

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 18 種中 14 種が LLNA でも陽性反応を示すという一定の相同性を示した。

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的な相関がみられた。一般に感作性物質の最低誘導濃度に関する情報に比較して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 で得られた最低誘導濃度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

ことを意味している。このことは、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ことを意味している。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。

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

皮膚感作性のリスク評価において、類似構造物質との交差反応性の評価は重要な項目のひとつである。今回示されたように異なる抗菌剤間での交差反応が認められた場合には消費者への注意喚起が重要になる。一般に交差反応では同一濃度で惹起された場合、観察される皮膚反応は親物質に比べて交差反応物質では弱くなるが、PCMX 感作動物でみられたように、この逆の現象がみられる場合もあり、交差反応性を定量的に評価することが必要である。さらにモルモットを用いた交差反応試験により抗原構造に関する知見が得られ、このことはよりリスクの少ない新規物質の開発に寄与すると思われる。

4. 抗菌性化合物の構造－皮膚感作

性相関の検討

従来、化学物質の皮膚感作性の有無の評価、また感作性強度の定量的評価にはGPMTやLLNAなどの実験動物を使用する方法が多く、多くの国で公定法として用いられてきた。一方で近年の動物愛護への関心の高まりや、コンピュータ技術の進歩などを背景に多くの安全性試験の分野で、動物実験代替法の開発が進められている。先にEUは2013年までには化粧品に使用される化学物質に関わっての動物試験を全面的に禁止することを決議しており、皮膚感作性試験に関しても *in vitro* や *in silico* での検討手法の開発が急がれている。

低分子量の化学物質が皮膚感作を引き起こすためには、角質を透過して表皮組織に到達しなければならず、さらに内在のタンパク質と結合し免疫源として認識される必要がある。タンパクとの結合は一般には感作性物質あるいはその代謝物が有する求電子基とタンパク質中のアミノ酸側鎖の求核基との反応によるとされている。従って原理的には、化学物質の皮膚透過に関わるパラメータや、3次元構造も組み入れての求電子基に関わるパラメータを用いることにより、化学構造から皮膚感作性を予測することが可能になると考えられる。今回の解析手法では、意図的に特定のパラメータを用いることはせず、各化合物に固有のすべてのパラメータを出発点として、解析ソフトの計算手法により最も適したパラメータを抽出させる手法を採った。最終的に残ったパラメータは2級アミンや水酸基などの部分構造に関するものを除けば電気陰性度（あるいは陽性度）に関わるものが多く、上記の原理と矛盾しないと思われる。今回の結果の中で特筆すべきは、LLNAの2クラスデータ解析におい

て、わずかに1つのパラメータ(negative partial charge)で分類率100%が達成されたことである。このことは、感作性の発現にこのパラメータが強く関与していることを示唆するが、ここで重要なのは分類率向上のためにいくつかの感作性陽性物質が計算から除外されていることである。複雑な過程によって引き起こされる皮膚感作性を予測するためには当然複数のパラメータが必要と考えられるが、これらの除外物質に共通の性質を検討することにより、他のパラメータを抽出できる可能性がある。いずれにせよ今回の構造-皮膚感作性相関に関わる検討は母体サンプル数も少なく、初歩的なものでありさらなる検討が必要である。

E. 結論

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のNakamuraらによる改良法を用いて22種の抗菌剤の皮膚感作性を評価した結果以下の結論を得た。

(1)22種中18種が陽性反応を示した。(2)感作誘導の用量反応性検討のための群設定に際しては、第2次誘導濃度を最高濃度で固定するか、あるいは第1次誘導濃度と同一濃度として変化させるかの区別をする必要がある。(3)惹起反応の用量反応性の評価に際しては、感作誘導の用量反応性検討のために設定した複数の群の中で最も強く感作した群を用いる必要がある。(4)惹起反応において惹起濃度の対数値と皮膚反応平均評価点の間には良好な関係性のある回帰直線が得られる。惹起反応の評価に際しては惹起閾値濃度のみならず、回帰直線の傾きも考慮することにより、より多

くの情報が見られると推される。

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

種々の抗菌剤について、多用量 GPMT と非放射能 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 18 種中 14 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的な相関がみられた ($r = 0.73$)。(4)各抗菌剤のモットマキシメーション法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

種々の抗菌剤について、GPMT を用いて類似構造物質との交差反応性について検討した結果以下の結論を得た。

(1)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。(2)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が認められた。(3)複数の類似構造物質での反応を調べることに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

抗菌剤を含む種々の感作性物質の GPMT および LLNA での成績をもとに構造-皮膚感作性相関を検討した結果以下の結論を得た。

(1)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。(2)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。

本章のまとめとして、多様な構造を有する種々の抗菌剤を用いてその感作性を従来からの標準的試験法である GPMT で評価したところ 80% の検体が陽性であった。GPMT の実施に当たっては感作誘導および惹起反応の両者の用量反応性を検討することにより感作性の強度の比較が可能になると推された。GPMT に比較して簡易な手法である LLNA は、GPMT に比較すると感度が落ちるが、得られた結果は定量的であり、また LLNA で求められた最低感作誘導濃度から GPMT での最低惹起濃度を計算で求めうる可能性が示され、スクリーニング法としては有用と推された。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は GPMT によって定量的な評価が可能であった。実験動物を用いない感作性評価法としてこれまでに蓄積したデータを元に構造活性相関モデルによる感作性予測を行ったところ、感作性の有無および感作力の定量的予測ともに一定の成績が得られ、その有用性が示された。

以上、抗菌剤の感作性を評価するには LLNA でスクリーニングを実施し、陰性の際にはさらに必要に応じて GPMT を実施すべきと推される。また、類似の化合物との交差反応が懸念される際には GPMT での感作動物を用いて交差反応を定量的に評価することが重要である。さらに将来的に

はコンピュータによる計算モデルを用いての感作性の有無のみならず定量的な評価が可能になると期待される。

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) Sato Y, Katsumura Y, Ichikawa H, Kobayashi T, Kozuka T, Morikawa F, Ohta S. A modified technique of guinea pig testing to identify delayed hypersensitivity allergens. *Contact Dermatitis* 1981: 7: 225-237.
- 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.

