

本試験では抗菌加工した試作品の抽出溶媒としてジエチルエーテルを用いた。BIT および TCMSP で加工した試作品に関して、ジエチルエーテル抽出により得られた試料で皮膚感作性が認められたが、OBPA では陽性反応が見られなかった。このように抽出に用いる溶媒により皮膚感作性を検出できないこともあると考えられる。抽出操作により試験液中の感作性物質の濃度が最低惹起濃度以下あるいはほとんど抽出できないために動物試験で感作が成立せず、陰性と判断される場合もあることを示唆している。故に、皮膚感作性を引き起こす微量な感作性物質を動物実験で検出するには、抽出効率が高く濃縮可能な有機溶媒を採用する必要があると思われる。

今回、ジエチルエーテル抽出物に加えて、抗菌加工した人工皮革を閉塞貼付することにより、皮膚感作性が再現することが可能であることが示唆された。本試験では BIT や TCMSP に対して予め最も感受性が高い試験動物を選択して、試作品に関する感作性の評価に用いた。このように試験動物の選択にあたっては感受性の高い動物を用いることが重要である。著者らが実施しているモルモットマキシミゼーション法は感作誘導に多用量を用いる感作性試験である。この試験法では最も感受性のよい動物を選択できる。事前に事故品に関する製品情報から、製品中に含まれる感作性物質を収集しこれらの感作性物質に感作が成立した実験動物を用いることにより事故品による皮膚感作性が再現することが可能であることが示唆された。

E. 結論

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

市販抗菌剤から単離した有機ヒ素系抗菌剤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、単離した抗菌剤に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、抗菌剤の単離が重要であると思われる。

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。従って本研究により 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 等に関して 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開発した。そこで OBPA、BIT および TCMSP で抗菌加工した試作品に関して、LC/MS による一斉スクリーニングを行った結果、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。しかし、さらなる抽出条件の改良が必要であることがわかった。

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

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3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。

(1) 抗菌した加工人工皮革をジェルエーテルで抽出操作して得られた抽出物について、各抗菌剤に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、感作モルモットに抽出物を惹起することより皮膚感作性が認められた。(2) さらに、試作した人工皮革の閉塞貼付によっても皮膚感作性が認められた。

以上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した。

本章のまとめとして、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。本研究から図2-8に示したようなフローチャートにより人工皮革中に存在するアレルギー性を有する抗菌剤のスクリーニングが可能となると考えられる。

参考文献

- 1) 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-10H-phenoxarsine の分析、薬学雑誌、2000: 120: 795-799
 - 2) 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)
 - 3) Nakamura, A., Momma, J., Sekiguguchi, H., Noda, T., Yamano, T., Kaniwa, M.-A., Kojima, S., Tsuda, M. and Kurokawa, Y.: A new protocol and criteria for quantitative determination of sensitization potencies of chemicals by guinea pig maximization test. Contact Dermatitis, 31, 72-85 (1994)
- E. 健康危険情報
なし
- F. 研究発表
1. 論文発表
1) 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：市販抗菌製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
- H. 研究協力者
大阪市立環境科学研究所
森脇 洋

表2-1. 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%)				
	感作誘導濃度				
	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

	感作誘導濃度(VZPG)				
VZPG	0%	#####	0.005%	0.5%	5%
0.050 %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.100 %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.500 %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

惹起濃度	皮膚反応平均評価点(陽性反応率%)				
	感作誘導濃度				
VZPG	0%	#####	0.005%	0.5%	5%
0.050 %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.100 %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.500 %	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 2-2 主なLC/MSの操作パラメーター

Parameter	Setting
イオン化法	エレクトロスプレー法(ネガティブイオンモード)
イオンスプレー電圧	-4.5 kV
カーテンガス	30 ^a
ベーパーライザー温度	550°C
デクラスター電圧	-30, -40, -30V (それぞれTCMSP、トリクロサン p-ヒドロキシ安息香酸エチル)

a 機器の設定値

表2-3. 抗菌加工した試作人工皮革

レザーNo.	種類	抗菌剤名	抗菌剤量 (wt%)
1-1	抗菌加工PVCレザー	OBPA	0.05
1-2	抗菌加工PVCレザー	BIT	0.70
1-3	抗菌加工PVCレザー	TCMSP	0.10
2-1	抗菌加工ポリウレタン合皮レザー	OBPA	0.05
2-2	抗菌加工ポリウレタン合皮レザー	BIT	0.70
2-3	抗菌加工ポリウレタン合皮レザー	TCMSP	0.10

表 2-4. 本法により求めた人工皮革中OBPAの回収率

試料	試料重量 (g)	含浸した		測定した		回収率(%)
		OBPA量 (μg)	OBPA量 (μg)	OBPA量 (μg)	OBPA量 (μg)	
1-1-1	0.069	40	2	2	5.0	
1-1-2	0.075	38	2.2	2.2	5.8	
1-1-3	0.071	36	2.4	2.4	6.7	
2-1-1	0.10	50	a	a	-	
2-1-2	0.095	48	a	a	-	
2-1-3	0.10	50	a	a	-	

a ピークが無検出。

表 2-5. 本法により求めた人工皮革中TCMSPの回収率

試料	試料重量 (g)	測定した		回収率 (%)
		含浸した TCMSP量 (μg)	TCMSP量 (μg)	
1-3-1	0.071	71	3.0	4.2
1-3-2	0.083	83	3.5	4.2
1-3-3	0.075	75	6.6	8.8
2-3-1	0.10	100	7.5	7.4
2-3-2	0.094	94	6.9	7.3
2-3-3	0.10	100	5.3	5.2

