の Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) 継続暴露による生残性変化

同様に *S. aureus* を bronopol と処理して初代から20代まで継代した。その間の抵抗性は *E. coli* と同じく液体培養では著しい変化を認めないが、それでも抵抗性が確認された(図8)。さらに生残性を初代、5代、10代、20代継代することにより抗菌剤各濃度での生残率を比較した。その結果、抗菌剤低濃度では、初代から20代まで大きな生残率の変化を認めないが、抗菌剤が *E. coli* より低濃度の10, 20, 30, 40ug/ml で変化がみられ、特に高濃度になるにつれ継代の多いほど生残率が高くなっている傾

向にあった(図9)。

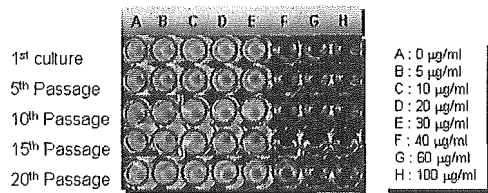


図8 *S. aureus* の Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) に対する抵抗性(Suspension culture 法)

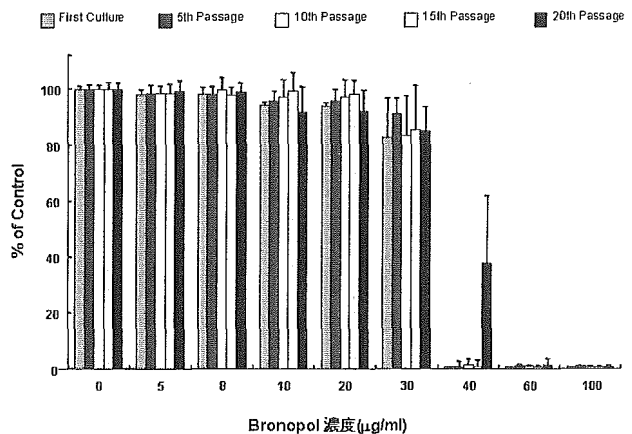


図9 *S. aureus* の Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) 継続暴露による生残性変化

*E. coli* および *S. aureus* が bronopol に対して継代が進むにつれ抵抗性変化が現れたことから、その要因として細胞内の抵抗活性変化が生じているものと思われ、抵抗性維持と関わりの強い蛋白についてその発現性を SDS-PAGE で分画し検索した。その結果、初代と抵抗性株の間に *E. coli*, *S. aureus* とともに明らかな蛋白発現性に差を認めた(図10, 11)。

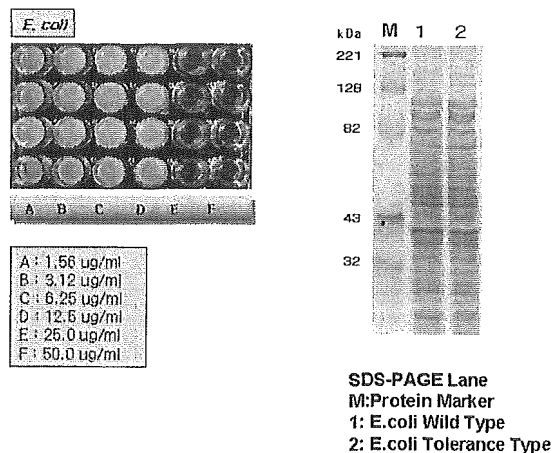


図10 Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) に対する *E. coli* 抵抗菌株の蛋白質発現

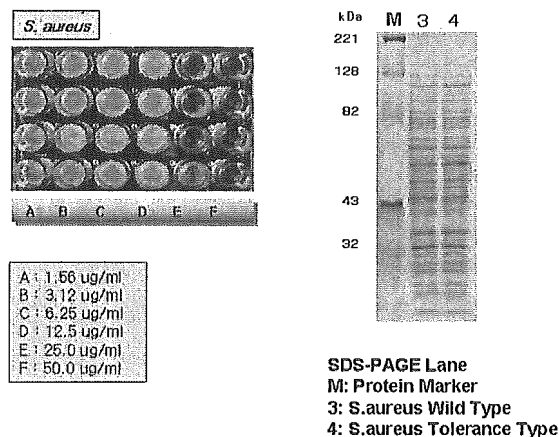


図 1 1 Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) に対する *S. aureus* 抵抗菌株の蛋白質発現

