

不全を特徴とする萎縮性的変化が観察された (Fig. 3)。また、卵巣に萎縮性的変化が見られた雌では子宮内膜上皮が萎縮し、上皮の迂曲あるいは陥凹はほとんどなく内腔がやや拡張した (Fig. 4)。さらに子宮腺の萎縮あるいは減少も観察された。しかし、BPA 0.4mg/匹以下の投与群では卵巣および子宮に組織学的な変化は観察されなかった (Table 3)。

考 察

1. NPの胎生期および新生児期投与

著者らはラットの胎生期及び新生児期にNPを曝露したとき、2 mg/匹 (200~400mg/kgに相当) のNPをラットの新生児に皮下投与すると雌児のみに膈開口の促進、性周期の乱れ (持続発情)、不妊および卵巣重量の減少が見られることを報告した⁷⁾。本研究で新生児期にNP 2 mg/匹を投与した生後6月齢雌のみに卵巣および子宮に組織学的な変化が認められ、この変化は不可逆的なものであることがわかった。組織学的な所見からNPの雌新生児への投与は子宮内膜上皮の増殖性変化を伴う無排卵を引き起こし、生殖器の発育を乱すと考えられた。そのため、NP 2 mg/匹を投与された雌児で交尾は可能であるが、不妊であったと考えられる⁷⁾。さらに、性周期の乱れも卵巣の組織的な変化に起因するものと考えられる。このような作用はNPのエストロゲン様作用によると考えられる。性ステロイドホルモンの新生児ラットへの投与による生殖器への影響は生後5日までが感受性時期として知られている¹⁰⁾。従って、NPは雌児ラットへの生後0~6日までの投与により生殖器への影響が大きいと考えられる。

Nagaoら¹¹⁾もSD系ラットの雌の新生児に生後1-5日にNP500mg/kgを皮下投与すると、生後16週齢で卵巣および子宮に組織学的変化が見られ、卵胞嚢胞および黄体形成不全、子宮内膜上皮の増生および扁平上皮化を観察している。これらの所見は今回の結果と一致した。さらに、alkylphenolであるoctylphenol (OP) 100mg/kgをDonryuラットの雌新生児に生後15日まで皮下投与した試験でも、生後56および77日齢の卵巣および子宮で同様の不可逆的な組織学的変化が生じることが報告されている¹²⁾。また、本研究でNPの新生児期投与により子宮内膜上皮増殖が観察された。子宮内膜上皮の同様の増殖性変化はDESをマウス¹³⁾およびハムスター¹⁴⁾の新生児期に投与することにより観察される。

NPのSD系ラット雄児への新生児期の投与 (500 mg/kg, s.c.) により雄性生殖器にも精細管内生殖細胞の減少、精巣上体管内に変性精子の出現などの組織学的な変化が見られることが報告されている¹¹⁾。しかし、本研究では雄児の新生児期に2 mg/匹 (200~400 mg/kgに相当) を投与しても雄性生殖器への組織学的

な変化はまったく観察されず、さらに雄児の交配能に異常がなかった⁷⁾。これらの実験結果が一致しなかった理由として、投与量および投与期間の違い、さらに実験に用いたラットの系統差によることが考えられた。

NagaoらはNPに関してSD系ラットを用い二世世代試験を実施した¹⁵⁾。NPの投与は2, 10および50mg/kgを経口投与した。その結果、母獣におけるNOAELは50mg/kg/dayであり、次世代ラットのNOAELは10 mg/kg/dayであると報告している。なお、この試験では次世代ラットの生殖器へのエンドポイントとして、生殖能や病理組織学的変化等を指標としている。この二世世代試験の投与経路とは異なるが、本研究で雌児の子宮あるいは卵巣に組織学的な変化が見られた投与量2 mg/匹 (200~400mg/kgに相当) は次世代のNOAELの20~40倍であり、雄児では2 mg/匹でも雄性生殖器に影響をおよぼさなかった。

2. BPAの新生児期投与

著者らは新生児ラットにBPA (0.04, 0.4および4 mg/匹) を出生日から3日間皮下投与したとき、雄児ラットのAGDの減少、包皮反転日の遅延と精巣および精巣上体重量の軽度な減少が見られることを報告した⁶⁾。しかし、いずれの群も精巣上体内の精子数に差がなかった⁶⁾。本研究でBPAを投与したいずれの雄児ラットの精巣、精巣上体、前立腺および精囊にも組織学的な変化は認められなかった。Nagaoら¹⁶⁾はSD系ラットの雄新生児に生後1-5日にBPA300mg/kgを皮下投与しても生後13あるいは14週齢雄児の精巣、精巣上体、前立腺、精囊に組織学的な変化が見られなかったことを報告しており、本研究の結果と一致した。

BPAのマウス胎児の雄性生殖器に対する影響として、マウスの妊娠11-17日に低用量のBPA (0.002および0.02mg/kg) を投与した場合に、次世代の6月齢雄マウスで前立腺重量が増加し¹⁷⁾、0.02mg/kg投与群では精子生産量の減少が報告されている¹⁸⁾。一方、Ashbyらはマウスを用いた同様の実験条件で0.002および0.02mg/kgのBPAの投与で次世代雄マウスの前立腺重量や精子生産量に影響がなかったことを報告した¹⁹⁾。EmaらはSD系ラットを使用した二世世代試験 (0.0002~0.2 mg/kg) でも、次世代の雌雄ラットに生殖系への影響が認められないことを報告した²⁰⁾。さらに、ラットの妊娠11-20日にBPA3.2~320mg/kgを母獣に投与しても、F₁雄ラットの生殖器に変化が見られないことが報告されている²¹⁾。

雌新生児に関して、著者らはBPA (0.04~4 mg/匹) を雌の新生児期に投与すると、雌児のAGDの減少、性周期の乱れおよび子宮重量の減少および卵巣萎縮が観察されたことを報告した⁷⁾。本研究ではBPA 4 mg/匹 (400~800mg/kgに相当) を投与された雌児の卵巣で卵胞嚢胞、黄体形成不全などの組織学的な変化が、

子宮内膜上皮および子宮腺に萎縮性変化が見られた。これらの萎縮性変化はラットの新生児期にDESを投与したのちにも観察されている²⁾。

一方、Nagaoら¹⁶⁾の試験ではSD系ラットの雌新生児期(生後1-5日)にBPA300mg/kgを皮下投与しても生後13あるいは14週齢で卵巣および子宮に組織学的な変化を認めていない。この所見の差異は投与用量による差異によると考えられる。すなわち、本研究ではBPAの最高投与量が800mg/kgと推定され、Nagaoらの試験の投与量の約2.7倍であったためであると思われる。

本研究ではBPA0.4mg/匹(40~80mg/kgに相当)以下の投与量で新生児の雌雄生殖器に組織学的な影響が認められなかった。Tylら²¹⁾はSD系ラットを用いたBPAの三世代試験(0.001~500mg/kg)を実施し、BPAのNOAELが5mg/kgであることを求めている。本研究で雌新生児の生殖器の組織学的な変化が見られないBPA投与量0.4mg/匹(40~80mg/kgに相当)はこのNOAELの約10倍であり、組織学的な変化が見られた投与量4mg/匹(400~800mg/kgに相当)は約100倍も高い濃度であると推定される。

