

の分布をグラフ化した。妊娠動物に関する NOAEL は最も低い ZPT の 2.7 mg/kg および CAA の 3 mg/kg から最も高い PCMX の 300 mg/kg に分散した。胎児に対する NOAEL に関して最も低い ZPT の 2.7 mg/kg から最も高い PCMX の 300 mg/kg に分散した。このように各種抗菌剤の妊娠動物および胎児に対する NOAEL がかなり低いものもあった。

なお、ZPT に関してラット胎児の骨格観察において 8 および 24 mg/kg 投与群で骨格奇形の発現率が増加した。これらの骨格奇形として胸椎弓癒着、胸椎弓欠損、肋骨癒合、肋骨短小、肋骨欠損が観察された。しかし、他の 8 種の抗菌剤についてはラットを用いた催奇形性試験で抗菌剤に起因すると考えられる奇形は認められなかった。

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. 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 IC_{30} 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ればらつきがあり、HO, DMO, IPBC では 40% 程度の、BECDIP, TPN, TCMS, CPIP, HMBDCPB 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

れたで陽性であった。

2-1-2. YES 試験

ラット S9 による代謝活性化を行わないで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。また、代謝活性化を行うと、PCMC は影響を受けなかったが、HO が陽性を示すようになった。これらを陽性と判断し、 EC_{50} と RP を表 3-4 に示した。エストラジオールの EC_{50} は 9.06×10^{-6} $\mu\text{g/mL}$ ときわめて低濃度であった。陽性であった抗菌剤 PCMC および HO の EC_{50} はそれぞれ 33.6 $\mu\text{g/mL}$ と 22.7 $\mu\text{g/mL}$ であった。RP は 0.00003 と 0.00004 であり、エストラジオールの 330 万分の 1 および 250 万分の 1 の活性であることがわかった。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。

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

TPN (60~1,000 mg/kg)、TCMPS (20~500 mg/kg)、PCMC (60~1,000 mg/kg)、CPIP (20~300 mg/kg)、TCMTB (60~500 mg/kg)、BECDIP (20~120 mg/kg)、HMBDCPB (20~500 mg/kg)、TMBCDPB (60~1,000 mg/kg) および IPBC (20~500 mg/kg) はいずれも 3 日間連続投与による子宮重量の増加は観察されなかった (データには示していない)。一方、図 3-2 に示すように幼若ラットに PCMX 600 mg/kg を投与すると、有意に子宮重量が増加した。さらに、HO でも最高投与量である 1,000 mg/kg で子宮重量に有意な増加が観察された。しかし、PCMX および HO いずれも投与量の増加にともなう子宮重量の増加は観察されなかった。これらの子宮重量の増加がみられた PCMX 投与群

および H0 投与群のラットは対照群と比べて著明な体重減少は認められなかった。なお、陽性対照として用いた NP は投与用量の増加とともに子宮重量が有意に増加した。図 3-2 から NP の最小作用量は 75 mg/kg と推定された。従って、本試験に用いた幼若ラットはエストロゲン様作用を有する化学物質に良好な反応を示すことが確認された。

D. 考察

1. 抗菌剤の催奇形性に関する整理と評価

発生毒性因子の定量法として提唱されている妊娠動物に対する NOAEL/胎児に対する NOAEL の比 (A/D 比) について、IPBC, DCIC, BIT, Kathon, BBIT および H0 に関して A/D 比は 1 以下であり、胎児毒性よりも妊娠動物に対する毒性影響が強いことが示唆される。また、CAA, ZPT および PCMX に関しては A/D 比が 1 で、妊娠動物および胎児に対する毒性影響が同じレベルであることが示唆される。このように調べられた各種抗菌剤の A/D 比は 1 を超えることはないが、胎児に対する毒性影響を考慮するとより A/D 値がより小さい抗菌剤の使用が望まれる。さらに抗菌加工製品に使用する抗菌剤に関する安全性確保として最も重要なことは、催奇形性作用を有する可能性がある抗菌剤の使用を慎重にすべきであると考えられる。なお、これらの抗菌剤のうち ZPT のみ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。

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

抗菌剤について 2 つの異なる *in vitro* 試験を実施した。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 2 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。

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

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子宮肥大試験がある。子宮試験には卵巣を摘出した成熟雌ラットあるいは幼若ラットを用いる。一般に、動物を用いる試験ではできるだけストレスを与える処置が少ないことが動物愛護の立場から指摘されている。そこで、本研究では卵巣を摘出する必要はない幼若ラットを用いた子宮肥大試験を採用した。本試験で陽性対照である NP の投与により用量に依存した子宮重量の増加が観察された。また NP の NOEL は 75 mg/kg と推定され、Kanno らの報告 (2003) とほぼ一致した。従って、本試験に用いた幼若ラットはエストロゲン様作用を有する化学物質に良好な反応を示すことが確認された。

本試験において PCMX および H0 を幼若ラットに経口投与すると、用量に依存したものではなかったが、いずれも子宮重量を有意に増加した。従って、

これらの抗菌剤はエストロゲン作用があることが疑われる。なお、いずれの抗菌剤も子宮重量が有意に増加した投与量ではラットの体重に減少などの明らかな毒性影響はみられなかった。また、これらの抗菌剤はいずれも *in vitro* スクリーニング法である ER 試験および YES 試験において陽性反応が観察されている。

