

TMBCDPB	不明
BNPD	52-51-7
DMO	51200-87-4
HMBCDPB	不明
ZPT	13463-41-7

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 coli*) 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 を 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)

MLA 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 ウエル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 μmol/0.1 mL, NADP が 4 μmol/0.1 mL, MgCl<sub>2</sub> 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)。

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 µg/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。

### 3. データベース検索

第 2 年度には、抗菌剤を含む 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。

### 2. 構造活性相関

今回、変異原性の評価を行った抗菌剤 (18 化合物) に関して、構造活性相関モデルによる遺伝子突然変異と染色体異常誘発性に関して評価を行った。用いたモデルは、DEREK, MultiCase, および ADMEWorks の 3 種類であり、それぞれ、評価する方式の異なるものである。各化学物質の構造を入力し、評価結果を得た後、図 1 に示すフローに基づき判定した。すなわち、今回の評価化学物質は分子量が 3000 以下なので、直接構造活性相関による評価を行った。評価の結果 2 種類以上のモデルで陽性と評価された場合に総合判定を陽性と、また、逆に 2 種類以上のモデルで陰性と評価された場合に総合判定を陰性とした<sup>4)</sup>。

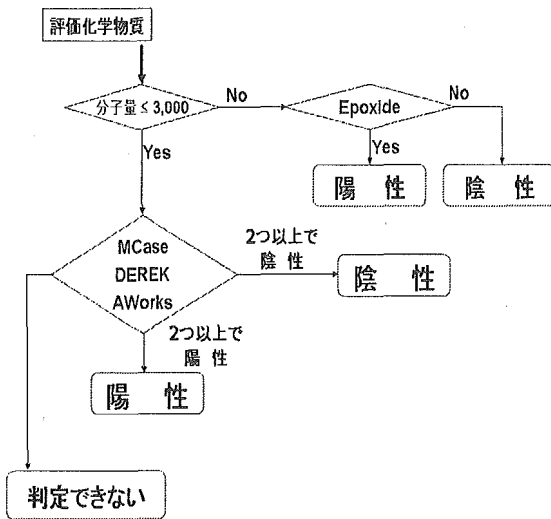


図1 構造活性相関に基づく遺伝子突然変異ならびに染色体異常誘発性の評価  
MCASE: MultiCASE, AWorks: ADMEWorks

(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た試験であること、およびデータベースならびにコンピュータを用いての解析研究であることから、倫理上の問題はない。

### 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),  $D_{20}$  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
IBTA	—	0.13	
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

データベースの解析結果のまとめをがん原性物質と非がん原性物質に分けて Ames 試験とマウスリンフォーマ TK 試験, 染色体異常とマウスリンフォーマ TK 試験に関する相関をそれぞれ表 2~3 に示す。

Ames 試験とマウスリンフォーマ TK 試験結果の相関はがん原物質および全体では約 65%程度であった。また、非がん原物質においては 54%と低値を示した。

表 3 Ames 試験とマウスリンフォーマ TK 試験結果の相関

がん原物質

	MLA+	MLA-	
Ames+	106	11	117
Ames-	65	33	98
	171	44	215
一致率 64.7%			

非がん原物質

	MLA+	MLA-	
Ames+	16	5	21
Ames-	37	34	71
	53	39	92
一致率 54.3%			

全体

	MLA+	MLA-	
Ames+	122	16	138
Ames-	92	67	159
	214	83	297
一致率 63.6%			

表 4 染色体異常試験とマウスリンフォーマ TK 試験結果の相関

がん原物質

	MLA+	MLA-	
CA+	114	12	126
CA-	29	23	52
	143	35	178
一致率 77.0%			

非がん原物質

	MLA+	MLA-	
CA+	31	8	39
CA-	12	24	36
	43	32	75
一致率 73.3%			

全体

	MLA+	MLA-	
CA+	145	20	165
CA-	41	47	88
	186	67	253
一致率 75.9%			

一方、染色体異常とマウスリンフォーマ TK 試験結果の相関は、Ames 試験との相関より良い結果となった。すなわちがん原物質および全体では 75%を超える値を示し、非がん原物質においても 73%であった。