表2-6. OPBAで加工した試作品に関する皮膚感作性試験の結果

処置	匹数	検体	惹起濃度	SR*	MR*
OBPA感作群	4	1-1	0.1%	0/4	0.0
			1%	0/4	0.0
			10%	3/4	1.0
			貼付	0/4	0.0
対照群	2	1-1	0.1%	0/2	0.0
			1%	0/2	0.0
			10%	2/2	1.0
			貼付	0/4	0.0
OBPA感作群	4	2-1	0.1%	0/4	0.0
			1%	0/4	0.0
			10%	4/4	2.0
			貼付	0/4	0.0
対照群	2	2-1	0.1%	0/2	0.0
			1%	0/2	0.0
			10%	1/2	0.5
			貼付	0/4	0.0

OBPA感作成立モルモット(4匹)に1-1と2-1のジエチルエーテル抽出物を適用。抽出物適用の1週間後に試作品のレザーを閉塞貼付した。

なお、対照動物(2例)に同様の処置を行った。

SR: 皮膚反応がみられた匹数/試験に用いた匹数

MR: 平均評価点

*: 惹起48時間後の所見

表2-7. BITで加工した試作品に関する皮膚感作性試験の結果

処置	匹数	検体	惹起濃度	SR*	MR*
BIT感作群	4	1-2	0.1%	0/4	0.0
			1%	2/4	0.5
			10%	4/4	3.5
			貼付	3/4	1.0
対照群	2	1-2	0.1%	0/2	0.0
			1%	0/2	0.0
			10%	1/2	0.5
			貼付	0/2	0.0
BIT感作群	4	2-2	0.1%	0/4	0.0
			1%	1/4	0.5
			10%	4/4	3.5
			貼付	2/4	0.5
対照群	2	2-2	0.1%	0/2	0.0
			1%	0/2	0.0
			10%	1/2	0.5
			貼付	0/2	0.0

BIT感作成立モルモット(4匹)に1-2と2-2のジエチルエーテル抽出物を適用。

抽出物適用の1週間後に試作品のレザーを閉塞貼付した。

なお、対照動物(2例)に同様の処置を行った。

SR: 皮膚反応がみられた匹数/試験に用いた匹数

MR: 平均評価点

*: 惹起48時間後の所見

表2-8. TCMSPで加工した試作品に関する皮膚感作性試験の結果

処置	匹数	検体	惹起濃度	SR*	MR*
TCMSP感作群	4	1-3	0.1%	3/4	0.75
			1%	4/4	1.5
			10%	4/4	4.75
			貼付	4/4	1.75
対照群	2	1-3	0.1%	0/2	0.0
			1%	0/2	0.0
			10%	1/2	0.5
			貼付	0/2	0.0
TCMSP感作群	4	2-3	0.1%	0/4	0.0
			1%	4/4	1.25
			10%	4/4	4.5
			貼付	4/4	2.0
対照群	2	2-3	0.1%	0/2	0.0
			1%	0/2	0.0
			10%	2/2	1.0
			貼付	0/2	0.0