このように *in vitro* および *in vivo* におけるスクリーニング法の所見から、PCMX および HO は内分泌系に何らかの影響を及ぼす可能性もあり、今後とも注意を要する抗菌剤と思われる。なお、著者らのグループが実施した PCMX および HO に関する催奇形性試験において、妊娠動物に PCMX900 mg/kg を投与すると体重増加量減少などの毒性影響がみられ、胎児では生存胎児重量の減少および化骨進行度の遅延がみられた。また、HO に関しても妊娠動物に 300 および 1,000 mg/kg を投与すると体重増加量減少などの毒性影響がみられ、胎児では 1,000 mg/kg 投与群で胎児の化骨進行度の遅延がみられた。これらの催奇形試験では PCMX あるいは HO による明らかな内分泌系への影響は観察されなかったが、今後も胎児あるいは新生児への内分泌系に対する影響を詳細に検討する必要もあろう。

以上のように、本試験により抗菌剤の内分泌かく乱作用に関して *in vitro* におけるスクリーニング法および *in vivo* におけるスクリーニング法により有用な知見が得られることが明らかとなった。

E. 結論

1. 抗菌剤の催奇形性に関する整理と評価

ラット器官形成期投与による催奇形性試験による 9 種の抗菌剤の催奇

形性を評価した結果、9 種の抗菌剤のうち 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 / 胎児に対する NOAEL の比 (A/D 比) はいずれも 1 以下であった。

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

20 種の抗菌剤に関して ER 試験ならびに YES 試験法を用いて検討した。その結果、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。YES 試験では 20 種の抗菌剤のうち 2 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に比較して非常に弱かった。

次に、*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た。その結果、11 種の抗菌剤のうち 9 種の抗菌剤について子宮肥大作用はみられなかった。しかし、2 種について用量依存性はみられなかったものの幼若ラットの子宮重量が増加した。

参考文献

- 1) 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.
- 2) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E. and Owens, W.: The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay.

Phase 2: Dose-Response studies. Environmental Health Perspectives, 2003: 106, 167-174

- 3) 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.
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Routledge, E. J. and Sumper, J. P.: Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. Journal of Biological Chemistry, 1997: 272, 3280-3288

本章に関する抗菌剤関連文献

- 1) 野田 勉, 森田 茂, 山田明男, 大垣寿美子: 家庭用品に使用される化学物質の安全性試験(IV) *p*-Chloro-*m*-xylenol のラットによる催奇形性試験, 大阪市立環科研報告, 45, 100-105 (1983)
- 2) 野田 勉, 清水 充, 山野哲夫, 山田明男, 森田 茂: 家庭用品に使用される化学物質の安全性試験(XI) Sodium dichloroisocyanurate のラットによる催奇形性に関する研究, 大阪市立

- 環科研報告, 53, 46-52 (1991)
- 3) 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充: 抗菌剤 3-Iodo-2-propynyl butylcarbamate のラットにおける発生毒性, 生活衛生, 43, 21-26 (1999)
- 4) 野田 勉, 清水 充: 抗菌剤ヒバ油の安全性試験 2. 催奇形性試験, 生活衛生, 44, 59-64 (2000)
- 5) 野田 勉, 山野哲夫, 清水 充: 抗菌剤 2-chloroacetamide のラットにおける発生毒性, 大阪市立環科研報告, 65, 1-8 (2003)
- 6) 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉: 家庭用品に使用される化学物質の安全性試験(XIV) 1,2-Benzisothiazolin-3-one のラットにおける催奇形性に関する研究, 大阪市立環科研報告, 60, 35-40 (1998)
- 7) 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉: 抗菌剤 zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide) の妊娠ラットおよび胎児に対する影響, 第38回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 198-199 (2000)
- 8) 山野哲夫, 野田 勉, 清水 充, 森田 茂, 山田明男: 家庭用品に使用される化学物質の安全性試験(X) 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾン-3-オンのラットによる催奇形性に関する研究, 大阪市立環科研報告, 52, 23-29 (1990)
- 9) 山野哲夫, 清水 充, 野田 勉: 抗菌剤 *N*-*n*-butyl-1,2-benzisothiazolin-3-one の安全性試験 2. 催奇形性試験, 生活衛生, 45, 143-148 (2001)

E. 健康被害情報

なし

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—、大阪市環科研報告, : 65, 17-23 (2003)
- 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, 大阪市環科研報告, : 65, 9-16 (2003)
- 3) 清水 充, 山野哲夫, 野田 勉: 抗菌剤 zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide) のラットにおける催奇形性試験, 大阪市環科研報告, : 66, 9-16 (2004)

2. 学会発表

- 1) 清水 充、船坂邦弘、中間昭彦: *in vitro* スクリーニング法による抗菌剤の内分泌かく乱作用の評価について、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
中間昭彦

表3-1. 催奇形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
1,2-ベンズイソチアゾリン-3-オン	BIT	Proxel PL	ゼネカ
N-n-ブチル-1,2-ベンズイソチアゾリン-3-オン	BBIT	Vanquish 100	アシビア
2-クロロアセトアミド	CAA		東京化成
ジクロロイソシアヌル酸ナトリウム	DCIC		東京化成
ヒバ油	HO	ヒバオイル	環境科学開発
3-ヨード-2-プロピニルブチルカルバマート	IPBC	オサマイドIPBC100	日本オーリン
ケーソンCG	Kathon	ケーソンCG	ロームアンドハース
4-クロロ-3-メチルフエノール	PCMX		東京化成
ビス(2-ピリジルチオ-1-オキシサイド)亜鉛	ZPT		東京化成

1) 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾン-3-オンを13.9%含有および2-メチル-4-イソチアゾン-3-オンを含有。