構造活性相関による in silico の評価を、遺伝子突然変異誘発性ならびに染色体異常誘発性について行った。決定樹に従い、3 種類のモデルで検討し、2 つ以上のモデルで陽性になったものを陽性、また、2 つ以上のモデルで陰性になったものを陰性と評価した。結果は、遺伝子突然変異に関しては Ames 試験との総合的な相関が 60%、また、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験との相関は 50%となった。評価可能であった被験物質の数が遺伝子突然変異の評価で 30、染

染色体異常の評価では20と少なく、これらの結果のみで、構造活性相関に対する評価を下すことは不可能であった。

#### 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（Ames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。

本研究で検討した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られることが出来る。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、細胞毒性が強く起こるところでの陽性結果は慎重に検討するべきである。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。

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。また、マウスリンフォーマ TK 試験と染色体異常試験結果の相関は、マウスリンフォーマ TK 試験と Ames 試験結果との相関より良好な値を示した。理論的にも、マウスリンフォーマ TK 試験は染色体異常誘発性を検出することができるので、予期された結果とも考えられる。また、染色体異常試験もマウスリンフォーマ TK 試験も共に検出感度の高い試験系として知られており、その特徴が高い相関性を示したとも考えられる。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。

また、構造活性相関による遺伝子突然変異と染色体異常誘発性の評価結果もかなりの精度で Ames 試験およびほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験結果を予測できることが判明した。この結果は、今後多数の化学物質に適応することが可能であり、実際の試験

をするための、順位付け等に活用されることが期待される。さらに将来的には、予測率が向上すれば、構造活性相関の評価のみである程度のリスク評価も可能となるであろう。今回の結果が思わしくなかった点に関しては、結果でも述べたが、評価可能であった被験物質の数が遺伝子突然変異の評価で 30、染色体異常の評価では 20 と少ない、構造活性相関システムに投入した learning dataset が今回評価の対象とした化合物に類似した構造を有するものが少なかった、等の影響が考えられる。これらの結果のみで、構造活性相関に対する評価を下すことは不可能であり、今後今回の結果を精査し、さらに検討対象物質を増加して検討を継続する必要がある。

## 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は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を殺す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。

化学物質の遺伝毒性に関する *in vitro* 試験結果のデータベースを解析することにより、マウスリンフォーマ TK 試験の有効性、有用性を評価した。Ames 試験とマウスリンフォーマ TK 試験結果の一致率に関しては、全体で 63.6%であり、染色体異常試験とマウスリンフォーマ TK 試験結果の一致率は 75.9%であった。従って、抗菌作用の強い家庭用品の遺伝毒性評価に対しては、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。

また、最近の構造活性相関による変異原性の評価には大きな進歩が認められ、今後、効率の良い変異原性の評価が期待される。

## 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.*, 584, 1-256.

- 4) Hayashi, M., E. Kamata, A. Hirose, M. Takahashi, T. Morita and M. Ema (2005) *In silico* assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals, *Mutat. Res.*, 588, 129-135.

## 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.

- 5) 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
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Suzuki, H., N. Ikeda, K. Kobayashi, Y. Terashima, Y. Shimada, T. Suzuki, T. Hagiwara, S. Hatakeyama, K. Nagaoka, J. Yoshida, Y. Saito, J. Tanaka and M. Hayashi (2005) Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats: A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)—Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), *Mutat. Res.*, 583, 133-145.
- 10) Hayashi, M. (2005) 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, *Environ. Mutagen Res.*, 27, 13-20.
- 11) Sofuni, T., T. Nohmi, T. Ohta and M. Hayashi (2005) Genotoxicity : Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substances !? *Environ. Mutagen Res.*, 27, 61-73 (in Japanese).
- 12) Nakajima, M., S. Shimada, M. Nagai, F. Mizuhashi, C. Sugiyama, S. Masuda, M. Hayashi and N. Kinane (2005) 3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone [MX] shows initiating and promoting activities in a two-stage BALB/c 3T3 cell transformation assay, *Mutagenesis*, 20, 375-379.
- 13) Asada, S., K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi and M. Umeda (2005) Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutat. Res.*, 588, 7-21.
- 14) M. Hayashi, E. Kamata, A. Hirose, M. Takahashi, T. Morita and M. Ema (2005) In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals, *Mutat. Res.*, 588, 129-135.
- 15) Torous, D., N. Asano, C. Tometsko, S. Sugunan, S. Dertinger, T. Morita and M.