結 論

NPをラットの胎児期及び新生児期に暴露した生後6月齢の雌雄生殖器の組織学的所見を調べた。NP2mg/匹(200~400mg/kgに相当)を新生児期に7日間皮下投与した雌児ラットで子宮および卵巣に組織学的な変化が観察され、雌児でNPの新生児期投与により生殖器への影響が認められた。しかし、雄児でNPによる生殖器への組織学的な変化は認められなかった。

さらに、BPAを新生児期に暴露した生後6月齢ラットの雌雄生殖器の病理組織学的変化についても調べた。BPA4mg/匹(400~800mg/kgに相当)を新生児期に3日間皮下投与した雌児では卵巣および子宮に組織学的な変化が観察された。しかし、雄児では精巣、精巣上体、前立腺および精嚢に異常は認められなかった。従って、雌児でBPAの新生児期投与により生殖器への影響があることがわかった。

参考文献

- 1) 環境庁：“内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応指針について—環境ホルモン戦略計画SPEED'98—”平成12年11月(2000)
- 2) Soto,A.M., Justicia, H., Wray,J.W. and Sonnenschein,C.: p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.*,92, 167-173 (1991)
- 3) Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M. and Sonnenschein, C.: Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.*,104,298-305 (1996)
- 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活性をもつ化学物質のスクリーニング, 大阪市立環科研報告, 61, 64-71 (1999)
- 5) Odum, J., Pyrah, I.T., Foster, J.R., Van Miller, J.P., Joiner, R.L. and Ashby, J.: Comparative activities of p-nonylphenol and diethylstilbestrol in noble rat mammary gland and uterotrophic assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 29,184-195 (1999)
- 6) Ashby, A. and Tinwell, H.: Uterotropic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ. Health Perspect.*, 106,719-720 (1998)
- 7) 野田勉, 山野哲夫, 清水充: ラットの胎生期および新生児期にノニルフェノールを曝露したときの雌雄生殖器官への影響(その2), 日本食品衛生学会第80回学術講演会講演要旨集, p42 (2000)
- 8) 野田勉, 山野哲夫, 清水充: 新生児期に投与されたbisphenol Aのラット生殖器官への影響, 第38回全国衛生化学技術協議会年会講演集, p202-203 (2001)
- 9) 野田勉, 山野哲夫, 清水充: ラットの胎生期および新生児期にノニルフェノールを曝露したときの雌雄生殖器官への影響, 日本食品衛生学会第79回学術講演会講演要旨集, p.45 (2000)
- 10) Ennis, B. and Davis, J.: Reproductive tract abnormalities in rats treated neonatally with DES. *Am. J. Anat.*, 164, 145-154 (1982)
- 11) Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., Nakagomi, M., Yoshimura, S. and Ono, H.: Disruption of the reproductive system and reproductive performance by administration of nonylphenol to newborn rats. *Human Exp. Toxicol.*, 19, 284-296 (2000)
- 12) Katsuta, S., Yoshida, M., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A.: Irreversible effects of neonatal exposure to p-tert-octylphenol on the reproductive tract in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165, 217-226 (2000)
- 13) Bern, H.A., Edery, M., Mills, K.T., Kohrman, A.F., Mori, T. and Larson, L.: Long-term alterations in histology and steroid receptor levels of the genital tract and mammary gland following neonatal exposure of female BALB/cCrg1 mice to various doses of diethylstilbestrol. *Cancer Res.*, 47, 4165-4172 (1987)
- 14) Hendry, W.J., III, and Leavitt, W.W.: Altered morphogenesis of the immature hamster uterus following neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Differentiation*, 52, 221-227 (1993)
- 15) Nagao, T., Wada, K., Marumo, H., Yoshimura, S. and

- Ono,H.: Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod. Toxicol.*, 15, 293-315 (2001)
- 16) Nagao, T., Saito, Y., Usumi,K., Kuwagata,M. and Imai,K. Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. *Reprod. Toxicol.*,13, 303-311 (1999)
- 17) Nagel, S.C., von Saal,F.S., Thayer,K.A. Dhar,M.G. Boechler,M. and Welshons,W.V.: Relative binding affinity-serum modified assess (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ. Health Perspect.*, 105, 70-76 (1997)
- 18) von Saal,F.S., Cooke,P.S., Buchanan,D.L., Palanza,P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Parmigiani, S. and Welshons,,W.V.: A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health*, 14, 239-260 (1998)
- 19) Ashby,J. Tinwell.H. and Haseman,J.: Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 30, 156-166 (1999)
- 20) Ema,M., Fujita,S., Furukawa,M., Kiguchi,M., Ikka,T. and Harazono, A.: Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.*,15, 505-523 (2001)
- 21) Kwon,S., Stedman,D.B. Elswick,B.A. Cattley,R.C. and Welsh,F.: Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicol. Sci.*, 55, 399-406 (2000)
- 22) Medlock, K. L., Sheehan, D. M., Nelson, C. J., Branham,W.S.: Effects of postnatal DES treatment on uterine growth, development, and estrogen receptor levels. *J. Steroid Biochem.*, 29, 527-532 (1988)
- 23) Tyl,R.W., Myers,C.B., Marr,M.C., Thomas,B.F., Keimowitz,A.R., Brine,D.R., Veselica,M.M., Fail,P.A., Chang,T.Y., Seely,J.C., Joiner,R.L., Butala,J.H., Dimond,S.S., Cagen, S.Z., Shiotsuka,R.N., Stropp,G.D. and Waechter,J.M.: Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*, 68, 121-146 (2002)

異なる週齢のラットを用いた子宮肥大試験とHershberger試験

清水 充, 山野哲夫, 野田 勉

Uterotrophic and Hershberger assay utilizing rats of different age

Mitsuru SHIMIZU, Tetsuo YAMANO and Tsutomu NODA

Abstract

Rodent uterotrophic assay is known as *in vivo* screening method for examining the estrogenic effect of chemicals. Immature rats and ovariectomized mature rats have been used in the assay, the difference in the sensitivity of these animals to estrogenic compounds has not been clarified. Immature Sprague-Dawley (SD) and F344 female rats (17 days old) were treated with bisphenol A (BPA, 10-1,000 mg/kg, s.c.), a weak estrogenic compound, for three days. When a large dose of BPA (1,000 mg/kg) was administered to the immature rats, uterotrophic effect was seen. Meanwhile, SD and F344 female adult rats ovariectomized at 8 weeks of age were treated with BPA (2-200 mg/kg, s.c.) for six days. A small dose of BPA (20 mg/kg) increased the weight of uterus in these female adult rats.

Rodent Hershberger assay is known as *in vivo* screening method for examining the androgenic and antiandrogenic effect of chemicals. However, it is not clear whether the effect of chemicals is influenced by the age of male rats. SD male rats were castrated at 6 weeks or 10 weeks of age and then treated for seven days with testosterone propionate (TP: 0.01-0.3 mg/kg, s.c.) with or without flutamide (FLU: 0.3 and 3 mg/kg, s.c.) to compare the androgenic effect of the former and the antiandrogenic effect of the latter. The lower doses of TP (0.03-0.1 mg/kg) significantly increased the weight of the seminal vesicles, ventral prostate, and glans penis in rats castrated at 10 weeks of age. When these rats were treated with the lower dose of FLU (0.3 mg/kg), antiandrogenic effect on the seminal vesicles and glans penis was observed. In rats castrated at 6 weeks of age, meanwhile, the lower dose of FLU produced antiandrogenic effect on the prostate.