表3-2. *in vitro* におけるエストロゲン活性を検討した抗菌剤のリスト

略号	抗菌剤名
MBIC	メチル-N-(2-ベンズイミダゾリル)カーバメート
HICHO	2-ヒドロキシ-4-イソプロピル-2,4,6-シクロヘプタトリエン-1-オン
OBPA	10,10'-オキシビス(フェノキシアルシン)
ZPT	ビス(2-ピリジリチオ-1-オキシライド)亜鉛
BECDIP	1-ブromo-3-エトキシカルボニロキシ-1,2-ジヨード-1-プロペン
BNPD	2-ブromo-2-ニトロプロパン-1,3-ジオール
BBIT	N-n-ブチル-1,2-ベンゾイソチアゾリン-3-オン
BIT	1,2-ベンゾイソチアゾリン-3-オン
HO	ヒバ油
PCMX	4-クロロ-3,5-ジメチルフェノール
TPN	2,4,5,6-テトラクロロイソフタロニトリル
TCMSP	2,3,5,6-テトラクロロ-4-(メチルスルフォニル)ピリジン
TCMTBT	2-(チオシアノメチルチオ)ベンゾチアゾール
DMO	4,4'-ジメチル-1,3-オキサゾリン
PCMC	4-クロロ-3-メチルフェノール
CAA	2-クロロアセタミド
IPBC	3-ヨード-2-プロピニルブチルカーバメート
GPI	p-クロロフェニル-3-プロパジルフオルミル
TMBCDPB	4,4'-(テ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
HMBCDPB	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

表3-3. 各種抗菌剤のER活性

	IC ₃₀ ($\mu\text{g/mL}$)	RBA (%)	log RBA
17 β -estradiol	9.7×10^{-6}	100	2.0
TPN	2	5×10^{-4}	-3.3
TCMSP	3	3×10^{-4}	-3.5
PCMX	14	7×10^{-5}	-4.2
PCMC	19	5×10^{-5}	-4.3
CPIP	41	5×10^{-5}	-4.6
HO	45	2×10^{-5}	-4.7
TCMTBT	70	1×10^{-5}	-4.9
BECDIP	116	8×10^{-6}	-5.1
HMBCDPB	158	6×10^{-6}	-5.2
TMBCDPB	186	5×10^{-6}	-5.3
DMO	289	3×10^{-6}	-5.5
IPBC	445	2×10^{-6}	-5.7
BBIT	—		
BIT	—		
BNPD	—		
CAA	—		
HICHO	—		
MBIC	—		
OBPA	—		
ZPT	—		

IC₃₀: 蛍光ラベルされた17 β -estradiolのエストロゲンレセプター α への結合を30%阻害する抗菌剤の濃度

$$\text{RBA: 相対結合活性 (\%)} = \frac{\text{IC}_{30} \text{ of } 17\beta\text{-estradiol}}{\text{IC}_{30} \text{ of the biocide}} \times 100$$

—: 陰性

表3-4. 各種抗菌剤のYES試験の結果

	S9Mix-			S9Mix+		
	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	RP (%)	log RP	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	RP (%)	log RP
17 β -est	0.06×10^{-1}	100	2.0	—	—	—
p-nonylp	0.4	2×10^{-3}	-2.6	0.7	1×10^{-3}	-2.9
bisphenol	8.9	1×10^{-4}	-4.0	5.5	2×10^{-4}	-3.8
BBIT	—	—	—	—	—	—
BECDIP	—	—	—	—	—	—
BIT	—	—	—	—	—	—
BNPD	—	—	—	—	—	—
CAA	—	—	—	—	—	—
CPIP	—	—	—	—	—	—
DMO	—	—	—	—	—	—
HICHO	—	—	—	—	—	—
HMBCDP	nt	—	—	nt	—	—
HO	—	—	—	22.7	4×10^{-5}	-4.4
IPBC	—	—	—	—	—	—
MBIC	—	—	—	—	—	—
OBPA	—	—	—	—	—	—
PCMC	33.6	3×10^{-5}	-4.6	27.7	3×10^{-5}	-4.5
PCMX	±	—	—	±	—	—
TCMSP	nt	—	—	nt	—	—
TCMTBT	—	—	—	—	—	—
TMBCDP	—	—	—	—	—	—
TPN	—	—	—	—	—	—
ZPT	nt	—	—	nt	—	—

RP(相対活性) = $\frac{\text{EC}_{50} \text{ of } 17\beta\text{-estradiol}}{\text{EC}_{50} \text{ of biocide}} \times 100$

±: 擬陽性 (1濃度だけにエストロゲン活性がみられた)

—: 陰性

nt: 試験できず

*: Nakamaらのデータ(1999)