- Hayashi (2006) Performance of flow cytometric analysis for the micronucleus assay—a reconstruction model using serial dilutions of malaria infected cells with normal mouse peripheral blood, *Mutagenesis*, 21, 11-13.
- 16) Asano, N., D. Torous, C. Tometsko, S. Dertinger, T. Morita and M. Hayashi (2006) Practical threshold for micronucleated reticulocyte induction observed for low doses of mitomycin C, Ara-C and colchicine, *Mutagenesis*, 21, 15-20.
- 17) Koyama, N., H. Sakamoto, M. Sakuraba, T. Koizumi, Y. Takashima, M. Hayashi, H. Matsufuji, K. Yamagata, M. Shuichi, N. Kinoue and M. Honma (2006) Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells, *Mutat. Res.* 603, 151-158.
2. 学会発表
- 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.
- 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.
- 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.
- 6) M. Hayashi: Newly development of in vivo micronucleus assay. ASIATOX III, Chiang Mai, 2004.
- 7) 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.
- 8) M. Hayashi: Regulatory perspective on data gaps in Japan, HESI Workshop on DNA Adducts: Biological Consequences and Application to Risk Assessment, Washington DC, 2004.
- 9) 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.
- 10) M. Hayashi: Strategy for evaluation and interpretation of genotoxicity for food and related chemicals, The Int Conf Environ & Genet Damage, The 12th Congress of the CEMS (Chongqing, People's republic of China), 中国重慶, 2005.
- 11) 林 真: Ames 試験の結果を in silico でいかに予測出来るか, またその精度は?, MMS 研究会セミナー, 東京, 2005.
- 12) 林 真, 鎌田栄一: 化学物質安全性評価

- の為のカテゴリーアプローチ, 第一回カテゴリーシンポジウム, 東京, 2005.
- 13) 林 真: 毒性病理学に期待する- 遺伝毒性の立場から -, 第 21 回毒性病理学会, 浜松, 2005.
- 14) 広瀬明彦, 鎌田栄一, 高橋美加, 森田 健, 江馬 眞, 林 真: In silico 評価系を用いる化学物質遺伝毒性検出の戦略, 第 34 回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 15) 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充: ヒト細胞における DNA 二本鎖切断修復の細胞周期依存性, 第 34 回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 16) 木本崇文, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 小林恒文, 笠原義典, 林 真, 本間正充: ヒトリンパ芽球細胞 TK6 を用いたフラボノイド系サプリメント化合物の in vivo 遺伝毒, 第 34 回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 17) 真田尚和, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 林 真, 本間正充: P53 に依存したスピンドルポイズンの in vitro 遺伝毒性, 第 34 回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 18) 本間正充, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真: DNA2 本鎖切断によって誘発される相同染色体間組み換え, および遺伝子ターゲティング, 第 34 回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 19) 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充: ヒト細胞における DNA2 本鎖切断の細胞周期依存性, 第 34 回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 20) 鈴木 洋, 小川いずみ, 寺島ゆかり, 島田 康, 齋藤由希子, 田中 仁, 林 真: 幼若ラット肝細胞小核試験: 系統差の検討, 第 34 回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 21) 浅野哲秀, D. Torous, S. Dertinger, C. Tometsko, 森田 健, 林 真: AO およびフローサイトメトリーを用いた低用量域での小核誘発について, 第 34 回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 22) 森田 健, 祖父尼俊雄, 林 真, 田中憲穂, 中嶋 圓, 中西良文, 樋口政純, 石光 進, 小嶋 靖, 佐々木史歩, 森川馨: GHS における生殖細胞変異原性物質の分類
- 23) 広瀬明彦, 鎌田栄一, 高橋美加, 森田 健, 林 真: In silico 評価系を用いる化学物質遺伝毒性検出の戦略
- 24) 松藤 寛, 井上真由美, 千野 誠, 本間正充, 林 真, 山形一雄: ヒトリンパ芽球細胞 TK6 を用いた抗酸化フラボノイド及びその酸化生成物の遺伝毒性
- 25) 林 真, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 高橋美加, 森田 健, 江馬 眞: 化学物質の安全性評価における(Q)SAR の利用, 日本動物実験代替法学会第 19 回大会, 2005