TCMSP感作成立モルモット(4匹)に1-2と2-2のジエチルエーテル抽出物を適用。抽出物適用の1週間後に試作品のレザーを閉塞貼付した。

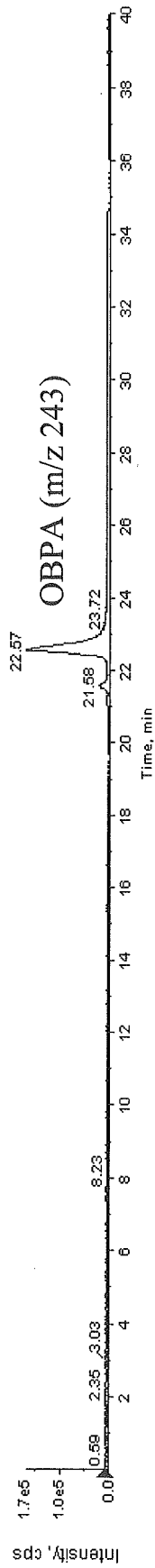
なお、対照動物(2例)に同様の処置を行った。

SR: 皮膚反応がみられた匹数/試験に用いた匹数

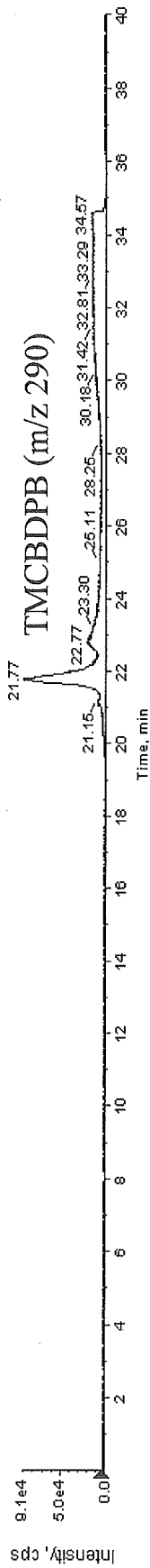
MR: 平均評価点

*: 惹起48時間後の所見

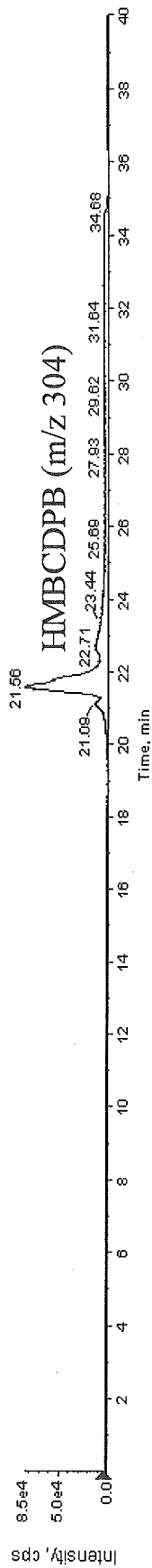
XIC of +Q1 Ml (6 ions): 243.0 amu from Sample 3 (200ppb) of Data2003110602.wiff (Turbo Spray)



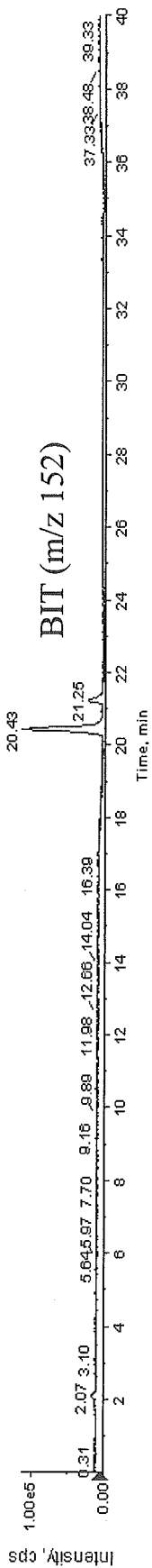
XIC of +Q1 Ml (6 ions): 290.0 amu from Sample 3 (200ppb) of Data2003110602.wiff (Turbo Spray)



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



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



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

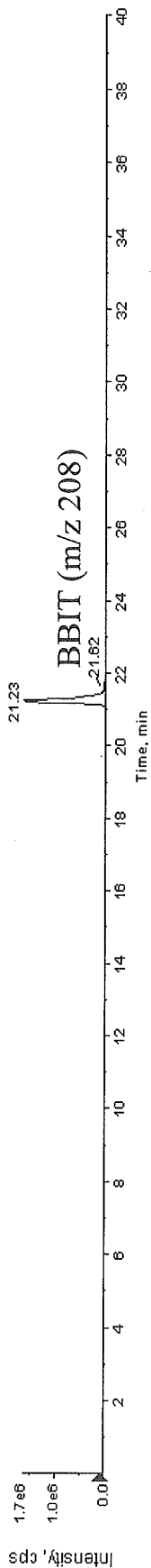


図.2-1 各種抗菌剤のマスキンググラムのマスクログラム(200 ng/ml, 標準溶液, SIMモード)

Max. 7.6e5 cps.

■ -Cl: 0.235 to 0.419 min from Sample 1 (tcmpp) of Data102903.wiff (Heated Nebulizer)