These results suggest that ovariectomized mature rats are more sensitive to the uterotrophic effect of BPA than immature rats. The present study also indicate that ageing influences the androgenic effect of TP and the antiandrogenic effect of FLU in Hershberger assay.

Key words : uterotrophic assay, Hershberger assay, rat, bisphenol A, testosterone, flutamide

緒 言

近年, ヒトの精子数がここ半世紀の間に半減しているという報告がなされ¹⁾, その原因として内分泌攪乱化学物質との関連性が疑われたことで, 内分泌攪乱化学物質のヒトの健康への影響に強い関心が集まっている。

化学物質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。子宮肥大試験には未成熟ラット²⁾あるいは

は卵巣摘出した成熟雌ラット³⁾が用いられるが, それらの動物における感度については明確にされていない。ポリカーボネート樹脂の原料などに使用されるビスフェノールA (BPA) には弱いエストロゲン作用を有することが報告されている^{3a)}。そこで, BPAを用いて未成熟ラットおよび卵巣摘出した成熟ラットを用いた子宮肥大試験を実施し, これらのラットにおけるBPAのエストロゲン作用の比較を行った。さらにBPAのエストロゲン作用に関して, ラットの系統差により下垂体からのプロラクチンの分泌促進作用に差

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences,

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

異なることも報告されている¹⁾。そこで、異なる系統のラットを用いた子宮肥大試験も実施した。

他方、化学物質のアンドロゲン作用および抗アンドロゲン作用に関する *in vivo* スクリーニング法として Hershberger 試験²⁾ が知られている。この試験には 6 週齢以上の去勢された雄ラットが用いられる³⁾。しかし、異なる週齢の雄ラットにおけるアンドロゲン活性および抗アンドロゲン活性の差異は明確にされていない。そこで、6 週齢および 10 週齢の雄ラットを用いて Hershberger 試験を実施した。なお、アンドロゲン活性の試験系ではプロピオン酸テストステロン (TP) を用い、抗アンドロゲン活性の試験系ではフルタミド (FLU) を用いて検討を行った。

実験方法

1. 試験薬物

ビスフェノール A (BPA: CAS No. 80-05-7)、ジプロピオン酸エストラジオール (E: CAS No. 113-38-2) およびプロピオン酸テストステロン (TP: CAS No. 57-85-2) は和光純薬工業(株)から、フルタミド (FLU: CAS No. 13311-84-7) はシグマアルドリッチジャパン(株)から購入した。

2. 子宮肥大試験

2-1 使用動物

未成熟雌ラットを用いる試験では、生後 13 日齢 SD 系雌ラット (Slc:SD)、F344 系雌ラット (F344/NSlc) を母獣とともに日本エスエルシーより購入し、予備飼育ののち 17 日齢で実験に用いた。動物は母獣および雌児を実験用床敷 (日本クレア) を敷いたラット用プラスチックケージに収容した。母獣には繁殖用固形飼料 NMF (オリエンタル酵母製) を与え、飲料水として水道水を自由摂取させた。

成熟ラットを用いる試験では、生後 7 週齢の SD 系雌ラット (Slc:SD) および F344 系雌ラット (F344/NSlc) を日本エスエルシーより購入した。予備飼育の後、生後 8 週齢で左右の卵巢摘出を行った。動物はラット用金網ケージに収容し、固形飼料 MF (オリエンタル酵母製) を与え、飲料水として水道水を自由摂取させた。

いずれの動物も予備飼育および試験期間中は、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 20\%$ 、点燈時間 7 時から 19 時の環境下で飼育した。

2-2 投与量および投与方法

未成熟ラットを用いる試験では、BPA をオリブ油に溶解あるいは懸濁し、ラットに 1 日 1 回 3 日間連続皮下投与した。投与量は 10、100 および 1,000 mg/kg とした。対照群にはオリブ油 (10 ml/kg) のみを、陽性対照群には E (0.01 mg/kg) をオリブ油に溶解して皮下投与した。

成熟ラットを用いる試験では BPA の投与量は 2、

20 および 200 mg/kg とした。BPA は局方オリブ油に溶解あるいは懸濁し、卵巢摘出の 1 週間後から雌ラットに 1 日 1 回 6 日間連続皮下投与した。対照群には局方オリブ油 (5 ml/kg) を、陽性対照群には E 0.005 mg/kg を同様に皮下投与した。

2-3 観 察

最終投与の翌日に剖検を行った。動物はネンブター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。なお、子宮重量の変化は体重 100g 当たりの臓器重量として表示した。

3. Hershberger 試験

3-1 使用動物

生後 4 週齢および 8 週齢の SD 系雄ラット (Slc:SD) を日本エスエルシーより購入した。動物は予備飼育の後、生後 6 週齢 (6 週齢群) および 10 週齢 (10 週齢群) で左右の精巣摘出を行った。去勢後 1 週間は回復期間とした。いずれの動物も予備飼育および試験期間中は、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 20\%$ 、点燈時間 7 時から 19 時の環境下で飼育し、固形飼料 MF (オリエンタル酵母製) を与え、飲料水として水道水を自由摂取させた。

3-2 投与量および投与方法

アンドロゲン活性試験では TP の投与量は 0.01、0.03、0.1 および 0.3 mg/kg とした。TP は局方オリブ油に溶解し、6 週齢 (6 週齢群) および 10 週齢 (10 週齢群) で去勢した雄ラットに、去勢 1 週間後から 1 日 1 回 7 日間連続皮下投与した。対照群には局方オリブ油 (1 ml/kg) を同様に皮下投与し、最終投与の翌日に剖検を行った。

抗アンドロゲン活性試験では、6 週齢群および 10 週齢群去勢雄ラットに FLU を局方オリブ油に溶解し、FLU (0.3、3 mg/kg) の皮下投与直後に TP (0.3 mg/kg) を異なる部位に皮下投与した。これらの処置を 7 日間行い、最終投与の翌日に剖検をした。対照群には局方オリブ油 (1 ml/kg) を同様に皮下投与し、最終投与の翌日に剖検を行った。

3-3 観 察

実験期間中、毎日動物の一般状態について観察した。最終投与の翌日に剖検を行った。動物はネンブタール麻酔下で放血屠殺した。精囊、前立腺 (腹部)、陰茎龟头および球海綿体筋 + 肛門拳筋を摘出し、それらの湿重量を測定した。これらの臓器重量の変化は体重 100g 当たりの臓器重量として表示した。

4. 統計処理

数値は平均値 \pm 標準偏差で表した。各試験でそれぞれの対照群と各試験薬物投与群との有意差は Bartlett 検定で差がない場合は Dunnett 法によって、分散に差がある場合は順位による Dunnett 法によって検定した。また、各試験の対照群と試験薬物投与群以外の群との有意差は Student-*t* 検定により行った。

実験結果

1. 未成熟雌ラットを用いた子宮肥大試験

SD系およびF344系雌ラットにBPAを投与すると、1,000mg/kg投与群で投与1日目から自発運動の減少がみられた。SD系雌ラットでは1,000mg/kg投与群で2日目に1例の死亡がみられた。