## 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

厚生科学研究費補助金（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  
と実用例への適用、抗菌剤の生殖・発生毒性の整理と評価に関する研究

分担研究者 大阪市立環境科学研究所 清水 充

研究要旨 以下の3つのテーマに沿って研究を行った。

1. 抗菌剤の皮膚感作性の整理と評価に関する研究

抗菌剤の皮膚感作性の整理と評価に関して以下の4つの側面から検討を行った。

1. 多用量モルモットマキシミゼーション法を用いた、各種抗菌剤皮膚感作性の定量的評価法の検討

モルモットマキシミゼーション法（GPMT）を用いて22種の抗菌剤の皮膚感作性を調べたところ18種が陽性反応を示した。最低感作誘導濃度は0.5 ppm から5,000 ppmの濃度範囲に、最低惹起濃度は0.5 ppm から28,300 ppmの濃度範囲であった。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。惹起反応の評価に際しては最低惹起濃度のみならず、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た。

2. 非放射性マウスリンパ節増殖法による感作性の評価およびモルモットマキシミゼーション法による評価との比較

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18種の抗菌剤について、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18種のうち14種がLLNAで陽性反応を示した。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比較したところ、両者には比較的良好な相関がみられ、感作性物質の最低惹起濃度をLLNAのデータより推定できる可能性が示唆された。

3. モルモットマキシミゼーション法を用いた、類似構造化合物間の交差反応性の検討

皮膚感作性のリスク評価において重要な項目のひとつである類似構造化合物間の交差反応性についてモルモットマキシミゼーション法を用いて定量的に評価した。その結果、GPMTにより類似構造を有するいくつかの抗菌剤間で交差反応性が認められた。また、交差反応の定量的評価により、交差反応物質が親感作物質よりも低濃度で同程度の反応を惹起する場合は認められた。さらに、複数の類似構造物質での反応を調べることにより抗原決定構造に関する知見が得られた。

4. 抗菌性化合物の構造－皮膚感作性相関の検討

これまでに蓄積したGPMTおよびLLNAによる皮膚感作性データを元に、コ

ンピュータによる定量的構造活性相関 (QSAR) による化学物質の皮膚感作性の予測について検討した。その結果、感作性の有無を予測する判別分析および感作性強度を定量的に予測する線形重回帰分析ともに限られたサンプル数の範囲では良好な成績が得られた。また、抽出された化合物パラメータのなかで negative partial charge は LLNA での感作性発現の予測に特に重要であった。

## 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

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して、以下の3つの側面から検討を行った。

### 1. 市販抗菌剤から単離した抗菌剤に関するモルモットマキシミゼーション法による皮膚感作性の評価

ある種の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(ADC)の症例が報告された。しかし、この抗菌剤を含む市販抗菌剤についてモルモットを用いた皮膚感作性試験では市販品に皮膚感作性が確認されなかった。そこで、市販抗菌剤から抗菌剤を抽出し、単離した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。その結果、市販抗菌剤から単離した抗菌剤について GPMT を実施した結果、この抗菌剤は皮膚感作性を有することが確認された。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、製品中から抗菌剤の単離が重要であると思われた。