本章に関する抗菌剤関連文献

- 1) 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.
- 2) 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-(tetramethylene-dicarbonyldiamino) bis (1-decylpyridinium bromide) および N,N'-hexamethylene bis (4-carbamoyl-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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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: 396-406.
- 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) Yamano T, Shimizu S, Noda T. Allergenicity evaluation of Bioban CS-1135 in experimental animals. Contact Dermatitis 2004: 50: 339-343.
 - 9) Yamano T, Shimizu S, Noda T. Quantitative comparison of the results of the multiple-dose guinea pig maximization test and the non-radioactive murine local lymph-node assay for various biocides. Toxicology 2005: 211: 165-175.
 - 10) Yamano T, Shimizu S, Noda T. Allergenicity and cross-reactivity of naphthenic acid and its metallic salts in experimental animals. Contact Dermatitis in press.

E. 健康危害情報
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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: 396-406.
- 3) 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.
- 4) Yamano T, Shimizu S, Noda T. Allergenicity evaluation of Bioban CS-1135 in experimental animals. Contact Dermatitis 2004: 50: 339-343.
- 5) Yamano T, Shimizu S, Noda T. Quantitative comparison of the results of the multiple-dose guinea pig maximization test and the non-radioactive murine local lymph-node assay for various biocides. Toxicology 2005: 211: 165-175.
- 6) Yamano T, Shimizu S, Noda T. Allergenicity and cross-reactivity of naphthenic acid and its metallic salts in experimental animals. Contact Dermatitis 2006: 54: 25-28.

2. 学会発表

- 1) 野田勉、山野哲夫、清水充:家庭用品に使用される抗菌剤 2,3,5,6-tetrachloro-4-(methylsulfonyl)pyridine の皮膚感作性、第40回全国衛生化学技術協議会年会 (2003)
- 2) 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)
- 3) 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)

- 4) 山野哲夫、清水充、野田勉:ナフテン酸およびナフテン酸金属塩の皮膚感作性、第 42 回全国衛生化学技術協議会年会 (2005)

G. 知的財産権の出願・登録の状況
なし

H. 研究協力者
大阪市立環境科学研究所
山野 哲夫

表1-1. 皮膚感作性を検討した抗菌剤のリスト

抗菌剤	略号	商品名	メーカー	含有量	主な用途
メチル-N-(2-ベンズイミダゾリル)カルハメート	MBIC	Preventol BCM	Bayer	98%	塗料、プラスチック、木材、シーリング剤
2-ヒドロキシ-4-イソプロピル-2,4,6-シクロヘキサトリエン-1-オン	HICHO	ヒノキチオールSP	Takasago International Corp.		繊維製品、整髪料
10,10'-オキシビス(フェノキシアルシン)	OBPA	VINYZENE BP-5-2PG	モーインインターナショナル	2%	塩化ビニル樹脂、ウレタン樹脂
ビス(2-ピリジルチオ-1-オキサイド)亜鉛	ZPT	試薬	東京化成	100%	化粧品、皮革、船底塗料、接着剤、石膏ボード、用水、紙、木材、プラスチック
1-ブromo-3-エトキシカルボニロキシ-1,2-ジ- α -プロペン	BECDIP	サンプラス	三共	99%	木材防腐・防蝕
2-ブromo-2-ニトロプロパン-1,3-ジオール	BNPD	プロノール	Myacide Pharma BP	100%	用廃水、冷却水、繊維、皮革、紙、バルブ、化粧品
N-n-ブチル-1,2-ベンゾイソチアゾリン-3-オン	BBIT	Vanquish 100	アビシア	100%	プラスチック、塗料、金属加工油
1,2-ベンゾイソチアゾリン-3-オン	BIT	Proxel PL	セネガ		水系製品全般の防腐、塗料、金属
ヒバ油	HO	ヒバオイル	環境科学開発		化粧品、洗剤、壁紙、繊維製品
4-クロロ-3,5-ジメチルフェノール	PCMX	試薬	東京化成	98%	医薬、化粧品、医環境、環境
2,4,5,6-テトラクロロインフタロニトリル	TPN	Nopocide N-96	サンノボコ		プラスチック、農業用殺菌剤
2,3,5,6-テトラクロロ-4-(メチルスルホオニル)ピリジン	TCMSP	デンジルス100	ゼネカ	98%	プラスチック、塗料、紙
2-(チオシアノ)メチルチオ)ペンゾチアゾール	TCMTBT	TCMTB60	バックマンラボラトリーズ	60%	塗料、スライムコントロール、農業用殺菌剤
4,4'-ジメチル-1,3-オキサゾリン	DMO	バイオバンGS-1135	ナガセ化成工業	78%	金属加工油、塗料、エマルジョン、化粧品
4-クロロ-3-メチルフェノール	PCMC	試薬	東京化成	99%	塗料、接着剤、繊維、皮革、切削油、ワックス
2-クロロアセタミド	CAA	試薬	東京化成	97%	化粧品、医薬品、接着剤、皮革
3-ヨード-2-ブロピニルブチルカルハメート	IPBC	オマサイトIPBC100	日本オーリン	100%	木材、プラスチック、用廃水、医用光学機器、食品工業、医環境、環境
p-クロロフェニル-3-プロパジルフオルミル	CPIP	IF-1000S	ナガセ化成工業	98%	繊維、木材、皮革、塗料
4,4'-(チ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)	TMBODPB	ダイヤモンド136	イヌイ株式会社	98%	塗料
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)	HMBODPB	ダイヤモンド38	イヌイ株式会社	98%	塗料
メチレンビスチオシアナート	MBTC	試薬	東京化成	99%	水性塗料
ナフチン酸亜鉛	ZnN	試薬	東京化成		木材防腐