子宮重量の変化に関して、SD系およびF344系雌ラットの1,000mg/kg群で子宮重量に有意な増加が認められた (Fig. 1)。Eを投与した陽性対照群では、いずれの系統のラットでも子宮重量は有意に増加した (Fig. 1)。なお、組織学的にSD系ラットおよびF344系ラットともに1,000mg/kg投与群で子宮内膜上皮の肥厚および子宮腺の増生がみられた。また、同様の所見は陽性対照群の子宮でもみられた。

2. 卵巣摘出した成熟雌ラットを用いたBPAの子宮肥大試験

SD系およびF344系雌ラットにBPAを投与しても、いずれの群でも特記すべき一般状態の変化はみられなかった。

子宮の重量変化は両系統の雌ラットともに2 mg/kg群では対照群と有意差がなかったが、20mg/kg以上の投与量で有意な増加がみられた (Fig. 2)。また、両系統ラットの陽性対照群の子宮重量が有意に増加した

(Fig. 2)。なお、SD系ラットおよびF344系ラットともに20mg/kgおよび200mg/kg群で組織学的に子宮内膜上皮の肥厚および子宮腺の増生がみられた。また、陽性対照でも同様の所見が観察された。

3. アンドロゲン活性試験

6週齢群および10週齢群の去勢ラットにTPを投与しても、いずれの群でも特記すべき一般状態の変化はみられなかった。

精嚢重量は去勢により6週齢群および10週齢群でそれぞれの無処置動物に比べて著明に減少した (Fig. 3)。これらの去勢ラットにTPを投与すると、6週齢群のTP0.3mg/kg投与群で対照群に比べて有意に増加した。一方、10週齢群ではTP0.1mg/kg以上の投与量で有意な増加がみられた (Fig. 3)。なお、両週齢ともにTP投与により組織学的に精嚢の萎縮性変化が軽減あるいは消失した。

前立腺重量も去勢により両週齢群で無処置動物に比べて著明に減少した (Fig. 3)。6週齢群ではTP0.3 mg/kgの投与により前立腺重量は対照群と比べて有意に増加した。一方、10週齢群ではTP 0.1mg/kg以上で有意に増加した (Fig. 3)。なお、両週齢ともにTP投与により組織学的に前立腺の萎縮性変化が軽減あるいは消失した。

陰茎龟头重量も去勢により両週齢群で減少した

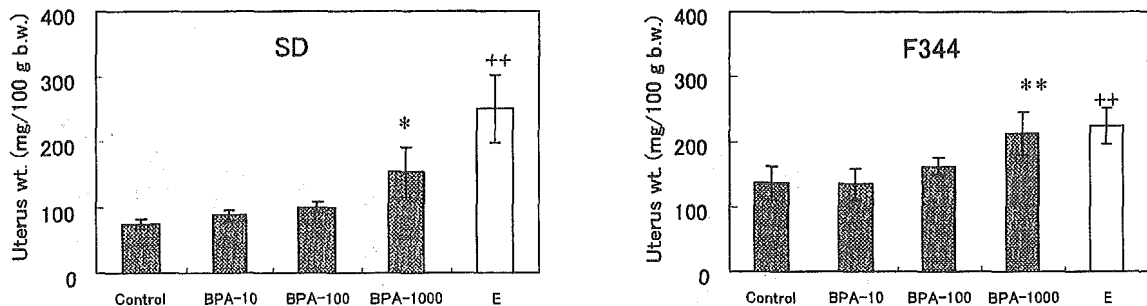


Fig. 1 Effects of bisphenol A (BPA) on the relative organ weights of uterus in immature Sprague-Dawley (SD) and F344 rats. Female rats at 17 days of age were treated with BPA (10, 100 and 1000 mg/kg, s.c.) and estradiol dipropionate (E: 0.01 mg/kg, s.c.) for 3 days. *: $p < 0.05$ (vs. control). **, ++: $p < 0.01$ (vs. control).

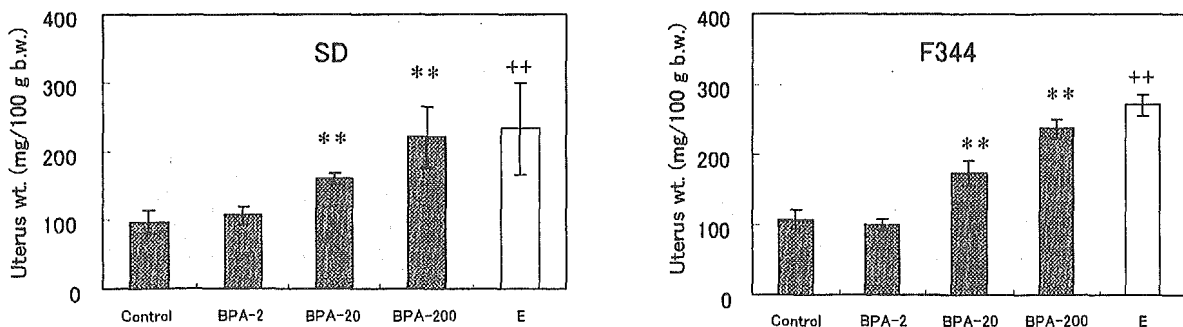


Fig. 2 Effects of bisphenol A (BPA) on the relative organ weights of uterus in ovariectomized Sprague-Dawley (SD) and F344 rats. Female rats were ovariectomized at 8 weeks of age. The female after 7 days of ovariectomy were treated with BPA (2, 20 and 200 mg/kg, s.c.) and estradiol dipropionate (E: 0.005 mg/kg, s.c.) for 6 days. **, ++: $p < 0.01$ (vs. control).