### 2. LC/MS による抗菌剤の検出とスクリーニングへの応用

家庭用品に使用される抗菌剤には皮膚感作性を示す物質が少なくない。市販されている「抗菌グッズ」にどのような抗菌剤が使用されているかは、ほとんど不明である。これら抗菌グッズによるアレルギー性接触皮膚炎が起こった際、原因物質を特定する簡易なスクリーニング法が必要となると思われた。そこで、まず有機ヒ素系抗菌剤をはじめ第4アンモニウム塩2種、イソチアゾリン系化合物2種の計5種の抗菌作用を有する皮膚感作性物質を取り上げ、LC/MSによるスクリーニング法を開発した。さらにピリジン系抗菌剤、トリクロサン、パラベン類などを加え、これら化合物のLC/MSによるスクリーニング法も開発を検討した。その結果、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。

### 3. 試作した抗菌加工製品中の抗菌剤に関するモルモットマキシミゼーション法による皮膚感作性の評価

抗菌加工製品中の皮膚感作性物質の検索法として、ヒトで皮膚感作性を有する数種の抗菌剤を配合した人工皮革を試作し、モルモットマキシミゼーション

試験による抗菌加工品中の皮膚感作性物質の検索について検討した。製品中の皮膚感作性物質の検索法として、ISO による医療機器の皮膚感作性に関する製品評価法で製品からの適当な抽出法による抽出物をパッチテストサンプルに用いている。そこで、試作した抗菌加工人工皮革からのジエチルエーテル等の抽出操作から得られた抽出物について、試作人工皮革に用いた抗菌剤により感作が成立したモルモットを用いて皮膚感作性試験を実施した。その結果、感作誘導したモルモットに抽出物を惹起することより皮膚感作性が確認された。さらに、試作した人工皮革を直接的な閉塞貼付によっても皮膚感作性が確認された。これらの成績はヒトにおける抗菌加工製品による ADC が実験動物で再現が可能であり、抗菌加工製品中における原因物質の同定にも利用できることを示唆するものである。

### Ⅲ. 抗菌剤の生殖・発生毒性の整理と評価に関する研究

抗菌剤の生殖・発生毒性の整理と評価に関して、以下の2つの側面から検討を行った。

#### 1. 抗菌剤の催奇形性に関する評価

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。

#### 2. 抗菌剤に関する内分泌かく乱作用のスクリーニング法による評価

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非常に重要なことである。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作用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 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の可能性の検討を行った。その結果、本研究でヒトエストロゲンレセプター $\alpha$ を使用した ER 試験により陽性と判断された抗菌剤は 12 種であった。YES 試験において、

ラット肝 S9 による代謝活性化を行わない条件で陽性と判断された抗菌剤は 1 種、疑陽性が 1 種であった。また、代謝活性化を行った場合は前述の 2 種はその活性に変化はなかったが、さらに 1 種が陽性と判断された。以上の様に 20 種の抗菌剤のなかには陽性を示すものがあることがわかった。次に、エストロゲン作用に関する *in vitro* における 1 次スクリーニング試験法で陽性であった 11 種の抗菌剤について *in vivo* におけるスクリーニング試験法である幼若ラットを用いた子宮肥大試験を実施し、内分泌かく乱作用の有無やその程度を調べた。その結果、これらの抗菌剤のなかには幼若ラットに経口投与投与すると子宮重量が増加したものがあつた。

## I. 抗菌剤の皮膚感作性の整理と評価に関する研究

### A. 目的

抗菌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; Magnusson and Kligman, 1969) 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。そこで、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抗菌剤の感作性 (抗菌剤関連文献リスト参照) について、その成績を整理して評価した。

これまでにモルモットマキシミゼーション法 (GPMT) を用いて感作性を評価した抗菌剤について、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、2つの試験の成績をリスク評価の側面から定量的に比較検討した。

実験動物を用いた感作試験法の中で、マウスリンパ節増殖試験 (LLNA) が感作誘導のみを評価するのに対し、モルモットマキシミゼーション法 (GPMT) では誘導後の惹起処置による皮膚反応を評価するという違いがある。即ち、GPMT の利点として誘導処置を行った試験物質と類似構造の物質によって惹起される交差反応を評価できる点がある。そこで、GPMT を用いてこれまでに検討した各種抗菌剤感作動物における類似構造物質との交差反応性について、その成績を整理して評価した。