表1-2. 各種抗菌剤のGPMT試験成績

抗菌剤	感受性	感受率 %	グレード	2次のみ感	最低感受誘導濃度 ppm	惹起閾値濃度 ppm	b値	相対的惹起力値
MBIC	無	0	I					
HICHO	無	0	I					
OBPA	無	0	I					
ZPT	無	0	I					
BECJIP	有	10	II		50	68	2,231	1.5
BNPD	有	10	II		5,000	3,981	39,811	0.1
BBIT	有	20	II		5,000	327	948	2.4
BIT	有	50	III		50	48	13,242	1.1
HO	有	50	III		5,000	501	23,263	0.5
ZnN	有	56	III		1,000	5,000		
PCMXX	有	90	V	有	5	1,375	6,252	0.6
MBTC	有	100	V	有	5	49	79	12.8
TPN	有	100	V	有	0.5	0.5	2	16.1
TCMSP	有	100	V	有	50	17	34	13.3
TCMTBT	有	100	V	有	10	1	2	21.9
DMO	有	100	V	有	5,000	28,300	60,821	
PCMC	有	100	V	有	5	440	1,074	2.4
CAA	有	100	V	有	500	763	4,146	0.8
IPBC	有	100	V	有	5	88	145	9.8
CPJP	有	100	V	有	5	15	27	15.9
TMBCDPB	有	100	V		100	249	19,188	0.7
HMBCDPB	有	100	V		10	316	1,499	1.7

感受率(%):各抗菌剤への最高感受群を適用可能な最高濃度で惹起した時に、陽性反応を示した動物の割合。

グレード:GPMT原法(Magnusson and Kligman, 1969)による感受性強度のグレード。

2次のみ感受:第1感受誘導を溶解処置とし、第2次誘導で抗菌剤を適用した場合の感受の成立の最低感受誘導濃度:1群中少なくとも1匹の動物で感受が成立した最低の第1次誘導濃度。

惹起閾値濃度:最高感受群における惹起濃度(対数)と皮膚反応平均評価点との間の回帰直線より得られた濃度。

b値:Nakamura(1994)による感受性の指標。最高感受群で皮膚反応平均評価点を示す惹起濃度相対的惹起力値:Yamano(2001)による感受性の指標。惹起濃度と皮膚反応平均評価点との間の回帰直線下面積より求める。

表1-3. 各種抗菌剤のGPMT・LLNA試験成績

抗菌剤	GPMT 感作性	LLNA 感作性	LLNA 最低感作 誘導濃度(%)
BECDIP	有	無	-
BBIT	有	無	-
BIT	有	無	-
CAA	有	無	-
TPN	有	有	0.01
MBTC	有	有	0.03
TCMSP	有	有	0.1
IPBC	有	有	0.1
TCMTBT	有	有	0.3
CPIP	有	有	0.3
BNPD	有	有	1
ZnN	有	有	3
TMBCDPB	有	有	3
HMBCDPB	有	有	3
DMO	有	有	10
PCMC	有	有	10
PCMX	有	有	25
HO	有	有	30

表1-4. 各種抗菌剤の交差反応性試験成績

誘導物質	交差反応性検討物質	皮膚反応
TPN	TCMSP	陽性
TCMSP	TPN	陽性
TMBCDPB	HMBCDPB	陽性
HMBCDPB	TMBCDPB	陽性
PCMC	PCMX	陽性
PCMX	PCMC	陽性
ZnN	CuN	陽性
MBTC	TCMTBT	陽性
	BTC	陽性
	CMTC	陽性
	MITC	陰性
	CTC	陰性
	MDC	陰性
TCMTBT	MTBT	陽性
	MBT	陽性
	BT	陰性
	MT	陰性

太字は抗菌剤を示す

CuN copper naphthenate
 BTC benzyl thiocyanate
 CMTC chloromethyl thiocyanate
 MITC methyl isothiocyanate
 CTC calcium thiocyanate
 MDC methylene dicyanide
 MTBT 2-(methylthio)benzothiazole
 MBT 2-mercaptobenzothiazole
 BT benzothiazole
 MT 2-mercaptobenzothiazole
 CHMA 2-chloro-N-(hydroxymethyl)acetamide
 TAA trichloroacetamide