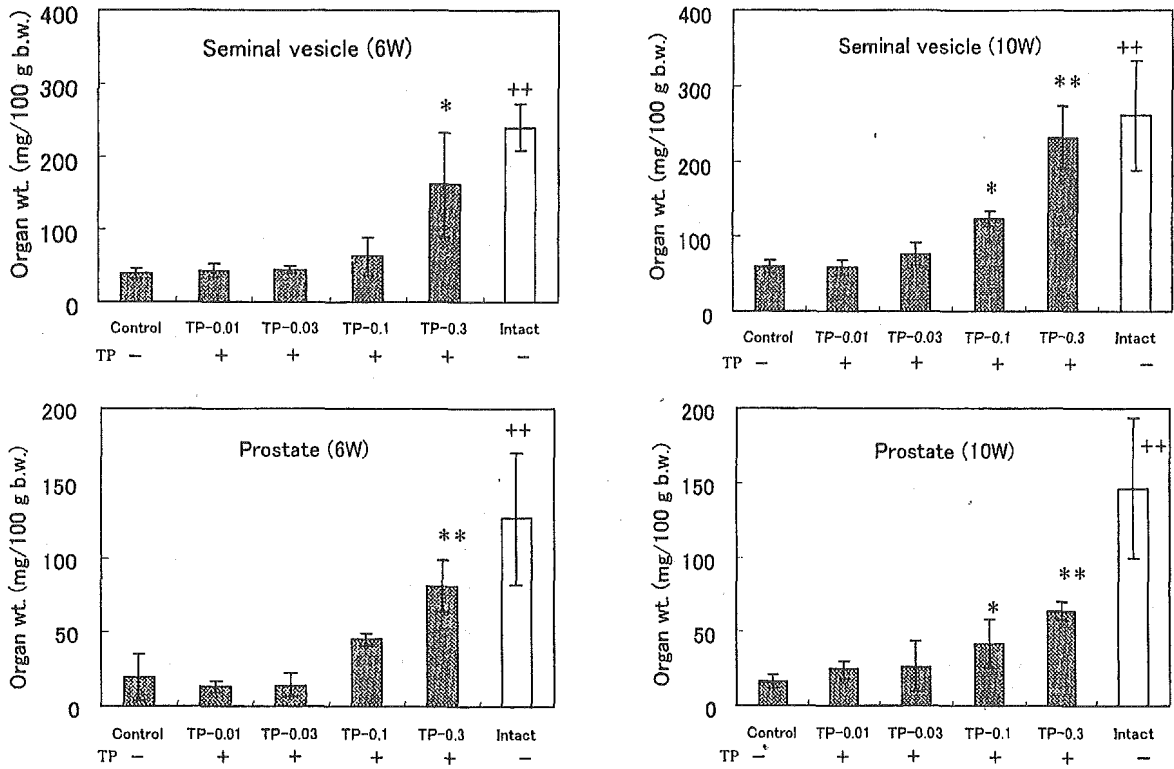


Fig. 3 Effects of testosterone propionate (TP) on the relative organ weights of seminal vesicle and ventral prostate in castrated rats. Male rats were castrated at 6 weeks of age (6W) and 10 weeks of age (10W). The male rats after 7 days of castration were treated with TP (0.01, 0.03, 0.1 and 0.3 mg/kg, s.c.) for 7 days. *: $p < 0.05$ (vs. control). **: $p < 0.01$ (vs. control). ++: $p < 0.01$ (vs. control).

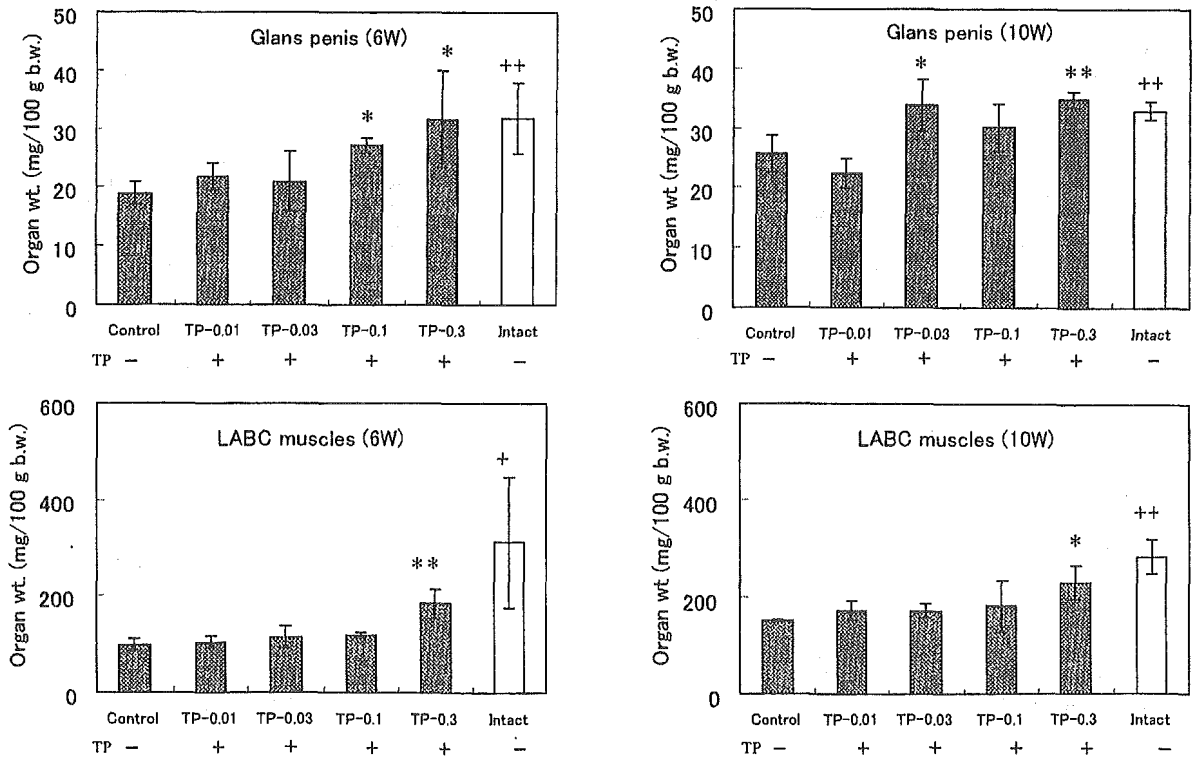


Fig. 4 Effects of testosterone propionate (TP) on the weights of glans penis and the combined lavator ani and bulbocavernosus (LABC) muscles in castrated rats. Male rats were castrated at 6 weeks of age (6W) and 10 weeks of age (10W). The male rats after 7 days of castration were treated with TP (0.01, 0.03, 0.1 and 0.3 mg/kg, s.c.) for 7 days. (*, +: $p < 0.05$ (vs. control). **, ++: $p < 0.01$ (vs. control)).