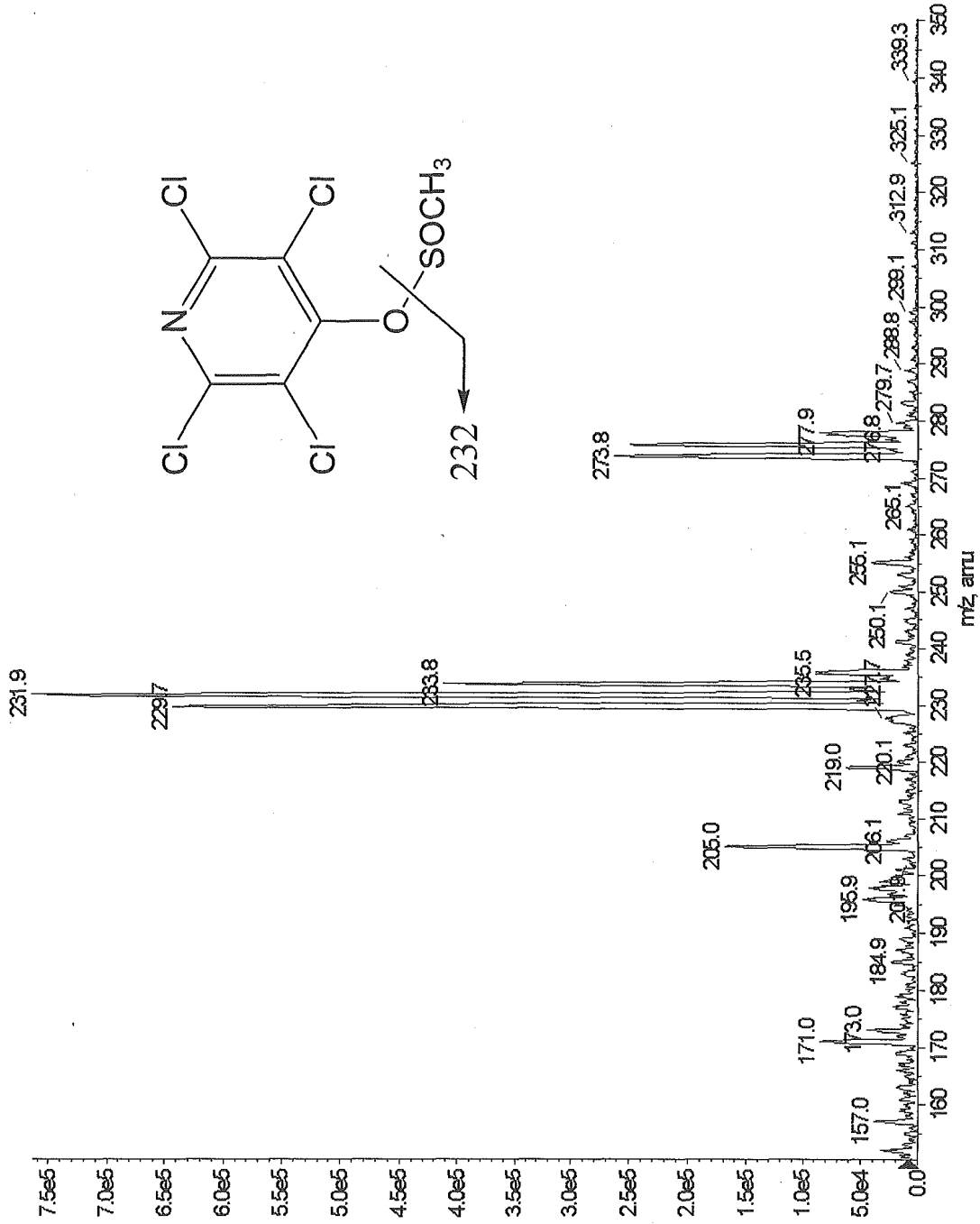


図 2-2. TCMSPのマススペクトル

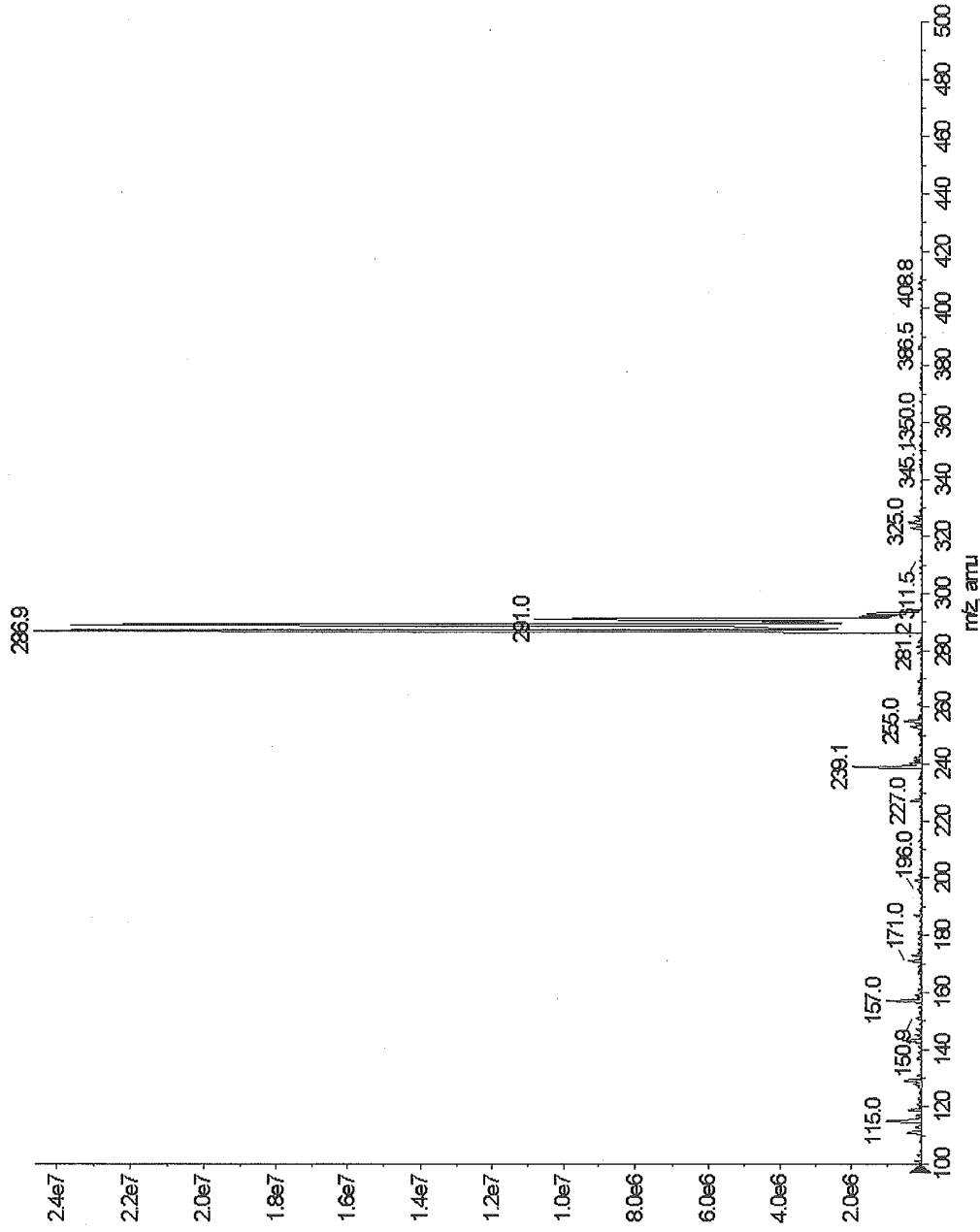


図 2-3. トリクロサンのマススペクトル

■ -01: 10 MCA scans from Sample 1 (TuneSampleID) of MT20060120114919.wiff (Turbo Spray)

Max. 5.7e7 cps.