表1-5. GPMTデータを用いた構造-皮膚感作性相関検討成績

略号	用途	判別分析		線形重回帰分析	
		実験値	予測値	実験値 ^{a)}	予測値 ^{a)}
DBS	可塑剤	Nega	Nega		
DEGBEA	溶剤	Nega	Nega		
TMPDIB	可塑剤	Nega	Nega		
MBIC	抗菌剤	Nega	Nega		
OCDPE	殺虫剤共力剤	Nega	Nega		
TMPMIB	溶剤	Nega	Nega		
Tinuvin326	UV吸収剤	Nega	Nega		
HICHO	抗菌剤	Nega	Nega		
MBI	ゴム老化防止剤	Nega	Nega		
DAHQ	ゴム老化防止剤	Nega	Nega		
BNPD	抗菌剤	Posi	Posi	3.600	4.039
ODPA	老化防止剤	Posi	Posi	3.270	2.796
HMBDCPB	抗菌剤	Posi	Posi	2.500	2.659
IPBC	抗菌剤	Posi	Posi	1.944	2.595
TinuvinP	UV吸収剤	Posi	Posi	1.681	2.253
PCMC	抗菌剤	Posi	Posi	2.643	2.253
PTBPS	UV吸収剤	Posi	Posi	2.427	2.253
PCMX	抗菌剤	Posi	Posi	3.138	2.253
TCMSP	抗菌剤	Posi	Posi	1.230	0.466
CTP	スコーチ防止剤	Posi	Posi	0.000	0.466
TPN	抗菌剤	Posi	Posi	-0.222	0.466
TCMTBT	抗菌剤	Posi	Posi	0.000	0.466
CPIP	抗菌剤	Posi	Posi	1.176	0.466
CAA	抗菌剤	Posi	Posi	NU	NU
MHPPD	ゴム老化防止剤	Posi	Posi	NU	NU
MBTC	抗菌剤	Posi	Posi	NU	NU
TBMBP	老化防止剤	Posi	Posi	NU	NU
BIT	抗菌剤	Posi	Posi	NU	NU
MBP	ゴム老化防止剤	Posi	Posi	NU	NU
DMO	抗菌剤	Posi	NU	4.452	4.035
TMBDCPB	抗菌剤	Posi	NU	2.396	2.768

NU: not used

a): 惹起閾値濃度 (ppm) の対数値

略号

DBS	di-n-butyl sebacate
DEGBEA	diethylene glycol mono-n-butyl ether acetate
TMPDIB	2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate
OCDPE	2,3,3,3,2',3',3'-octachlorodipropylether
TMPMIB	2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol monoisobutyrate
Tinuvin326	2-(2'-hydroxy-3'-t-butyl-5'-methylphenyl)-5-chlorobenzotriazole
MBI	2-mercaptobenzimidazole
DAHQ	2,5-di-t-pentylhydroquinone
ODPA	octylated diphenylamine
TinuvinP	2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)benzotriazole
PTBPS	p-t-butylphenylsallylate
CTP	N-(cyclohexylthio)phthalimide
MHPPD	N-(1-methylheptyl)-N'phenyl-p-phenylenediamine
TBMBP	4,4'-thio-bis(3-methyl-6-tert-butylphenol)
MBP	a-methylbenzylphenol

表1-6. LLNAデータを用いた構造-皮膚感作性相関検討成績

略号	用途	判別分析		線形重回帰分析	
		実験値	予測値	実験値 ^{a)}	予測値 ^{a)}
TinuvinP	UV吸収剤	Nega	Nega		
CAA	抗菌剤	Nega	Nega		
DBS	可塑剤	Nega	Nega		
DEGBEA	溶剤	Nega	Nega		
TMPDIB	可塑剤	Posi	Posi	2.000	2.201
PTBPS	UV吸収剤	Posi	Posi	1.699	1.447
MHPPD	ゴム老化防止剤	Posi	Posi	0.000	1.164
ODPA	老化防止剤	Posi	Posi	1.699	1.114
PCMX	抗菌剤	Posi	Posi	1.398	0.641
TBMBP	老化防止剤	Posi	Posi	0.477	0.748
HMBGDPB	抗菌剤	Posi	Posi	0.477	0.557
CTP	スロークチ防止剤	Posi	Posi	-0.301	0.340
DMO	抗菌剤	Posi	Posi	1.000	0.286
PCMC	抗菌剤	Posi	Posi	1.000	0.002
TCMSP	抗菌剤	Posi	Posi	-1.000	-0.079
BNPD	抗菌剤	Posi	Posi	0.000	-0.368
CPIP	抗菌剤	Posi	Posi	-0.523	-0.642
TCMTBT	抗菌剤	Posi	Posi	-0.523	-0.739
IPBC	抗菌剤	Posi	Posi	-1.000	-0.871
MBTC	抗菌剤	Posi	Posi	-1.523	-1.055
TMBCDPB	抗菌剤	Posi	Posi	NU	NU
TPN	抗菌剤	Posi	NU	-2.000	-1.866