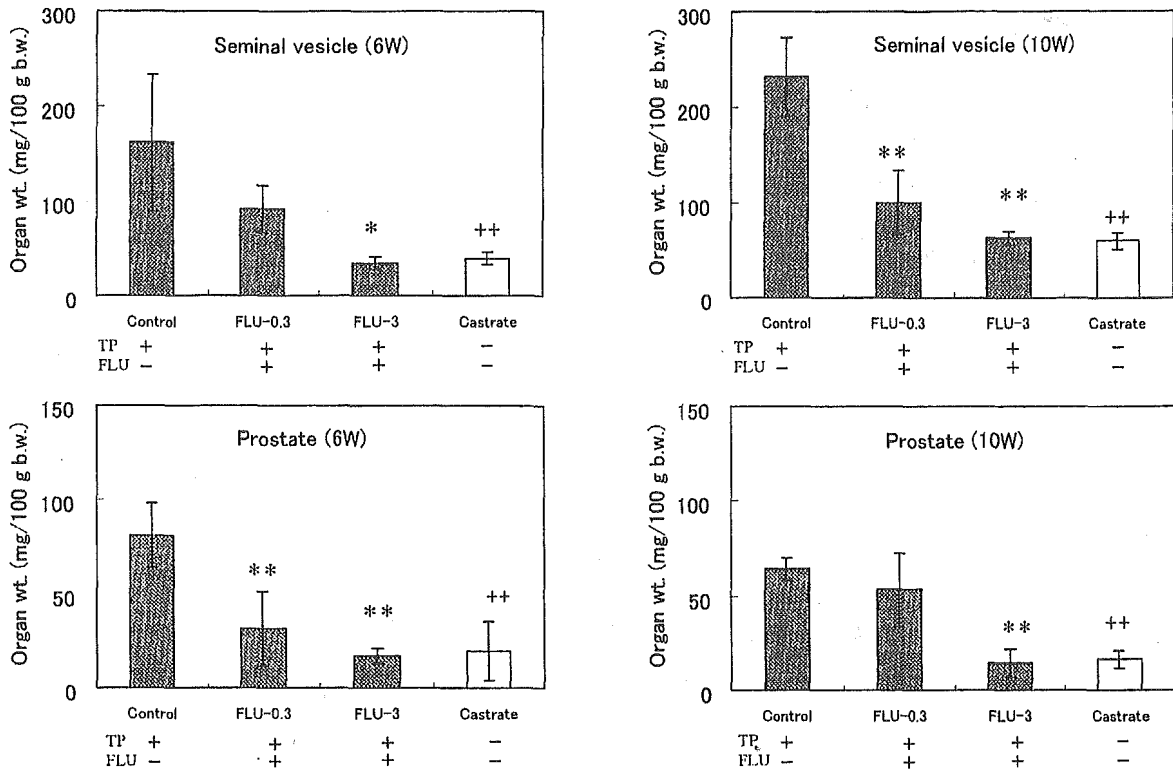


Fig. 5 Effects of flutamide (FLU) on the weights of seminal vesicle and ventral prostate in TP-treated castrated rats. Male rats were castrated at 6 weeks of age (6W) and 10 weeks of age (10W). The male rats after 7 days of castration were treated with both TP (0.3 mg/kg, s.c.) and FLU (0.3 and 3 mg/kg) for 7 days. *: $p < 0.05$ (vs. control). **, ++: $p < 0.01$ (vs. control).

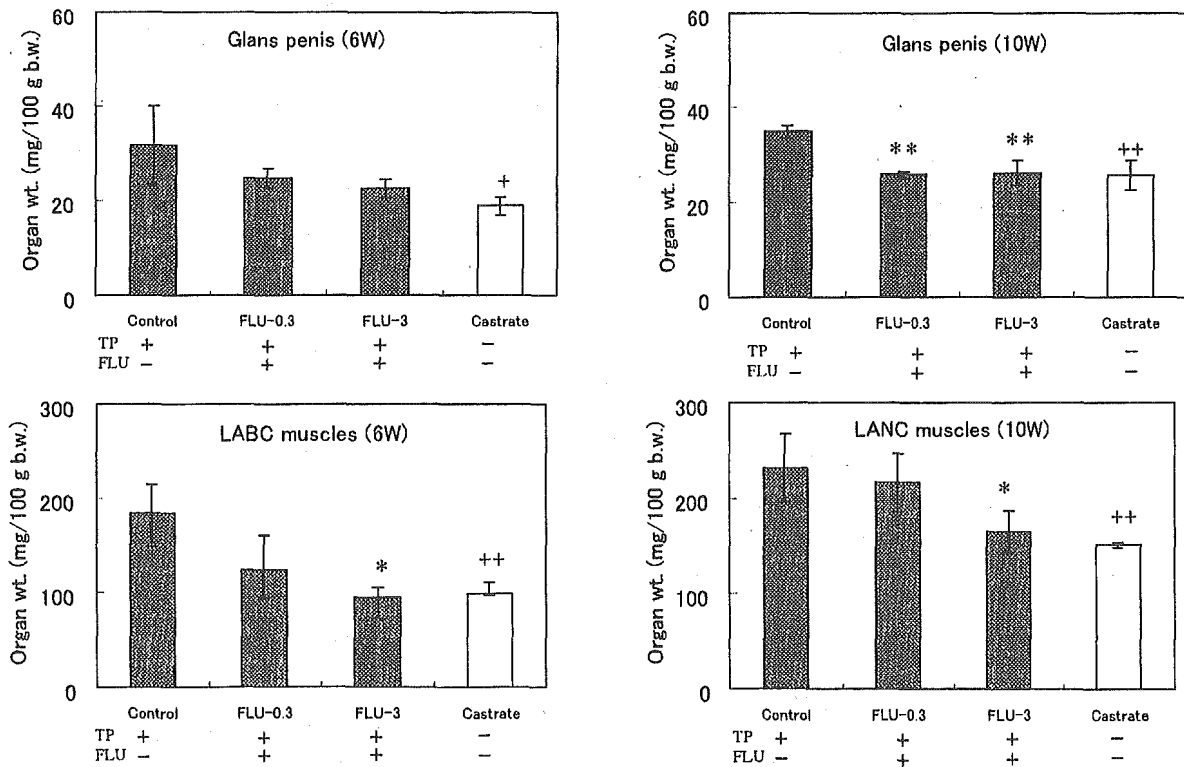


Fig. 6 Effects of flutamide (FLU) on the weights of glans penis and the combined lavator ani and bulbocavernosus (LABC) muscles in TP-treated castrated rats. Male rats were castrated at 6 weeks of age (6W) and 10 weeks of age (10W). The male rats after 7 days of castration were treated with both TP (0.3 mg/kg, s.c.) and FLU (0.3 and 3 mg/kg) for 7 days. *, +: $p < 0.05$ (vs. control). **, ++: $p < 0.01$ (vs. control).

(Fig. 4). TPを投与すると、6週齢群ではTP0.1 mg/kg以上の投与量で対照群に比べて有意な増加がみられた (Fig. 4). 10週齢群ではより低用量のTP0.03 mg/kgでも有意な増加がみられた。しかし、0.1 mg/kgでは有意差がなかったが増加傾向が、TP0.3 mg/kgでは有意な増加がみられた (Fig. 4)。

肛門挙筋+球海綿体筋重量は去勢により両週齢群で無処置動物に比べて著明に減少した (Fig. 4)。これらの去勢動物にTPを投与すると、6週齢群および10週齢群ともにTP0.3mg/kgの投与量のみで対照群と比べて有意に増加した (Fig. 4)。

4. 抗アンドロゲン活性試験

6週齢群および10週齢群の去勢ラットにFLUを投与しても、いずれの群でも特記すべき一般状態の変化はみられなかった。

両週齢ともにTPによる精嚢重量の増加作用はFLU投与により抑制され、6週齢群で高用量のFLU (3 mg/kg) のみに有意な抑制がみられた。一方、10週齢群でより低用量のFLU (0.3mg/kg) でも有意に抑制された (Fig. 5)。

TPによる前立腺重量の増加作用はFLU投与により抑制され、6週齢群ではFLU0.3mg/kgの投与量で有意に抑制された。しかし、10週齢ではFLU 3 mg/kgの投与量のみ有意差がみられた (Fig. 5)。

陰莖亀頭重量に関して、6週齢群ではTP投与による陰莖亀頭実重量の増加作用は、FLU投与によっても有意な抑制がみられなかった。一方、10週齢群では低用量 (0.3mg/kg) のFLU投与で有意な抑制がみられた (Fig. 6)。

TPによる肛門挙筋+球海綿体筋重量の増加作用は両週齢群ともに高用量 (3 mg/kg) のFLU投与のみで有意に抑制された (Fig. 6)。

考 察

1. 子宮肥大試験

本研究では、BPAの投与期間が異なるものの8週齢で卵巣摘出した雌ラットを用いた子宮肥大試験は17日齢の未成熟雌ラットを用いた試験よりBPAに対する感度が高いことがわかった。AshbyとTinwell²⁾はBPAの子宮肥大作用は未成熟マウスよりも未成熟ラットで強くみられるが、21-22日齢の未成熟ラットへのBPA400 mg/kgの3日間皮下投与により子宮肥大作用がみられることを報告している。一方、Goloubkovaら³⁾は9週齢で卵巣摘出したWistar系ラットを用いた7日間皮下投与による子宮肥大試験で低用量のBPA (11mg/kg) により子宮肥大作用を検出している。本研究でも8週齢で卵巣摘出したSD系およびF344系雌ラットに低用量 (20mg/kg) のBPAを6日間皮下投与することにより子宮肥大作用がみられた。今回の試験で得られた最低作用量20mg/kg