コンピュータによる構造-活性相

関は創薬研究など比較的对象物質の限局された分野では多くの成果をあげてきた。しかしながら、毒性関連分野では発現メカニズムが複雑なことや、また対象となる物質の構造が広範囲であるために構造-活性相関手法の適用が原理的に困難といえ、その適用は未だ開発途上である。今回、その基本原理から構造変化が大きな化合物群でありまた発現メカニズムが特定されない場合でも適用可能な要因解析手法である、多変量解析/パターン認識によるアプローチによって、化学物質の構造-皮膚感作性相関を検討した。

### B. 方法

#### 1. 多用量モルモットマキシミゼーション法を用いた、各種抗菌剤皮膚感作性の定量的評価法の検討

##### 1-1. 被験検物質

試験に用いた 22 種の抗菌剤を表 1-1 に示した。

##### 1-2. 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。

##### 1-3. 多用量モルモットマキシミゼーション法 (図 1-1)

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。

## 2. 非放射性マウスリンパ節増殖法による感作性の評価およびモルモットマキシミゼーション法による評価との比較

### 2-1. 被験検物質

試験に用いた 18 種の抗菌剤を表 1-3 に示した。

### 2-2. 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(2001)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、ブ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

## 3. モルモットマキシミゼーション法を用いた、類似構造化合物間の交差反応性の検討

### 3-1. 交差反応性試験

基本的に親物質による GPMT での惹起反応の 1 週間後に同一動物に対して各種の類似構造物質を惹起暴露し、皮膚反応を評価した。表 1-4 に感作誘導物質および交差反応検討物質の一覧および皮膚反応の結果を示した。

## 4. 抗菌性化合物の構造-皮膚感作性相関の検討

### 4-1. サンプル物質

実験にはこれまでに蓄積した抗菌剤を含む 38 種の化学物質のモルモットマキシミゼーション法(GPMT)およびマウスリンパ節増殖試験(LLNA)によるデータを用いた。ただし、これらの化合物中 6 化合物はコンピュータによるデータ解析に利用できない構造(有機金属塩等)を持つ

ので、最終的には 32 化合物を対象とした。

### 4-2. サンプルデータ

解析には各化合物の GPMT での感作性の有無(2 クラスデータ)および惹起閾値濃度(ppm; 連続変数)、LLNA での感作性の有無(2 クラスデータ)および最低誘導濃度(%; 連続変数)の 4 種類のデータを用いた。解析ソフトには富士通 ADEMEWORKS ModelBuilder を用いた。

### 4-3. 化合物パラメータ

化合物構造式(2 次元および 3 次元)よりシステムが自動的に生成したそれぞれの化合物に固有の約 600 個のパラメータ群を解析に用いた。

### 4-4. 解析手法

要因解析には感作性の有無を予測する判別分析および感作性強度を定量的に予測する線形重回帰分析の 2 つの手法を用いた。

## C. 結果

### 1. 多用量モルモットマキシミゼーション法を用いた、各種抗菌剤皮膚感作性の定量的評価法の検討

#### 1-1. 感作誘導に関する検討

22 種の抗菌剤の感作性を Nakamura らの改良法で検討したところ、18 種が陽性反応を示した。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。今回の陽性物質の成績をこの基準に当てはめると、グレード II (軽度な感作性物質)が 3 種、グレード III (中等度の感作性物質)が 3 種、グレード V (非常に強い感作性物質)が 12 種となった(表 1-2)。

陽性反応を示した抗菌剤のうち、8 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 (表 1-2)。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。各種抗菌剤における第 1 次感作誘導濃度とその群の動物をそれぞれの検体の最高惹起濃度で惹起したときの皮膚反応の平均評価点 (MR) との関係調べたところ、感作誘導濃度に関する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. 最高感作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