NU: not used

a): 最低誘導濃度 (%) の対数値

略号: 表1-5参照

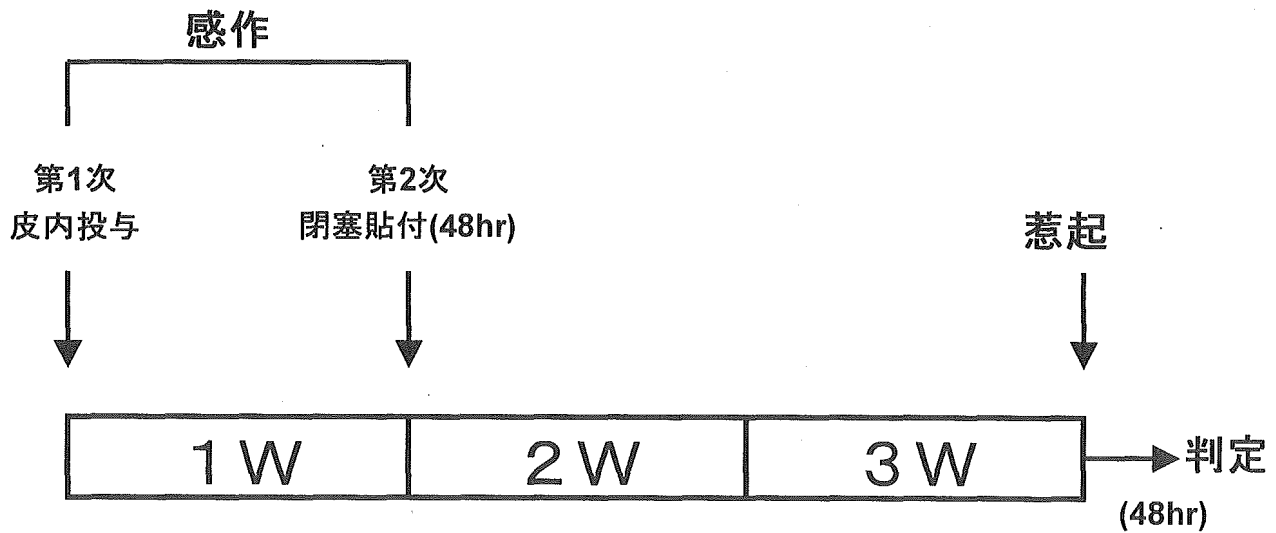
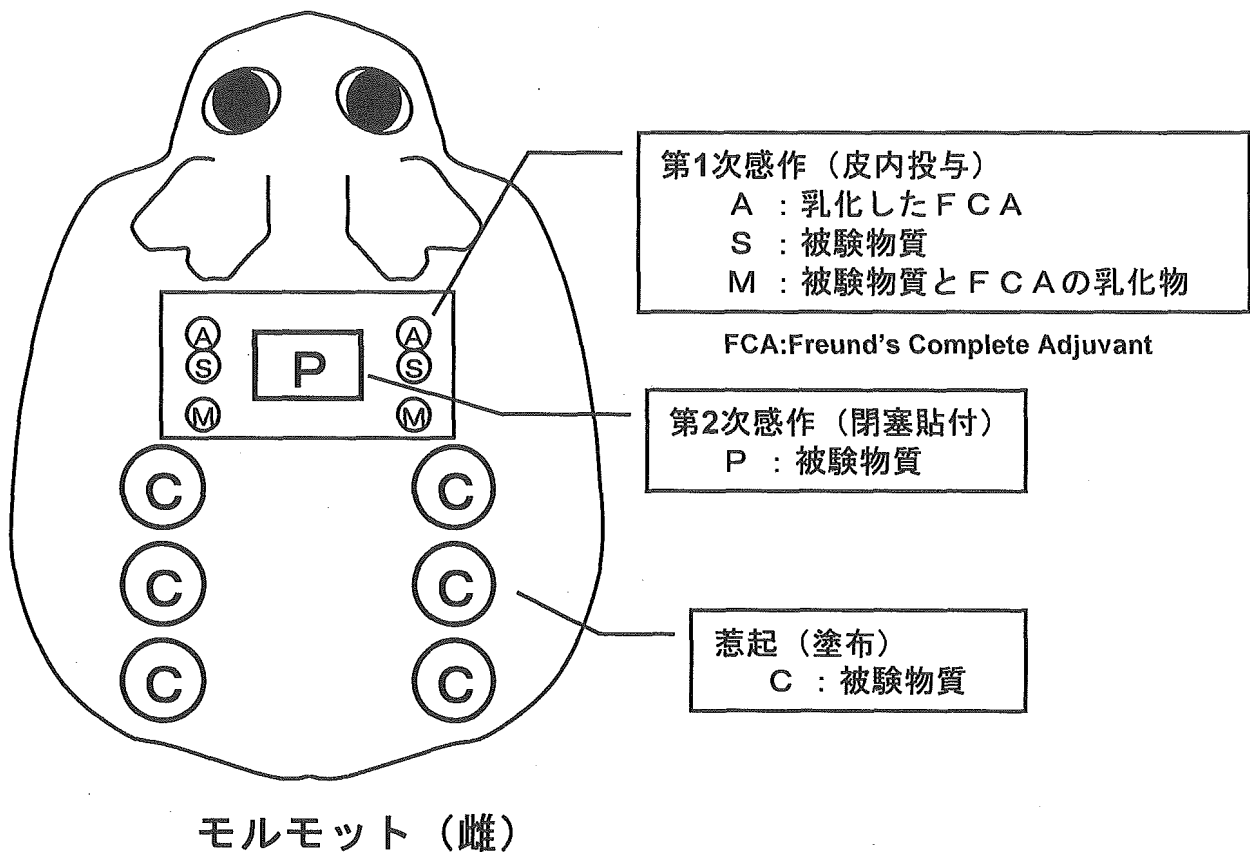


図1-1. モルモットマキシミゼーション法(GPMT)