はGoloubkovaらの報告した作用用量にほぼ匹敵する量であり³⁾、8週齢で卵巣摘出したSD系およびF344系ラットにおけるBPAのエストロゲン作用の検出感度は高いと考えられた。

BPAをF344系ラットに投与すると下垂体からのプロラクチンの分泌促進作用があることが報告されている⁴⁾。しかしこのプロラクチン分泌促進作用はSD系ラットではみられないことから、BPAの作用はラットの系統差により差異がある⁴⁾。しかし、本研究で卵巣摘出したSD系およびF344系成熟ラットいずれもBPAによる子宮肥大作用がほぼ同程度あることおよび卵巣摘出した成熟Wistar系ラットを用いた子宮肥大試験⁵⁾から、卵巣摘出した成熟ラットにおけるBPAの子宮肥大作用にはラットの系統差による差異がないと考えられた。

本研究で17日齢の未成熟ラットにBPAを3日間皮下投与すると、1,000mg/kg投与により両系統のラットに一般状態の変化がみられ、特にSD系ラットでは死亡例がみられた。したがって、未成熟ラットで1,000mg/kgは毒性影響を及ぼす用量であると推定された。

BPAによる子宮肥大作用の最大無作用量に関して、Goloubkovaら³⁾が7日間皮下投与したとき卵巣摘出成熟ラットで11mg/kgで子宮肥大作用を検出したが、最大無作用量を求めている。しかし本研究の結果から、その最大無作用量は2 mg/kgと推定された。一方、信原ら⁷⁾が21日齢の未成熟SD系雌ラットにBPA40および400mg/kgを3日間皮下投与すると40mg/kgで子宮肥大作用がみられなかったことから、未成熟ラットでの最大無作用量は40mg/kgと推定される。なお、今回の試験から得られたBPAの子宮肥大作用の最低作用量は20mg/kgと推定され、ジプロピオン酸エストラジオールの作用発現量 (0.005mg/kg) と比較するとBPAは1/4,000となり、BPAのエストロゲン作用としての子宮肥大作用は非常に弱いものである。

2. Hershberger試験

Hershberger試験では化学物質に関するアンドロゲン作用の検出および抗アンドロゲン作用の検出のための2つの試験系が採用されている⁵⁾。すなわち、化学物質によるアンドロゲン作用のための試験系および化学物質による抗アンドロゲン作用のための試験系である。前者の試験系では去勢雄ラットに外因性化学物質のみを投与し、後者の試験系ではテストステロンと外因性化学物質を併用投与する。両試験系ともに外因性化学物質の投与後に生殖器等への影響を調べて、化学物質のアンドロゲン作用あるいは抗アンドロゲン作用を評価するものである。雄ラットを去勢すると精巣からのアンドロゲンの分泌が遮断され、アンドロゲンに依存している生殖器などに直

接的な影響がみられる。本研究でも、精囊、前立腺、陰茎亀頭および肛門挙筋+球海綿体筋重量は両週齢ラットで去勢処置によりいずれも著明に減少した。従って、これら臓器の重量変化はアンドロゲンおよび抗アンドロゲン作用に関わるパラメーターとして適当であると考えられた。

本研究のアンドロゲン活性試験から、精囊、前立腺および陰茎亀頭のTPに対する感受性は10週齢で去勢した雄ラットは6週齢で去勢したラットに比べてより高いことが明らかとなった。しかし、肛門挙筋+球海綿体筋への作用に週齢による差がみられなかった。このように去勢を行った週齢によりTPに対する生殖器等の感受性に差があることが明らかとなった。6週齢の雄ラットは精巣下降が完了し精巣で精子が産生され、アンドロゲンの産生が開始する時期の動物である。10週齢の雄ラットではほぼ性成熟が完了した時期の動物である⁸⁾。このような性成熟の程度の違いが週齢によるTPのアンドロゲン活性の差異に関係していると考えられる。

本研究において、最もTPに対して感受性が高かったパラメーターとして10週齢群でTP0.03mg/kg投与による陰茎亀頭重量の増加が挙げられる。佐藤ら⁹⁾は、9週齢で去勢したSD系雄ラットを用いて本研究と同様のアンドロゲン活性試験を実施し、TP0.03 mg/kg (7日間皮下投与)の投与量で精囊や前立腺の重量増加がみられたことを報告している。一方、本研究で6週齢群はTP0.03mg/kgの投与量ではいずれのパラメーターにも変化がみられなかった。これらの所見から、化学物質のアンドロゲン活性の有無や程度を調べるためのHershberger試験に10週齢(あるいは9週齢)で去勢した雄ラットを用いる方が6週齢よりも良好な感度が得られると考えられる。

本研究の抗アンドロゲン活性試験で、週齢によりFLUによる生殖器などへの影響が異なっていた。すなわち、FLUによる精囊および陰茎亀頭への作用は10週齢群の方がより低用量で、一方前立腺への影響は6週齢の方がより低用量で影響がみられた。しかし、肛門挙筋+球海綿体筋への影響は週齢による差がみられなかった。精囊と前立腺に関しては、それらの成長と分化をコントロールするアンドロゲン類が異なり、精囊は主にテストステロンに依存しているが、前立腺ではテストステロンからデヒドロテストステロン(DHT)への還元酵素である5 α -レダクターゼの関与があり、前立腺の成長と分化はDHTに依存している¹⁰⁾。6週齢群および10週齢群の前立腺における5 α -レダクターゼ活性に差異があるかどうかは不明であるが、精囊および前立腺における異なるアンドロゲン類の依存性が週齢によるFLUに対する感受性の差異に反映している可能性があると考えられた。

FLUによる精囊および前立腺への影響は、いずれの週齢群においても組織学的に萎縮性変化であった。これらの所見はViguiet-Martinezら¹¹⁾がFLUを雄ラットに投与したときの組織学的変化と一致しており、FLUによる精囊および前立腺重量の減少は抗アンドロゲン作用によるものと判断された。

Hershberger試験に用いるラットに関して、その系統により感受性の差異があることが報告されている。Yamasakiら¹²⁾はF344系ラット、SD系ラットおよびWistar系ラットでFLUの抗アンドロゲン作用に系統による感受性に差異があり、SD系ラットがFLUの抗アンドロゲン作用に対して感度がよいことを報告している。本研究ではFLUに対する抗アンドロゲン作用に感受性の高いSD系ラットを用いたが、去勢時の週齢によってその感受性に差異があることがわかった。これらの所見から、Hershberger試験に用いるべき系統や週齢などについてより慎重に選択する必要があると考えられる。