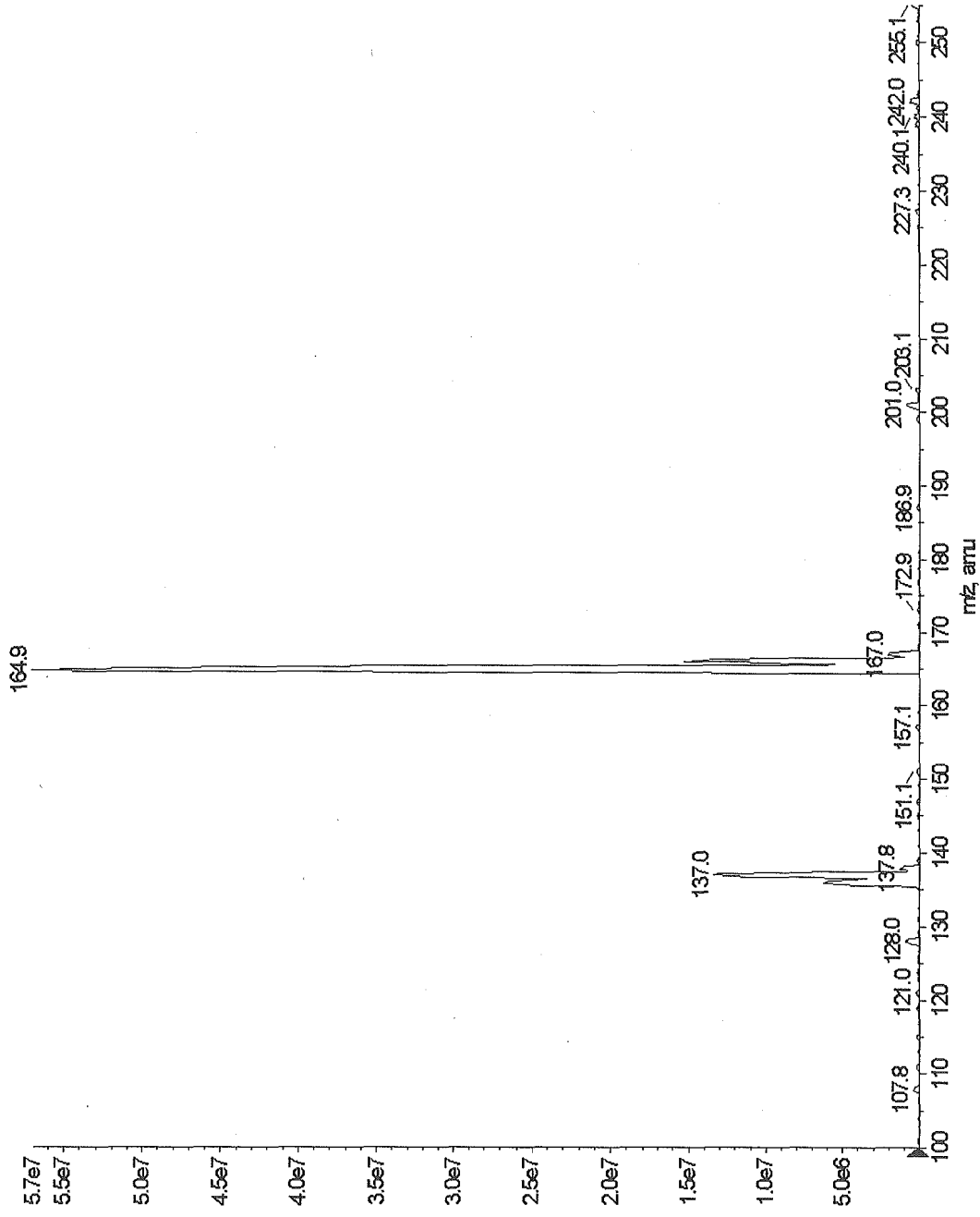


图 2-4. *p*-ヒドロキシ安息香酸エチルのマススペクトル

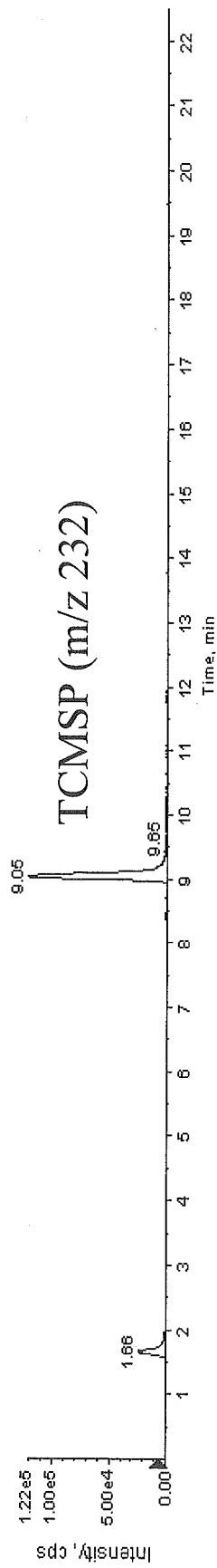
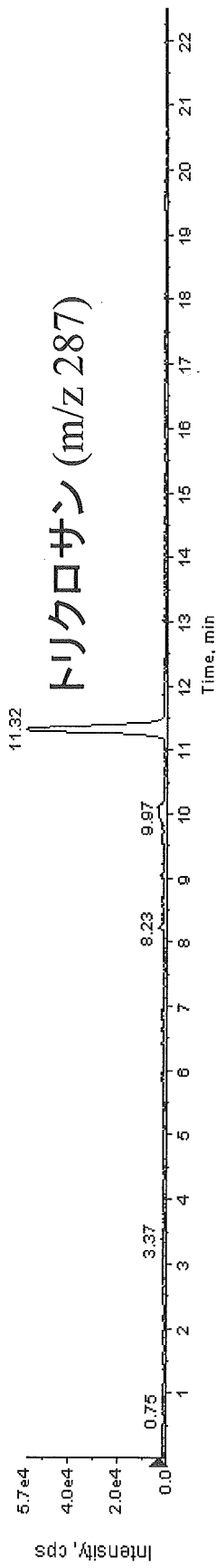
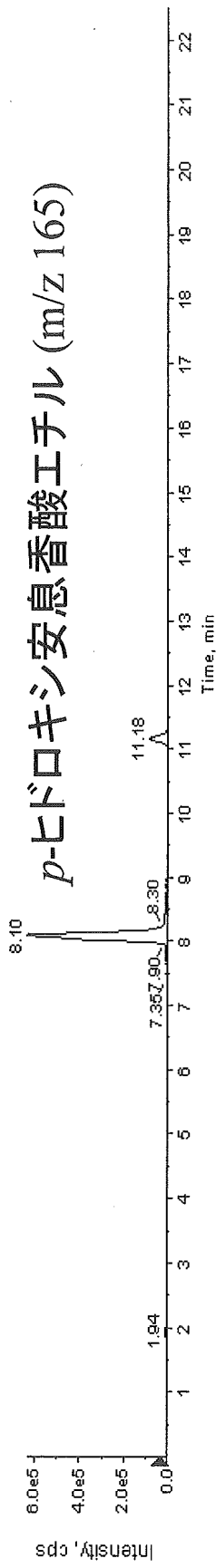
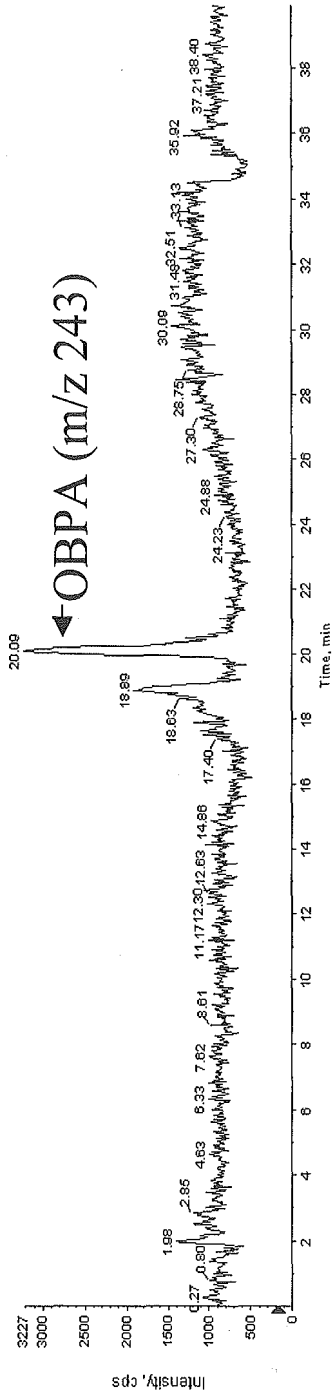


図 2-5. 各種抗菌剤のマスクロマトグラム(100 ng/ml, 標準溶液, SIMモード)