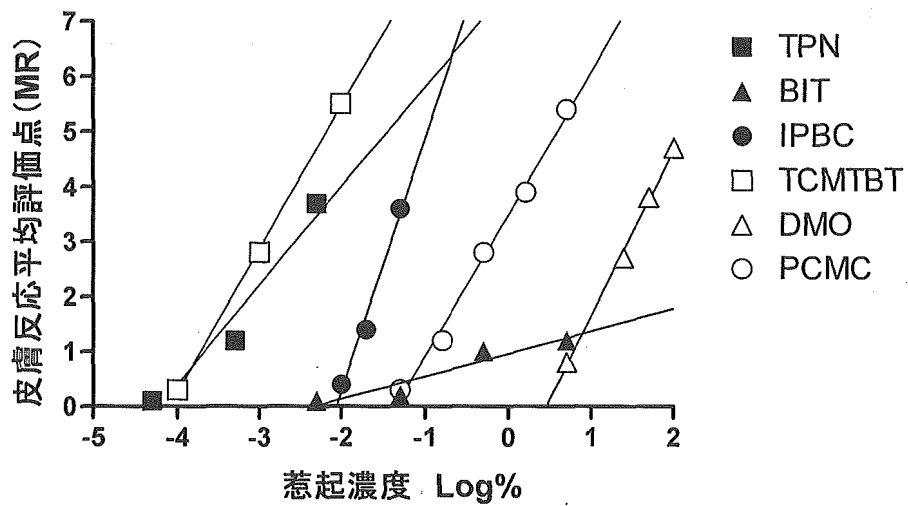


図1-2. 各種抗菌剤における惹起濃度と皮膚反応平均評価点(MR)との関係

各点は被検物質それぞれの最高感作群における各惹起濃度での48時間後の皮膚反応平均評価点(MR)。直線は実測値より得られた回帰直線。

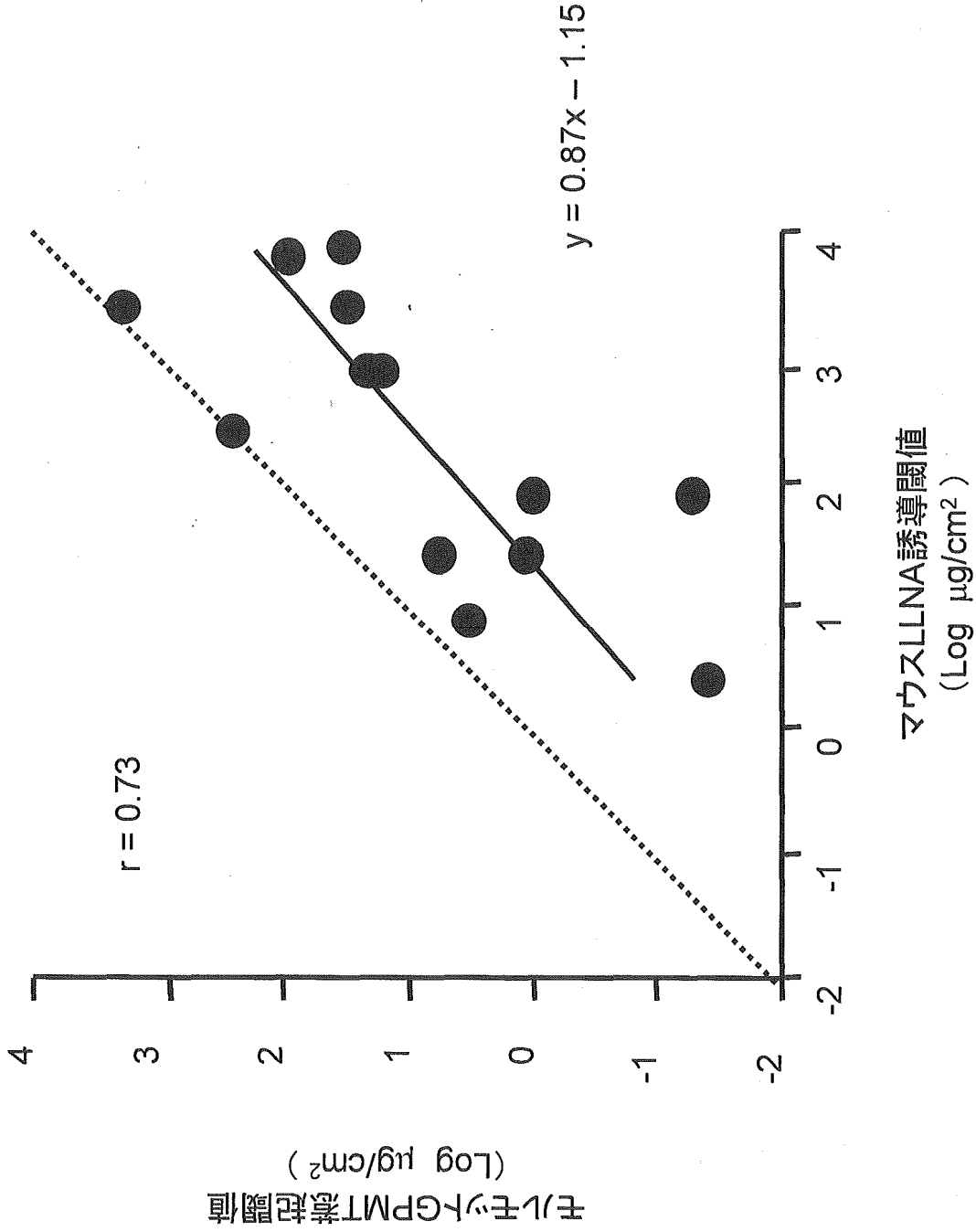
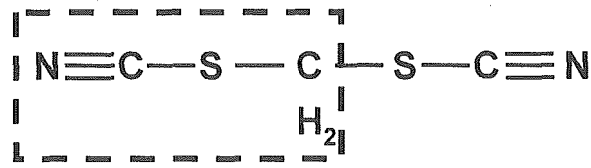
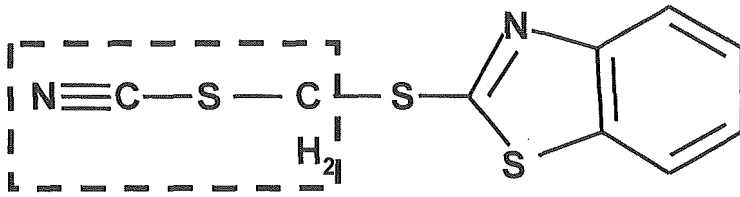