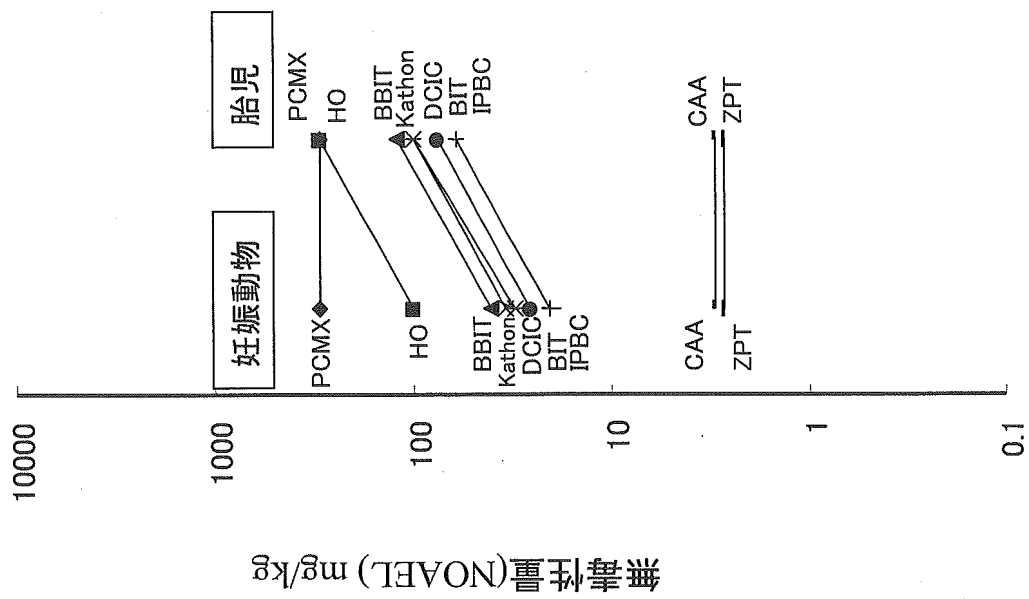


図3-1. 各種抗菌剤の妊娠動物および胎児に対するNOAELの分布

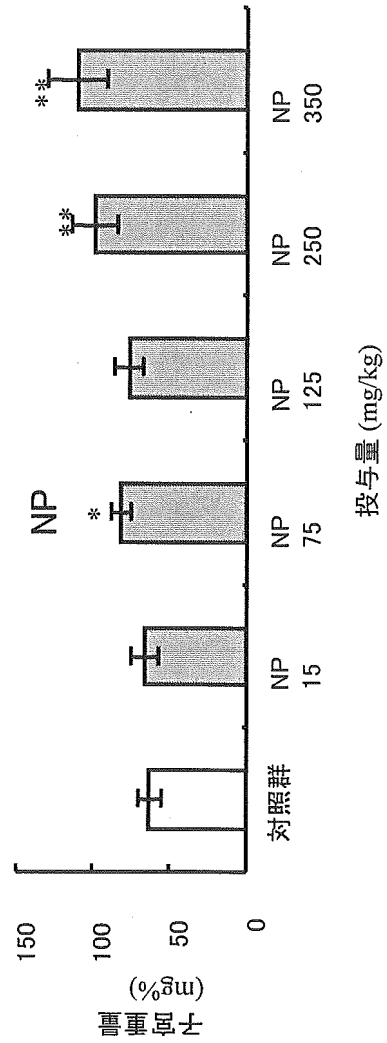
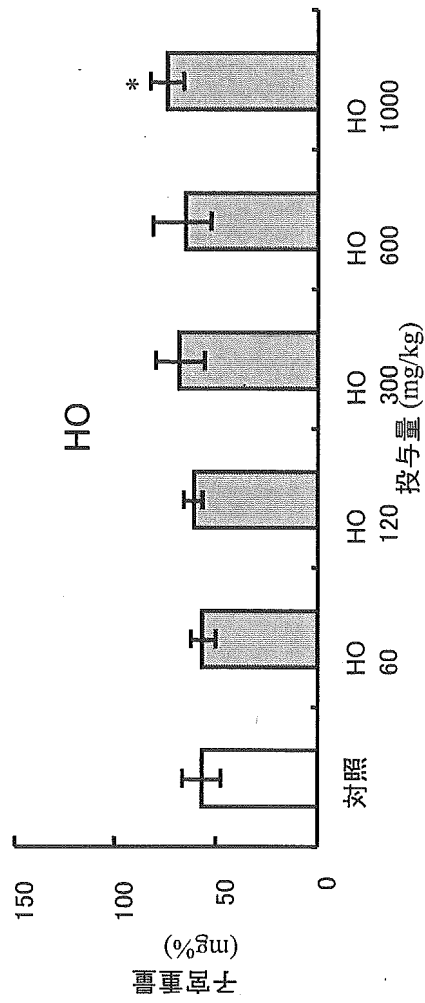
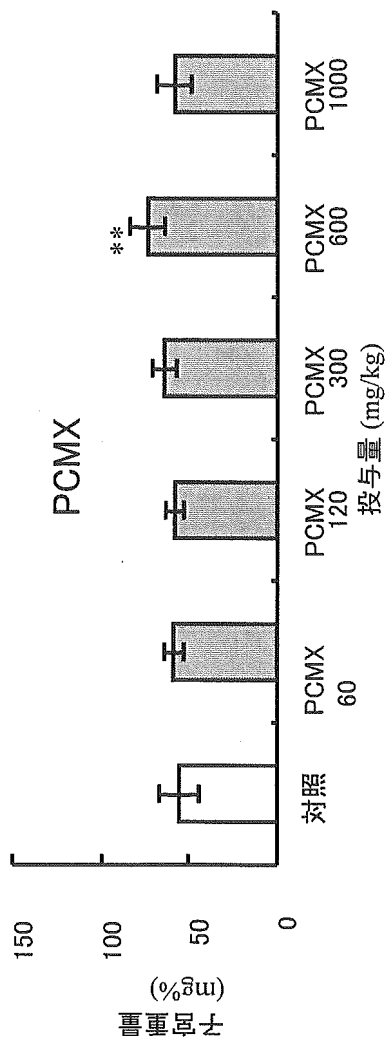


図 3-2. PCMIX, HOおよびNPに関する子宮肥大試験の結果

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

薬剤の微生物に対する評価は単一薬剤で実施されることが多いが、環境衛生を維持する対策として薬剤を単独で応用することは少ない。特に抗真菌剤の場合、自然環境下に広く分布している真菌の活性を阻止するには単独使用で評価を求めることはほとんどなく、数種類の薬剤配合によりその抗真菌活性の評価を求めることが重要となる。

そこで二種薬剤の薬剤配合評価をおこない、それら薬剤による真菌の形態変化を検討した。

衛生上常用される薬剤 4 種 (BC、TBZ、GC、SLS) を用いて薬剤配合による抗真菌活性を測定した。単独での薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) から、4 種薬剤はいずれも強い抗真菌活性を認めた。薬剤配合によりカチオン系薬剤 (BC、GC) はアニオン系薬剤 (SLS) と強く拮抗し、同濃度の配合では高濃度域まで失活した。また、BC、TBZ と協力作用を認めた。TBZ は、特に BC との併用により黒色系真菌に対し、より有効な作用を認めた。