Max. 3228.7 cps.

XIC of +Q1 MI (14 ions): 243.0 amu from Sample 9 (1-1-1) of Data2006012305.wiff (Turbo Spray)



Max. 1.2e5 cps.

XIC of +Q1 MI (14 ions): 168.0 amu from Sample 9 (1-1-1) of Data2006012305.wiff (Turbo Spray)

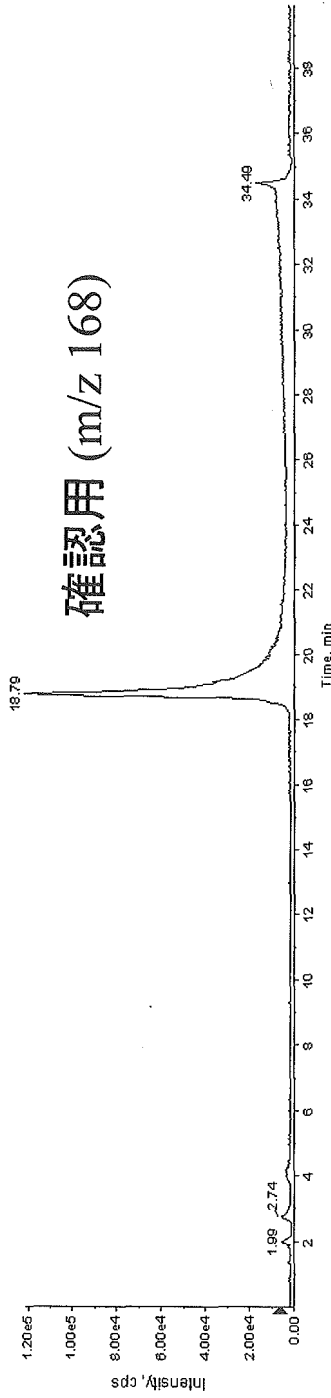


図2-6. 人工皮革抽出液のマクログラム(OBPA)