図1-3. 種々の抗菌剤のGPMTにおける惹起閾値濃度とLLNAにおける最低誘導濃度との関係
 実線は回帰直線、点線は $y = x$ で表される対角線を示す。



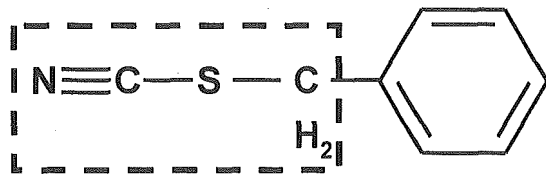
(感作誘導物質: MBTC)



(交差反応検討物質: TCMTB)



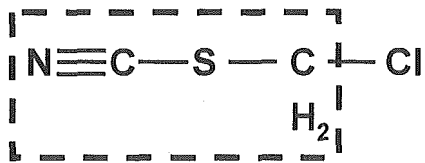
(交差反応検討物質: MITC)



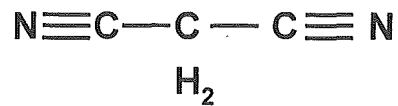
(交差反応検討物質: BTC)



(交差反応検討物質: CTC)



(交差反応検討物質: CMTC)



(交差反応検討物質: MDC)

図1-4. MBTCおよび交差反応性検討物質

点線で囲んだ構造はMBTCの抗原決定基を示す

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

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報告した。ヒトで有機ヒ素系抗菌剤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、著者らが実施した当該の抗菌剤を含む市販製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、市販抗菌製剤から抗菌剤を抽出し、単離した抗菌剤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(Nakamura et al., 1994)を用いて検討した。

有機ヒ素系抗菌剤を含む5種の抗菌剤(有機ヒ素系1種(OBPA)、第四アンモニウム塩2種(4,4'-(テトラメチレン)カルボニルジアミンビス(1-テシピリジニウムプロマイド)、(TMBCPB):N,N'-ヘキサメチレンビス(4-カルボモイル-1-テシピリジニウムプロマイド)、(HMBCDPB))、イソチアゾリン系2種(1,2-ヘンズイソチアゾリン-3-オン、(BIT):N-n-ブチル-1,2-ヘンズイソチアゾリン-3-オン、(BBIT)))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。

前記の研究ではOBPA、TMBCDPB、HMBCDPB、BITおよびBBITについてLC/MSを用いて、簡易スクリーニング法の開発を目指

した。これらの抗菌剤はESI/MSのポジティブイオンモードで検出できる物質である。一方、皮膚感作性を有する抗菌剤のなかにはポジティブイオンモードでは検出が困難な物質もある。そこで、ESI/MSのネガティブイオンモードを用いた抗菌剤の分析法を新たに開発することとした。分析対象の抗菌剤としてTCMSPならびにトリクロサン、p-ヒドロキシ安息香酸エチルを検討した。

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。

B. 方法

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

市販品から有機ヒ素系抗菌剤10,10'-オキシ-ビス(フェノキシアルシン)(OBPA)を五十嵐らの方法(2000)で抽出した。単離したOBPAについて多用量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. LC/MSによる抗菌剤の検出とスクリーニングへの応用

2-1 LC/MSによる有機ヒ素系抗菌剤

等の検出法に関する検討

分析を検討した抗菌剤として OBPA、TMCBDPB、HMBCDPB、BIT および BBIT の 5 種の抗菌剤を用いた。LC/MS はアプライドバイオ社製 API 2000、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。カラムには東ソー Tosoh-VMPAK 用いた。移動相はアセトニトリルと水を用いた。

2-2. LC/MS による有機抗菌剤の検出法に関する検討

2,3,5,6-テトラクロロ-4-(メチルスルフォニル)ピリジン (TCMSP) は市販製品を使用した。トリクロサン、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチルはいずれも和光純薬(特級)より購入したものをそのまま使用した。メタノールは HPLC グレードを用いた。

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-ODS 80Ts (2.0 x 150mm) を用いた。移動相はメタノールと水(酢酸アンモニウム 2mM、酢酸 2mL/L) を用い、メタノールの比率が 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。

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

3-1. 試料

抗菌加工した試作品を用いた(表 2-3)。各試作品の 2.5g にジエチルエーテル 30ml を添加して振とう放置し、ジエチルエーテル抽出物を得た。得られた抽出物をアセトンに溶解して皮膚に適用した。惹起はジエチルエーテル抽出物を 0.1%、1%および 10%に溶解したアセトン溶液を用いた。

3-2. 多用量モルモットマキシミゼーション法(GPMT)

GPMT は Nakamura らによる改良法(Nakamura et al., 1994)に従って実施した。なお、先行して行った予備試験の結果から、OBPA、BIT および TCMSP に最も感度が高い感作動物を作成して実験に用いた。惹起はジエチルエーテル抽出物を 0.1%、1%および 10%に溶解したアセトンを用いた。惹起 48 時間後に皮膚反応を観察した、さらに、OBPA、BIT および TCMSP で加工した試作品そのものをモルモットの皮膚に 24 時間閉塞貼付し、貼付除去 24 時間後にも皮膚反応を観察した。