各種抗菌剤の最低感作誘導濃度の分布を検討したところ、最も強い TPN の 0.5 ppm から最も弱い DMO の 5,000 ppm まで (Log% で表記すると -4.3 から -0.3) の 10,000 倍の濃度範囲での分散がみられた。

#### 1-2. 惹起反応に関する検討

惹起反応に関する用量反応性について検討した。各種抗菌剤について感作誘導濃度に関する用量反応性の検討の結果をもとに、それぞれの最も強く感作が成立した群を選んで惹起濃度と各惹起濃度での皮膚反応平均値との関係を検討したところ、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 (図 1-2)。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。惹起閾値濃度は、最も強い TPN の 0.5 ppm から最も弱い DMO の 28,300 ppm まで (Log% で表記すると -4.0 から 0.5) の約 50,000 倍の濃度範囲でほぼ均一に分布した (表 1-2)。

#### 2. 非放射性マウスリンパ節増殖法による感作性の評価およびモルメットマキシメーション法による評価との比較

##### 2-1. LLNA を用いた感作誘導に関する検討

GPMT で陽性であった 18 種の抗菌剤の感作性を LLNA で検討したところ、14 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/水分配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。14 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 (表 1-3)。

##### 2-2. GPMT と LLNA での成績の比較

両試験で陽性であった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。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 ( $r=0.73$ 、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。

### 3. モルモットマキシメーション法を用いた、類似構造化合物間の交差反応性の検討

#### 3-1. 抗菌剤間の交差反応性

表 1-4 に示すように、感作性陽性の各種抗菌剤のなかで、TPN と TCMSP、TMBCDB と HMBCDPB、PCMC と PCMX の間に双方向性の交差反応性が、また ZnN 感作動物の CuN への、およびが MBTC 感作動物の TCMTBT への陽性反応が認められた。

この中で、PCMC と PCMX 間の交差反応を定量的に検討したところ、同程度の皮膚反応を発現させるために、PCMC 感作動物では惹起に用いた PCMC の 100 倍濃度の PCMX が必要であったのに対し、PCMX 感作動物では惹起に用いた PCMX の 10 分の 1 の濃度の PCMC で同程度の反応が惹起された。

#### 3.2. 交差反応試験による抗原決定基の推定

MBTC 感作動物を用いて、thiocyano 基を有する 4 種の化合物 (BTC、CTC、CMTC、TCMTB)、isothiocyano 基を有する 1 種の化合物 (MITC) および cyano 基を有する 1 種の化合物 (MDC) との間の交差反応性を検討した。その結果 TCMTBT、BTC および CMTC との間に交差反応性が認められ、MITC、CTC、MDC との間には交差反応性は認められなかった。従って、図 1-4 に示すように MBTC の感作性には TCMTBT、BTC、CMTC との共通構

造である thiocyanomethyl 基が関与していると考えられた。

TCMTBT 感作動物では、2-thiobenzothiazole 構造を含んでいる MTBT および MBT との間には交差反応性が認められたが、benzothiazole とは認められず、従って、TCMTBT の抗原構造には benzothiazole の 2 位にイオウ原子が結合していることが必要と考えられた。

#### 4. 抗菌性化合物の構造—皮膚感作性相関の検討

##### 4-1. 判別分析による 2 クラスデータ解析

###### 4-1-1. GPMT データの解析

今回試みた解析手法の中で最もよい結果が得られたのは LLM:Linear Learning Machine (線形学習機械法) で場合であった。表に示す分類率は計算による感作性の有無の判定結果と実験結果との適合度であり、予測率は他の化合物にこの計算法を適用した場合に正しく感作性の有無が判別される確率の指標である。サンプルデータ数が 29 の時分類率は 100%、予測率は 83%であった。計算に用いた化合物パラメータは 6 種であった。各パラメータの係数は、正の場合は増大すると感作性が陽性に傾き、逆に負では増大すると陰性に傾くことを示している。パラメータ 1、2、4 および 6 が正となり、3 および 5 が負の値を示した。即ち、 $=\text{C}=\text{}$  構造を持つ化合物は陽性になりやすく、エステル構造は分子中の環境により陰性にも陽性にも関与すると考えられる。