薬剤配合によるそれぞれの真菌の形態変化から、菌糸の不均一化、膨化、厚膜胞子産生が確認され明らかに薬剤抵抗性を示した。

以上より薬剤を配合する場合は、薬剤の特性を十分理解したうえで用いることにより有効な抗真菌活性を維持できるものと結論された。

A. 研究目的

衛生的環境の維持を目的として、薬剤を用いる機会が多くなってきた。こうした薬剤は、微生物を十分制御できる効果のあることが重要である。ところが、一般に薬剤の評価は微生物の中でも細菌について報告されることが多く、真菌に関する報告は必ずしも多いとはいえない。また、薬剤の微生物に対する評価は単一薬剤で実施されることが多いが、実際の環境衛生を維持する対策として薬剤を単独で応用することは少ない。特に抗真菌剤の場合、自然環境下に広く分布している真菌の活性を阻止するには単独使用で評価を求めることはほとんどなく、多くの場合数種類の薬剤配合によりその抗真菌活性の評価を求めることが重要となる。ところが、薬剤配合に関する抗真菌活性の研究はほとんど知られていない。そこで我々は、二種薬剤の等量混合によるチェッカーボード方式により、それぞれの薬剤配合評価をおこない、さらにそれら薬剤による真菌の形態変化を検討したので報告する。

B. 研究方法

1. 供試真菌

ヒトの生活環境中に主要分布を示す真菌を選択し、以下の 5 種真菌について評価した。

- 1) *Aspergillus niger* ATCC 6275
- 2) *Aureobasidium pullulans* H 2827

- 3) *Cladosporium sphaerospermum* M # 729-1
- 4) *Fusarium oxysporum* M # 646-1
- 5) *Penicillium frequentans* KA-3

2. 供試薬剤

衛生上常用される薬剤 4 種を供試した。すなわち、カチオン系界面活性剤の塩化ベンザルコニウム (BC)、グアニジン系薬剤のグルコン酸クロルヘキサジン (GC)、イミダール系薬剤のチアベンダゾール (TBZ)、アニオン系界面活性剤のラウリル硫酸ナトリウム (SLS) を使用した。

3. チェッカーボード方式による抗真菌活性測定試験

供試真菌の 5 株をそれぞれポテトデキストロース寒天 (PDA) 斜面培地に継代し、27°C で 7-10 日間前培養を行った。

1) 胞子液の作製

培養後の斜面培地表面にパスツールピペットで、胞子分散媒の 0.05% Tween80 を含む生理食塩水を加え、十分にピペッティングを行って胞子液を作製した。この胞子液をヘモサイトメーターを用いてカウントし、胞子液を $1-2 \times 10^6$ /ml に調整した。

2) 抗真菌活性測定試験

チェッカーボード方式により測定した。それぞれの薬剤について、Glucose Peptone broth (GP broth) で 2 倍希釈系列を作成した。また、この時の濃度は単独薬剤

時でのMIC値を参考にして、MIC値前後から希釈を行った。次にそれぞれの濃度に希釈した薬剤を6通りの組合せによってヌンクプレート(Φ12mm, 26穴)に0.35mlずつ等量混合し、これに胞子液30μl加えた。このプレートを27°C・7日間培養し、薬剤混合による抗真菌活性を判定した。

3) 判定

培養終了後、液体培地内での真菌の増殖の有無を確認し、それぞれの単独薬剤での増殖阻止を認める最小濃度をもってそれぞれの薬剤の最小発育阻止濃度(MIC)とした。

4) 薬剤配合による真菌の形態変化の観察

薬剤配合による真菌の形態変化を観察した。ただし、形態観察は先の試験結果から一部の薬剤について行い、発育を示した高濃度薬剤域の液体培地の菌要素をラクトフェノール液で封入後、光学顕微鏡下(100-400倍)で観察した。

C. 研究結果

1. 供試薬剤の(MIC)成績

4種薬剤の真菌5種に対するMIC値をまとめた。BCでは6.3-100μg/mlの範囲にMIC値を示したが、SLSおよびGCでは、さらに高濃度となりそれぞれ100-400μg/ml、12.5-200μg/mlであった。

一方、TBZは5種真菌に対して著しい効果を認め、0.4-25μg/mlであった。4種薬剤のうち、特に殺菌性の知られるBC、SLS、GCは、ともに真菌に対して6.3-400μg/mlのやや高濃度でMIC値を示した。また、TBZは本来抗真菌剤として開発された薬剤であり、低濃度で明らかな効果を見ることができた。そこで、ここでの単独薬剤の真菌に対する有効性が他薬剤と併用することにより、その効果が協力作用となる組合せを知るため、次にチェッカーボード方式に基づく2種薬剤の配合による抗真菌活性測定試験を行った。

2. 薬剤配合による抗真菌活性測定成績

1) BCとの薬剤配合成績

BCと他薬剤の配合による抗真菌活性について、縦にBC、横にそれぞれの配合薬剤をとり、それぞれの濃度(μg/ml)を示し、2種薬剤配合により、真菌の発育を認めない濃度をそれぞれプロットした。すなわち、グラフが単一薬剤時の濃度より有効な場合には少ない数値で凹型となり、逆に拮抗する場合には高い数値を示し凸型を示すようになる。