C. 結果

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

単離した OBPA の皮膚感作性試験の結果は表 2-1 に示した。OBPA は GPMT で皮膚感作性を示し、最低感作誘導濃度は 500 ppm、最低惹起濃度は 30 ppm であった。一方、最高非刺激性濃度である市販品 VZPG で惹起しても陽性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た溶液を用いて惹起を行ったが、陽性反応はみられなかった。

2. LC/MS による抗菌剤の検出とスクリーニングへの応用

2-1. LC/MS による有機ヒ素系抗菌剤等の検出法に関する検討

OBPA を含む 5 種の抗菌剤のマス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すると、OBPA は砒素と酸素の結合が切れたフラグメントイオン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。さらに5種の抗菌剤について分離分析を検討した結果、極性有機溶媒系GPCカラムであるVMPAK25を用いたところ、比較的良好な形状のピークがいずれの抗菌剤についても得られた(図2-1)。5種の抗菌剤のLC/MSによる測定では、いずれの抗菌剤の各検量線も10-1000ng/mLの濃度範囲で $r^2 > 0.999$ の良好な直線性を示した。

この測定条件を用いて、椅子合成人工皮革を用いた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いか検討を行った。種々の椅子から人工皮革を採取し、5種の抗菌剤に関するLC/MSによる分析を行った。抽出方法は細かく切った人工皮革にメタノールを抽出溶媒として加え、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、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。

2-2. LC/MSによる有機抗菌剤の検出法に関する検討

TCMSPを含む5種の抗菌剤のマススペクトルをエレクトロスプレーイオン化法のネガティブイオンモードを用いて測定を行った。各抗菌剤のメタノール溶液(100 ppm)を用い、フローインジェクション法によりマススペクトルを得た。TCMSPは硫黄と酸素の結合が切れたフラグメントイオン(m/z 232)がベースピークとして観測された。トリクロサン、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチルではそれぞれ脱プロトンしたイオン $[M-H]^-$ が得られた。各抗菌剤のマススペクトルを図2-2~図2-4に示した。さらに、3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。得られたマスキロ

マトグラムを図2-5に示した。そこでLC/MSを用い、3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TCMSP: m/z 232(確認用イオンとして m/z 230、トリクロサン: m/z 287(289)、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル: m/z 165(137))。いずれの抗菌剤についても10-100ng/mLの濃度範囲で $r^2 > 0.99$ の良好な直線性を示した。

この測定条件を用いて、試作した人工皮革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いか検討を行った。試料としては二種の人工皮革にOBPA、BIT、TCMSPをそれぞれ0.05、0.70、0.10 %wtで含浸させたものを用いた(表2-3)。これらの試料についてOBPAならびにイソチアゾリン系抗菌剤BITおよびTCMSPの一斉分析を行った。試料となる人工皮革を鋏で裁断し、メタノール抽出した溶液をLC/MSに注入することにより定量するものである。今回は裁断した試料にメタノールを5mL添加後、超音波を20分照射行うことにより抽出を行った。

人工皮革に抗菌加工した試作品(表2-3)に関して、OBPA、BIT、TCMSPを含浸させた試作品の試料から得られた抽出液をLC/MSに注入したところ、OBPA、TCMSPのピークが得られた(図2-6、図2-7)。BITはピークが全く観測されなかった。OBPAの場合は、二種の人工皮革のうち、一種からTCMSPのピークが得られたが、確認用の m/z 168のイオンについては妨害物質によると思われる大きな妨害ピークのため、確認用ピークが観測されなかった。TCMSPについては、二種の人工皮革についてTCMSPのピークが得られた。また、いずれも注入した溶液は10倍希釈した溶液であるにもかかわらず、確認用のイオンクロマトグラム

からも TCMSP のピークが検出された。回収率はばらつきが多く、OBPA、TCMDP のいずれも 10%以下であった(表 2-4、表 2-5)。TCMSP についてはマトリックスによる妨害ピークがほとんど見られないことなどから、本法は実試料においてスクリーニングに適用可能であると考えられるが、OBPA、BIT に関しては検出されなかった場合もあり、抽出条件の改良が必要である。

D. 考察

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

著者らが実施した OBPA を含有する市販抗菌剤を用いた研究では、この抗菌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。

2. LC/MS による抗菌剤の検出とスクリーニングへの応用

2-1. LC/MS による有機ヒ素系抗菌剤等の検出法に関する検討

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、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。

2-2. LC/MS による有機抗菌剤の検出法に関する検討

本研究では TCMSP、トリクロサン、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチルはいずれも ESI/MS のネガティブイオンモードで検出が可能であったので、ESI/MS のネガティブイオンモードを用いた抗菌剤の分析法を新たに開発した。さらに、ESI/MS のポジティブイオンモードで検出できる有機ヒ素系抗菌剤である OBPA ならびにイソチアゾリン系抗菌剤 BIT などの LC/MS による分析法も既に開発した。そこで、これらの分析法による OBPA、BIT、TCMSP を含浸させた試作人工皮革から得られた抽出液を LC/MS に注入したところ、TCMSP のピークが得られた。従って、本分析法は試作した人工皮革においてスクリーニングに適用可能であると考えられるが、OBPA、BIT に関しては検出されなかった場合もあり、抽出条件の改良が必要である。

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

本研究により抗菌加工された家庭用品によりヒトでのアレルギー性接触皮膚炎が疑われた場合に、前臨床段階として原因物質とされる抗菌剤の皮膚感作性リスクを評価する方法としてとして GPMT は有用であることを示した。