解析手法	分類率	予測率	パラメータ数	サンプル数
LLM	100%	83%	6	29

パラメータ	係数
P <sub>1</sub> Dipole Moment Z	0.757
P <sub>2</sub> All-path calc for substructure (=C=)	0.434
P <sub>3</sub> Tertiary sp <sup>2</sup> carbon count	-0.321
P <sub>4</sub> Most positive partial charge on H atom	0.276
P <sub>5</sub> All-path calc for substructure (-ester-)	-0.189
P <sub>6</sub> Molar refractivity environment of the substructure (-ester-)	0.136
Constant	0.066

#### 4-1-2. LLNA データの解析

解析手法には GPMT と同様に LLM を用いた。サンプルデータ数を 21 にまで絞った時、その分類率および予測率ともに 100%が達成された。パラメータは negative partial charge の 1 種のみである。即ち、ある限られた範囲の化合物群では LLNA による感作誘導の有無を化合物中で最も電気陰性度の高い原子のチャージ値により判定することが可能であると考えられる。

解析手法	分類率	予測率	パラメータ数	サンプル数
LLM	100%	100%	1	21

パラメータ	係数
P <sub>1</sub> Most negative partial charge	0.842
Constant	-0.540

### 4-2. 線形重回帰分析による連続変数データ解析

#### 4-2-1. GPMT データの解析

サンプルデータ数を 15 に絞った時、以下の線形重回帰式が得られた。

$$\text{Log } Y = 1.26 P_1 + 1.13 P_2 + 2.02$$

Y = GPMT 惹起閾値濃度 (ppm)  
n = 15, r = 0.91, cross validation r = 0.86  
P<sub>1</sub> = environment molecular connectivity of substructure (-N-)  
P<sub>2</sub> = count of substructure (-OH)

実測値と予測値との間の相関係数 r は 0.91 であり、回帰式の外挿性指標である cross validation の結果も r で 0.86 という高い値を示した。即ち、この回帰式で利用されている 2 種類のパラメータと GPMT の惹起データは強い相関関係を持つことになる。ま

た、双方ともに係数が正であり、従って化合物中に 2 級アミン、および水酸基が多くあるほど GPMT の惹起閾値濃度は大きくなる、即ち惹起力が小さくなると考えられる。

#### 4-2-2. LLNA データの解析

サンプルデータ数を 17 に絞った時、以下の線形重回帰式が得られた。

$$\text{Log } Y = 1.28 P_1 - 0.67 P_2 + 0.17$$

Y = LLNA 最低誘導濃度 (%)  
n = 17, r = 0.87, cross validation r = 0.81  
P<sub>1</sub> = HOMO energy  
P<sub>2</sub> = electronegativity

実測値と予測値との間の相関係数 r は 0.87 であり、回帰式の外挿性指標である cross validation の結果も r で 0.81 という高い値を示した。即ち、この回帰式で利用されている 2 種類のパラメータと LLNA の誘導データは強い相関関係を持つことになる。パラメータ 1 の係数が正、パラメータ 2 の係数は負と互いに逆の関係性を有している。従って、化合物中の HOMO エネルギーが高く、電気陰性度が小さいほど LLNA の最低誘導濃度は大きくなる、即ち感作力は小さくなると考えられる。

### D. 考察

1. 多用量モルモットマキシミゼーション法を用いた、各種抗菌剤皮膚感作性の定量的評価法の検討

#### 1-1. 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陽性を示した 18 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 (この改良法では、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。22 種の抗菌剤の感作性を Nakamura らの改良法で検討したところ、18 種が陽性反応を示した。ところがその中で 8 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。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、リスク評価の観点から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。

## 1-2. 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、縦軸を各惹起濃度での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 1-2 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。

## 2. 非放射性マウスリンパ節増殖法による感作性の評価およびモルモットマキシメーション法による評価との比較

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