### 3. 真菌の抗菌剤抵抗性による性状変化

真菌として孢子産生能を有す *A. niger* を用いて抗菌剤 Bronopol の発育影響を検討した。抗菌剤処理培地での継代により Bronopol 高濃度での発育性状をみると明らかな表現性状の変化を認めた。すなわち抗菌剤処理により *A. niger* は *Aspergillus* の中でも抵抗性を示す代表でありその表現形をみたところ孢子の着色生が抗菌剤無処理の対照に比べて著しく低下していた (図 12)。

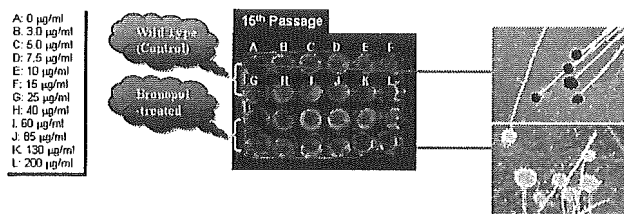


図 1 2 *A. niger* に対する Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) の性状変化

さらに日常的に使用される抗菌剤である Chloroxyleneol の *A. niger* に対する影響を見たところ抗菌剤の高濃度になるにつれ孢子着色生が落ち白色から灰色になった。灰色となっているが孢子産生は確認された (図 13)。

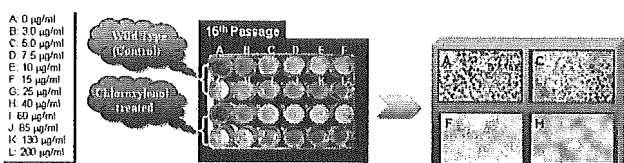


図 1 3 *A. niger* に対する Chloroxyleneol (4-chloro-3,5-dimethylphenol) の性状変化

### D. 考察

近年、繊維製品だけでなく、プラスチック製の台所用品、浴室用品、文房具、壁紙などの内装材、塗料など、幅広い用途の製品に「抗菌」、「抗菌防臭」、「抗菌カビ」などの名称の抗菌製品が出回るようになってきている。1996年、病原性大腸菌 O-157 による集団食中毒が全国的な規模で頻発したことをきっかけに、まないた、ふきん、プラスチック製食品容器などの抗菌への注目が一層高まってきている。

また、消費者保護から製造物責任法 (PL 法) が施行されてから、製品に含まれる化学物質による健康影響などについて、様々な問題が起これらに関して問い合わせや苦情が増え、その内容も複雑になってきている。

健康被害などの事故が発生した場合、メーカーからの製品情報が公表されていないため健康被害情報を含めて、製品に関する情報を消費者が知ることは重要である。そのためには、市販の抗菌製品にどのような化学物質が、どのくらいの濃度で抗菌剤として使用されているか、また抗菌剤の安全性 (毒性) はどの程度かなどを明らかにすることが必要である。

微生物に対する抗菌剤の抗菌活性について、われわれが既に報告したものを含めていくつか知られているが、昨年度報告した安全性の高い第 4 級アンモニウム塩に限って検討してみても、その抗菌活性は菌種によって差がみられ、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムとも 100ppm 以上の濃度で、ある程度微生物に有効と思われるように一概に有効濃度を設定することはできない。

抗菌剤の特徴として一般には、①耐熱性が著しく優れている。②安全性が高い。③抗菌効果が半永久的である。④抗菌スペクトルが広い。⑤微生物が耐性を獲得し難い。⑥難燃性で有毒ガスなどを発生しない長所を挙げることができる。

今回対象とした抗菌剤の Bronopol, Chloroxyleneol は、比較的日常的に使用される抗菌剤であり、昨年使用した 4 級アンモニウム塩同様に汎用される代表である。そこで、微生物として細菌 2 種 *E. coli*, *S. aureus* と真菌 2 種 *A. niger*, *Candida albicans* を用いて抗菌剤の継代暴露することにより抵抗性が生じるか検討した。細菌では 30 代ほど継代したところ著しくはないが抵抗性を示した。同じく真菌でも検討したところ継代後期になり抵抗性を認めた。この現象は昨年度の抗菌剤でも確認されその抵抗性が遺伝的変化の耐性獲得によるものかまた

は細胞形質による馴化かを確認するために抗菌剤無処理に戻し再度抗菌剤処理を行ったところ馴化であることがわかった。つまり抗生物質で確認される遺伝的変化ではなく環境変化によることが分かった。しかし長期暴露されることによる抗菌剤の微生物に対する影響は一步使用法をまちがうと大きな問題を引き起こすことを意味している。その点では日頃から抗菌剤の使用法を偏向することなく正しい使用法を知る必要がある。抗菌剤は年々その種類が多様化し、複雑となってきている。このことが微生物を対象とする衛生維持に果たしてどれほど重要であるか再認識する必要がある。