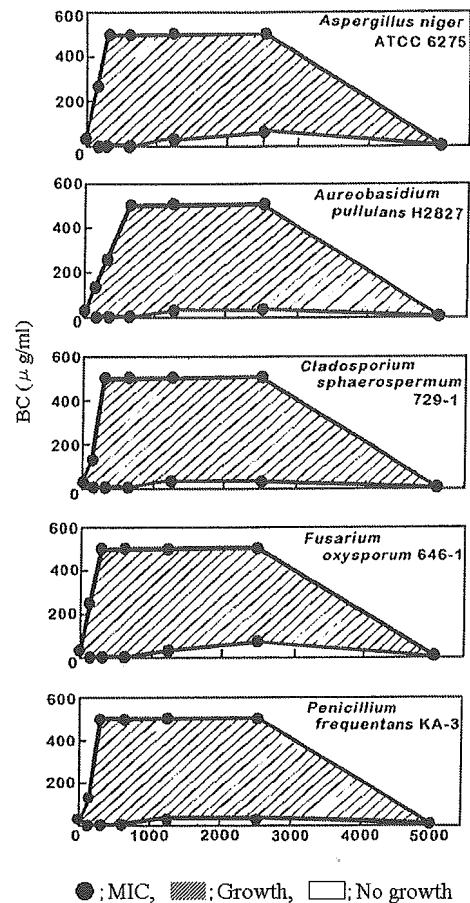


Fig. 1 Checker board test between BC and SLS

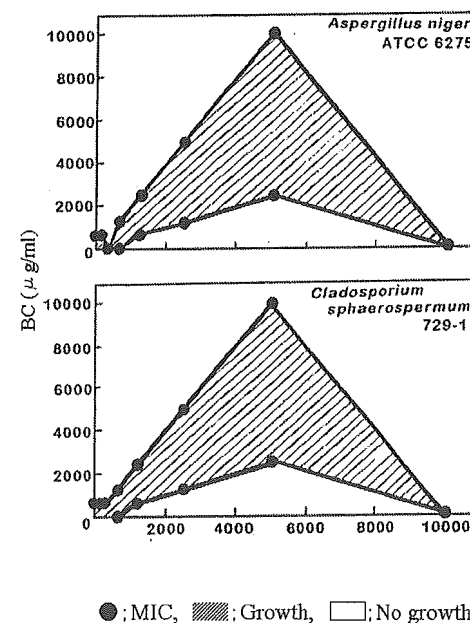


Fig. 2 Checker board test between BC and SLS

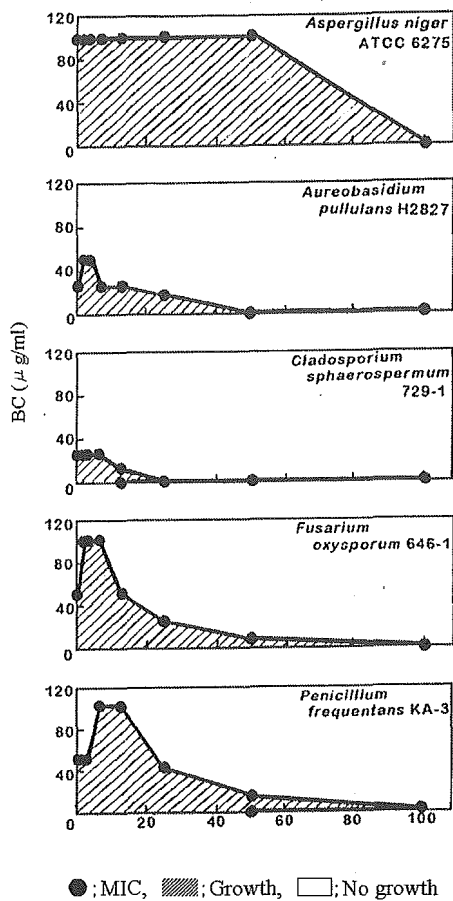


Fig. 3 Checker board test between BC and GC

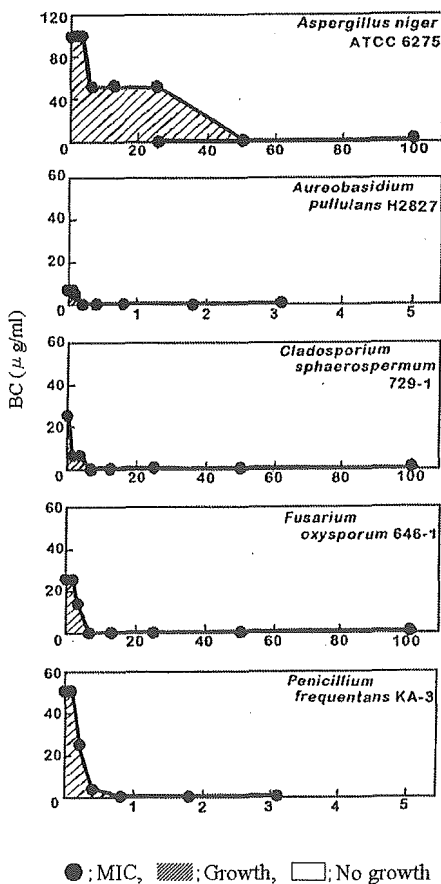


Fig. 4 Checker board test between BC and TBZ

SLS との配合による成績であるが 5 真菌とも単独での MIC 値から配合することにより著しく拮抗したので、さらに 2 種真菌のみについて高濃度域で配合による抗真菌性を試みたが、やはり同様の結果となった。この結果は、ともに界面活性剤である 2 薬剤はそれぞれアニオン系、カチオン系に属し、そのために協力作用がほぼ失われたものといえる。衛生管理上界面活性剤が広く応用されるがイオンの逆の薬剤と併用するとこのような結果をみることもあり、使用に際しては十分な注意を払う必要がある。

また、GC との配合による成績から、A.niger、C.sphaerospermum はほぼ単独薬剤と同値を示したが、その他の 3 種真菌では僅かながら協力作用を示したにすぎない。