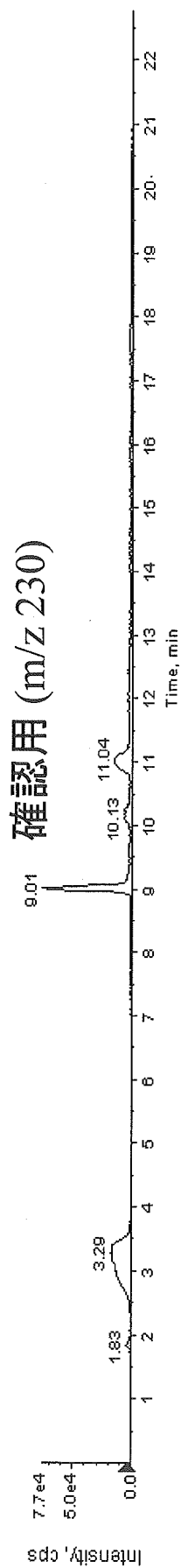
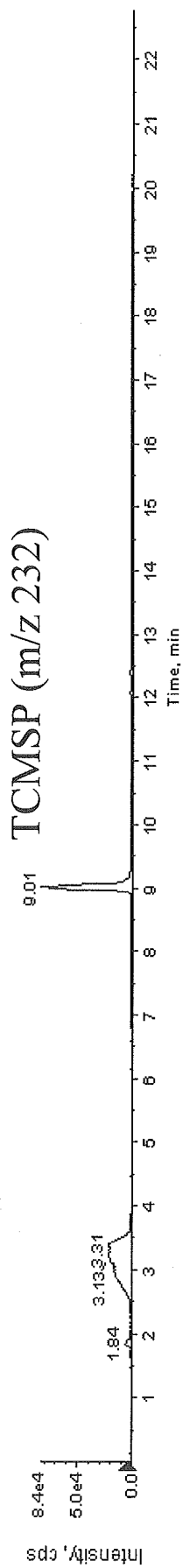


図 2-7. 人工皮革抽出液のマスキング剤のマスプロトグラム(TCMSP)