一方、近年抗菌剤として注目されているものに無機系抗菌剤や光触媒系抗菌剤がある。後者の酸化物光触媒系抗菌・防カビ剤の特徴は長所として①効果が半永久的である。②安全性が高い。③病原性大腸菌 O-157 が死滅した後に出すペロ毒素を分解する。④悪臭の原因物質のアンモニア、硫化水素、アセトアルデヒドなどを分解し、脱臭・消臭する。⑤NO<sub>x</sub>の酸化除去など環境浄化に有効であるといわれている。しかしその有効性はどれほどであるか実証された資料を提供できるものはない。この傾向は各国でもみられ、その背景として抗菌剤の開発がいかに困難であるかを物語っている。たとえ画期的な抗菌剤が開発されても活性の維持が不定であったり、不活化や耐性獲得されたりして本来の抗菌活性が表面に出なくなる可能性もある。その不安を解決するための抗菌剤の微生物抵抗性不変を期待して今回検討を行った。

今回の結果をみて、抗菌剤処理微生物の継代により、強い耐性が得られることは顕著でないことがわかった。細菌の場合抗菌剤で耐性を示す可能性は、抗生物質と比較して著しく低いかほとんどないものとされ、その意味からも耐性とはせず、抵抗あるいは馴化とみなされべきであると思われる。したがって、今回の細菌の場合も抗菌剤に対して、継代により発育の最高濃度が上昇したのは、単なる抵抗あるいは馴化と結論した。

一方抗菌剤として用いた Bronopol, Chloroxylenol の真菌に対する抗菌活性を継代により検討したところ、著しくではないが抵抗性の変化が認められた。すなわち、抗菌剤での真菌の発育の最高濃度は継代とともに上昇し、今回報告書には載せていないが多くの菌種で差が確認され MIC でおよそ 1000 倍になった。抗菌剤の中には真菌で抵抗性を維持するものがあり、筆者らはすでにサイアベンダゾール

(Thiabendazole, TBZ) で報告してきた。今回の試験において抵抗性を獲得するであろう事実は、*A. niger* の性状変化からも理解できる。

今回使用した抗菌剤の抗菌スペクトルは広くそのため細菌や真菌にまで広く用いられている。しかしその一面とは逆にスペクトルが広いということは使用濃度に関して十分な注意を払うことも重要である。

抗菌剤は衛生意識が向上するほどに注目され、今後も新たな機能を有した抗菌剤の開発が進むものと思われる。そのためにもより安全な抗菌剤が国民に活用できるよう心掛けていく必要がある。

抗菌剤の安全性を基本にして抗菌加工製品が市場に出回ることから、本研究では本来の抗菌性を背景にして継続暴露することによる微生物抵抗性変化を確認することにある。今日では生活環境でこうした抗菌加工製品が日常的に利用されることによる健康被害は、連続使用と関係してくる。すなわち、抗菌剤により微生物抵抗性がより活性化されることにより、健康影響を生じるようになるものと推測される。そのため日常的に汎用される抗菌剤について微生物に対する影響を検討することが重要であり、同時に健康被害に関する周辺の情報を得ておく必要がある。

## E. 結論

抗菌加工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。

抗菌加工製品などに使われている抗菌剤 bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol), および chloroxylenol (4-chloro-3,5-dimethylphenol), を用い、生活環境性細菌である *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 および真菌 *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* IFO 6661 を用いて抗菌剤を所定時間培養繰り返し連続暴露法を実施し評価した。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検討し、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。この抵抗性株は、明らかにタンパク発現を認めており、このことが抵抗性と関与するものと推察された。

したがって長期使用する場合の抗菌加工製品の活用に際してさらに多くの抗菌剤で細菌や真菌に対して検討をおこない、抵抗性変化が得られるか検証す

る必要がある。

F. 健康危害情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

李東熙、相原真紀、朴奉柱、朴鍾哲、高鳥浩介：抗菌剤の継続暴露による抵抗性評価、第31回日本防菌防黴学会大会発表（東京）、2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得      なし

2. 実用新案登録   なし

3. その他          なし

---

平成16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

---

発行日 平成17年4月  
発行者 主任研究者 鹿庭正昭 国立医薬品食品衛生研究所療品部室長  
発行所 国立医薬品食品衛生研究所 (所長 長尾 拓)  
電話番号 03-3700-1141

---