また、抗真菌剤として知られる TBZ との配合による成績をみると全体にやや協力作用を認めるが、特に C.sphaerospermum では強い協力作用を認め、生活環境中に多い本菌については、その有用性は十分満たされる配合例と推察された。

2) SLS との薬剤配合成績

SLS と他薬剤との配合による抗真菌活性から、SLS と GC の薬剤配合をみると、拮抗した成績がみられた。

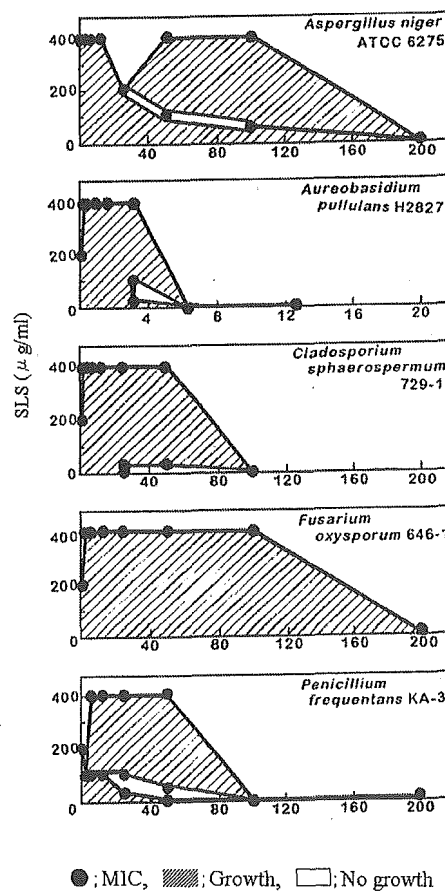


Fig. 5 Checker board test between SLS and GC

両薬剤はこのことからイオンの対立し、拮抗したものと推察された。界面活性剤としてアニオン系であれば、界面活性剤のカチオン系と拮抗することは明らかである。

界面活性剤以外の強力なカチオン系との作用が拮抗か協力かは、この成績からも知られるように多くは非協力となりやすい。つまり、広く使用される界面活性剤についてはその化学的特性を十分理解したうえでの薬剤配合が重要となる。また、生活環境には特にイオンの対立する基質・薬剤が多く、その点からも併用による使用には十分な配慮が必要となるであろう。

SLS と TBZ の配合では、F.oxysporum, A.pullulans でほぼ単独薬剤にみる MIC 値と同値を示したが、それ以外では弱いながらも協力作用を認めた。

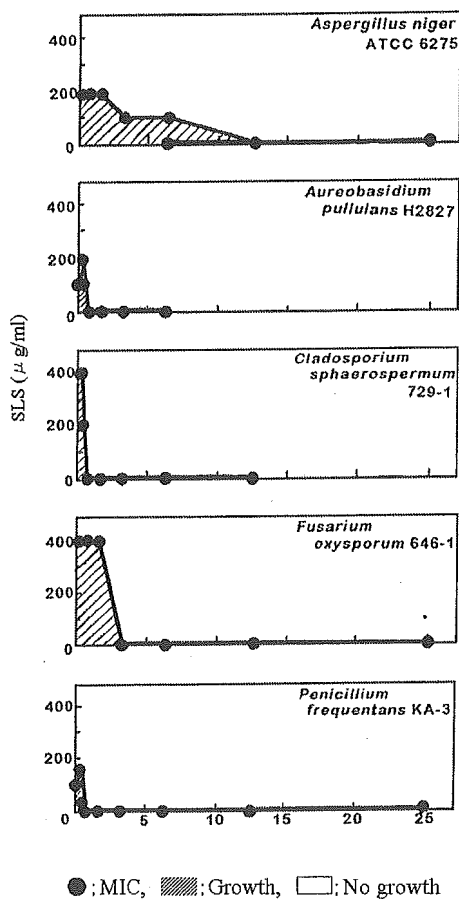


Fig. 6 Checker board test between SLS and TBZ

全体的に SLS と今回使用した薬剤の間には著しい協力作用は認められなかった。

3) GC との薬剤配合成績

GC と他薬剤との配合による抗真菌活性について、GC と TBZ との配合による抗真菌活性をみると、高濃度域で若干の協力作用を認める程度であった。

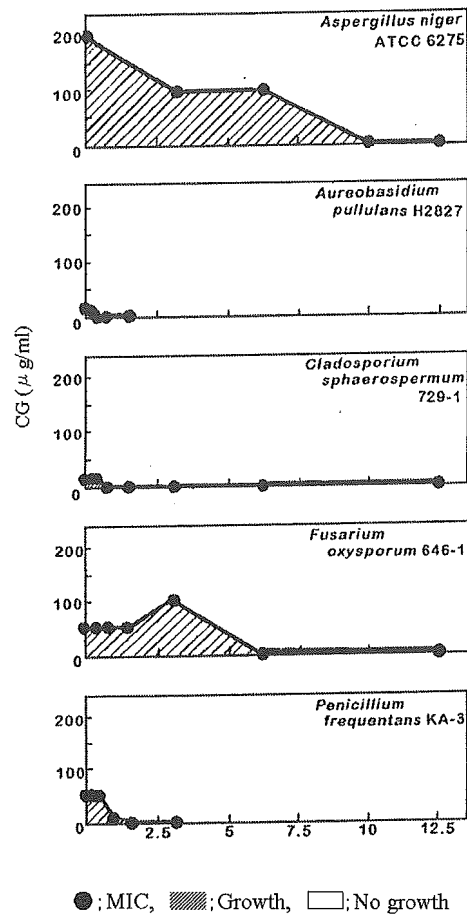


Fig. 7 Checker board test between GC and TBZ

GC と他薬剤との配合による特徴としては、イオンの対立する場合に著しくその効果が失活されることであった。SLS がその良い例である。

4) TBZ との薬剤配合成績

GC と他薬剤との配合による成績を示してきたが、TBZ との併用効果が認められる薬剤として BC が挙げられる。全ての真菌に対しては明らかではないが、黒色系真菌でしかも環境汚染の主要真菌である C.sphaerospermum に対し、特に有効な成績を認めることからその応用が十分期待されるであろう。