人工皮革によるアレルギー症例

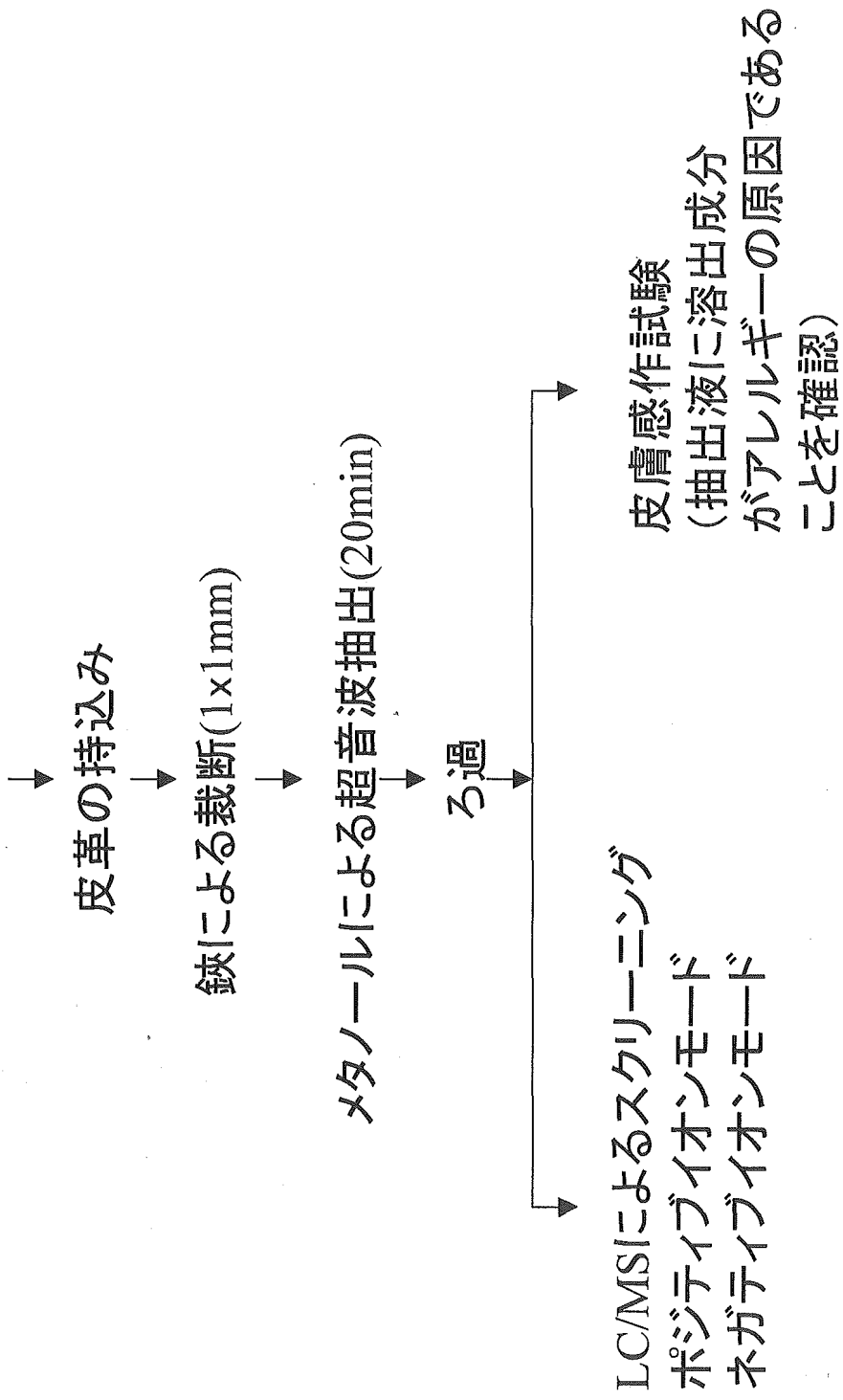


図. 2-8 人工皮革中の抗菌剤のスクリーニングフローチャート

Ⅲ. 抗菌剤の生殖・発生毒性の整理と評価に関する研究

A. 目的

サリドマイド事件以来、妊娠の器官形成期に医薬品などの暴露による催奇形性が問題となり、医薬品、農薬、食品添加物の生殖・発生毒性に関して催奇形性試験が実施されている。抗菌剤を含む化学物質についても生活環境経路による化学物質の生殖・発生毒性が懸念され、とくに催奇形性は重要な問題である。そこで本報告ではラットの妊娠の器官形成期に投与した催奇形性試験についてこれまで検討した抗菌剤の催奇形性について（文末関連文献リスト参照）、その成績を整理して評価を行った。

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、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。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、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非常に重要なこととなっている。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 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。

本研究でヒトエストロゲンレセプター- α 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。さらに YES 試験においても陽性と示すものがあることがわかった。

化学物質等のエストロゲン作用に関する *in vivo* スクリーニング法としてげっ歯類を用いる子宮肥大試験が知られている。子宮肥大試験には幼若ラット (Kanno et al., 2003、清水ら、2003) が用いられる。そこで、*in vitro* における 1 次スクリーニング試験法である ER 試験で陽性を示した抗菌剤について幼若ラットを用いた子宮肥大試験を実施した。

B. 方法

1. 抗菌剤の催奇形性に関する整理と評価

1-1. 被験検物質

評価を行った抗菌剤は表 3-1 に示した。

1-2. 使用動物

日本クレア (株) より Jcl:Wistar 系雌雄ラットを購入し、実験に用いた。

1-3. 催奇形性試験

催奇形性試験は、抗菌剤を妊娠 7 日から 17 日までの器官形成期に母獣に経口投与した。なお、PCMX のみは妊娠 0 日から 19 日まで経口投与した。妊娠 20 日に動物をエーテル麻酔により致死せしめ、各抗菌剤の母獣および胎児への影響を調べた。

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

2-1. 抗菌剤に関する内分泌かく乱作用の *in vitro* スクリーニング法による評価

2-1-1. 被験検物質

表 3-2 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。

2-1-2. ER 試験

ヒト型 ER α 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(和光純薬工業㈱)を用いた。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た。

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

濃度依存的に ER α に親和性を示した抗菌剤を陽性と判断した。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 ($\mu\text{g/mL}$) 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 ER α への相対結合活性 (RBA: relative binding activity) 値を計算した。

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

2-1-3. YES 試験

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。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)。代謝活性化はラット肝 S9 (オリエンタル酵母) を用いた。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。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。

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

2-2. 抗菌剤に関する内分泌かく乱作用の *In vivo* スクリーニング法による評価

2-2-1. 被検物質

表 3-3 に示した ER 試験で陽性あるいは擬陽性を示した DMO を除く 11 種の抗菌剤を用いた。また、陽性対照物質として p-ノニルフェーノル (NP) を用いた。

2-2-2. 使用動物

SD 系雌ラット (Jcl:SD) を日本クレアより購入し、予備飼育ののち 19 あるいは 20 日齢で実験に用いた。

2-2-3. 子宮肥大試験

子宮肥大試験は Kannno らの方法 (2003) に準じて実施した。試験では、被験物質である抗菌剤をオリブ油に溶解あるいは懸濁し、幼若ラットに 1 日 1 回 3 日間連続経口投与した。投与量は最小量 20 mg/kg から最大量 1,000 mg/kg とした。対照群にはオリブ油 (5ml/kg) のみを、陽性対照群には NP (15 ~ 350 mg/kg) をオリブ油に溶解して経口投与した。最終投与の翌日に剖検を行った。動物はエーテル麻酔下で放血屠殺した。子宮を摘出し、周囲の脂肪組織等を除去し、それらの湿重量を測定した。子宮重量は体重 100 g 当たりの子宮相対重量 (mg%) で表した。統計学的有意差検定は、Bartlett 検定により等分散の場合は Dunnett 法を用いて、不分散の場合は Steel 法を用いて各抗菌剤投与群と対照群との間の有意差を検定した。

C. 結果

1. 抗菌剤の催奇形性に関する整理と評価

図 3-1 に各種抗菌剤の妊娠動物および胎児に対する NOAEL (無毒性量)