5) 薬剤配合による形態変化の観察

4 種薬剤と 5 種真菌のそれぞれの組合せから培養後の形態変化を観察した。ここでは 5 種真菌が示した形態変化を鏡検したところ、ほぼどの薬剤に対しても共通した変化が認められた。A.niger では菌糸の不均一化から、膨化さらに高濃度から低濃度にかけて共通して分生子柄先端の頂のう上にフィアライド形成を認めなかった。

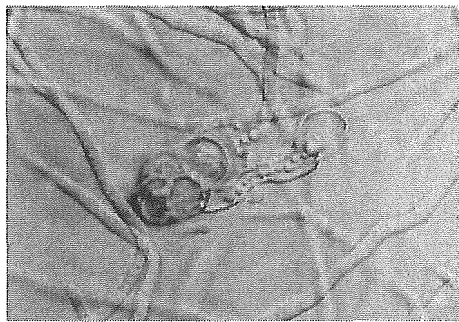


Fig.8 *A.niger* ATCC 6275
Treated (BC 63 μ g/ml, SLS 630 μ g/ml)

A.pullulans では菌糸の褐色化が弱く、硝子様で一部分節化を認めるが著しいものではなかった。

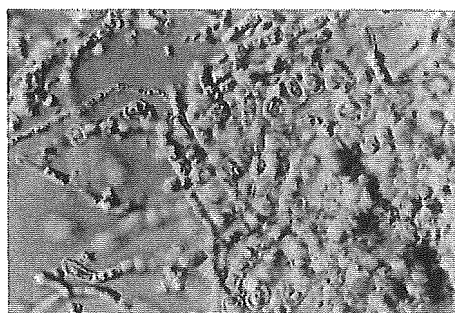


Fig.9 *Aureobasidium pullulans* H 2827
Treated (GC 1.6 μ g/ml, TBZ 0.05 μ g/ml)

C.sphaerospermum では菌糸の着色化、不均一化、文節化を特徴とし、一部で膨化を認めた。

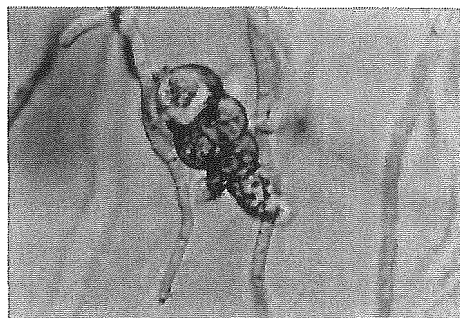


Fig.10 *Cladosporium sphaerospermum* M# 729-1
Treated (SLS 50 μ g/ml, GC 6.3 μ g/ml)

F.oxysporum では菌糸に著しい厚膜胞子産生を認め、着色が強く観察された。*P.frequentans* では菌糸の不均一化、膨化を除いて著しい変化を認めなかった。

以上より薬剤配合による 5 種真菌の形態変化は全体に菌糸の膨化、不均一化、肥厚化などを特徴とし、明らかに薬剤抵抗性を示しているものと推察された。抵抗性の特徴として特に、*F.oxysporum* にみる厚膜

胞子があり、薬剤の配合の場合でも真菌は少なからず抵抗性を示すし、強い場合は長期抵抗性を維持することにより、薬剤抵抗性を得る可能性も考えられる。こうしたことから、薬剤の使用に際しては単独薬剤に際しては単独薬剤に限らず、薬剤配合した場合でも十分な対応が望まれる。

E. 結論

衛生上常用される薬剤 4 種 (BC、TBZ、GC、SLS) を用いて薬剤配合による抗真菌活性を *A.niger*、*A.pullulans*、*C.sphaerospermum*、*F.oxysporum*、*P.frequentans* の 5 種真菌をチェッカーボード方式で測定した結論は以下のとおりであった。

1. 単独での薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) をみたところ、4 種薬剤はいずれも強い抗真菌活性を認めた。

2. 薬剤の 2 種等量配合によりカチオン系薬剤の BC、GC はアニオン系薬剤の SLS と強く拮抗し、同濃度の配合では高濃度域まで失活した。また、BC、TBZ と協力作用を認めた。SLS は TBZ との配合により弱いながらも協力作用を認めた。GC は SLS 以外は弱いながらも協力作用を認め、TBZ は、特に BC との併用により *C.sphaerospermum* などの黒色系真菌に対し、より有効な作用を認めた。

3. 薬剤配合によるそれぞれの真菌の形態変化をみたところ、菌糸の不均一化、膨化、厚膜胞子産生が確認され、明らかに薬剤抵抗性を示した。

以上により薬剤を配合する場合は、薬剤の特性を十分理解したうえで用いることにより有効な抗真菌活性を得ることができるものと結論された。

F. 健康危険情報

抗菌加工製品は単独の抗菌剤で構成することはない。本研究では本来の抗菌性を背景にして薬剤を配合することによる効果増強を確認することにある。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も重要だが、健康影響の観点からの情報も無視できない。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 村松芳多子, 高鳥 浩介: カビ検査法、防菌防黴誌、33(9):485-491 (2005)

(2) 太田利子、村松芳多子、高鳥 浩介：防カ
ビ技術の基礎、環境管理技術 22(4):113-120
(2004)

2. 学会発表

なし

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17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18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薬品部長
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