まとめ

化学物質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。子宮肥大試験には未成熟ラットあるいは卵巣摘出した成熟雌ラットが用いられるが、これらの動物における感度については明確にされていない。そこで、17日齢のSD系およびF344系雌ラットを用いてBPA(10~1,000mg/kg)を3日間皮下投与した子宮肥大試験を、また8週齢で卵巣を摘出したSD系およびF344系雌ラット用いてBPA(2~200mg/kg)を6日間皮下投与した子宮肥大試験を実施した。未成熟雌ラットではBPA1,000mg/kgを投与したときのみに子宮肥大作用がみられたが、卵巣摘出した成熟雌ラットではBPA20mg/kg以上を投与すると子宮肥大作用がみられた。従って、卵巣摘出した成熟雌ラットのBPAによる子宮肥大作用は未成熟ラットよりも検出感度が高いことがわかった。

他方、化学物質のアンドロゲン作用および抗アンドロゲン作用に関する*in vivo*スクリーニング法としてHershberger試験が知られている。しかし、異なる週齢の雄ラットにおけるアンドロゲン活性および抗アンドロゲン活性の差異は明確にされていない。そこで、6週齢あるいは10週齢で精巣を摘出したSD系去勢雄ラットを用いて、TP(0.01~0.3mg/kg)およびFLU(0.3および3mg/kg)を7日間連続皮下投与し、異なる週齢で去勢した雄ラットにおけるTPのアンドロゲン活性およびFLUの抗アンドロゲン活性の比較を行った。その結果、6週齢および10週齢で去勢した雄ラットにおけるTPのアンドロゲン作用およびFLUの抗アンドロゲン作用に差異がみられ、Hershberger試験に用いる動物として10週齢で去勢雄

ラットの方がより感度が高いことがわかった。

参考文献

- 1) Carlen, E., Giwerman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N.E.: Evidence for decreasing quality of semen during 50 years. *Br. Med. J.*, 305, 609-613 (1992)
- 2) Ashby, J. and Tinwell, H.: Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat. *Environ. Health Perspect.*, 106, 719-720 (1998)
- 3) Goloubkova, T., Ribeiro, M.F., Rodrigues, L.P., Ceconello, A.L. and Spritzer, P.M.: Effects of xenoestrogen bisphenol A on uterine and pituitary weight, serum prolactin levels and immunoreactive prolactin cells in ovariectomized Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, 74, 92-98 (2000)
- 4) Steinmetz, R., Brown, N.G., Allen, D.L., Bigsby, R.M. and Ben-Jonathan, N.: The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinol.*, 138, 1780-1786 (1997)
- 5) Hershberger, L.E., Shipley, E.G. and Meyer, R. K.: Myotrophic activity of 19-nontestosterone and other steroids determined by modified levator anti muscle method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 83, 175-180 (1953)
- 6) OECD: Rodent Hershberger Screening Assay. Second Meeting of the Validation Management Group on Screening Testing for Endocrine Disruptors (Mammary Effects). (2000)
- 7) 信原陽一, 平野 哲, 東幸雄, 伊藤勝廣, 大野克利, 田中和永, 松代創一朗, 櫻井敬展, 塩澤 聡, 千葉 勝, 山田敏広: スチレンオリゴマーの内分泌攪乱作用に関する生物学的評価. *食衛誌*, 40, 36-45 (1999)
- 8) 日本実験動物協会編: “実験動物の基礎と技術”, p.91-99, 丸善, 東京 (1988)
- 9) 佐藤徹哉, 片山誠一, 永井賢司, 涌生ゆみ, 飯塚宏美: 去勢成熟ラットを用いた (抗) アンドロゲン活性の評価. 日本内分泌攪乱化学物質学会第二回研究会要旨集, p.82 (1999)
- 10) Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V.C.: “原書24版ハーパー・生化学 (監約, 上代淑人)”, p.604-619, 丸善, 東京 (1996)
- 11) Viguier-Martinez, M.C., Hochereau de Reviers, M.T., Barenton, B. and Perreau, C.: Effect of a non-steroidal antiandrogen, flutamide, on the hypothalamo-pituitary axis, genital tract and testis in growing male rats: endocrinological and histological data. *Acta Endocrinol.*, 104, 299-306 (1983)
- 12) Yamasaki, K., Sawaki, M. and Takatsuki, M.: Strain sensitivity differences in the Hershberger assay. *Reproduct. Toxicol.*, 15, 437-440 (2001)

抗菌剤 zinc bis (2-pyridylthio-1-oxide) のラットにおける催奇形性試験

清水 充, 山野哲夫, 野田 勉

Teratological study of antimicrobial agent zinc bis (2-pyridylthio-1-oxide)
in Wistar rats

Mitsuru SHIMIZU, Tetsuo YAMANO, Tsutomu NODA

Abstract

Pregnant Wistar rats were treated orally with an antimicrobial agent, zinc bis (2-pyridylthio-1-oxide) (ZPT), from day 7 through 17 of gestation at doses of 0, 2.7, 8 and 24 mg/kg, and caesarian sections were performed on day 20 of gestation.

Reductions in maternal body weight gain, food intake, adjusted body weight gain, and gravid uterus weights were seen at doses of 8 and/or 24 mg/kg. In addition, dams in groups treated with 8 and 24 mg/kg exhibited hind-leg paralysis. Incidence of dead or resorbed fetuses was increased and the number of living fetuses was decreased at 24 mg/kg. Fetal body weights in groups treated with 8 and 24 mg/kg were significantly lower than those of fetuses from control dams. There were no gross or soft tissue abnormalities in fetuses from the dams treated with ZPT. However, there were significant increases in the incidence of skeletal malformations, such as absence of ribs, fused ribs, absence of thoracic vertebral arches and fused thoracic vertebral arches in fetuses from dams treated with 8 and 24 mg/kg. Moreover, there were significant increases in the incidence of skeletal variations in fetuses from dams treated with 8 and 24 mg/kg. However, no adverse effects on skeletal development were observed in fetuses from dams treated with 2.7 mg/kg.

These findings indicate the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for maternal and developmental toxicity to be 2.7 mg/kg/day.

Key words: zinc bis (2-pyridylthio-1-oxide), maternal toxicity, fetal toxicity, teratology, rat

緒 言

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、使用されている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な問題である。zinc bis (2-pyridylthio-1-oxide) (ZPT) はフケ取りシャンプーや化粧品あるいは船底塗料などの抗菌剤として使用されている。ZPTの催奇形性に関して、NolenとDierckman¹⁾はZPTを妊娠ラットの妊娠6-15日に経口投与した催奇形性試験において、胎児の肋骨癒合、肋骨分枝などの骨格奇形がみられることを報告した。さらに、Goka²⁾は魚類のゼブラフィッシュおよびメダカを用いたearly-life-stage toxicity testでZPT処置により両種のサカナの背骨に骨格形成異常

が発生することを報告した。しかし、ウサギあるいはブタを用いた経口または経皮投与による催奇形性試験で奇形の発生は認められていない^{1,3,4)}。

そこでZPTの安全性再評価のために、ラットを用いてZPTの器官形成期投与による催奇形性試験を実施した。

実験方法

1. 試験薬物

zinc bis (2-pyridylthio-1-oxide) (ZPT: 東京化成工業(株); Fig. 1)

純度: > 98%, 分子量: 317.7, CAS: 13463-41-7

2. 使用動物

雌雄とも生後4週齢のJcl:Wistar系ラットを購入

大阪市立環境科学研究所

〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences,

8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

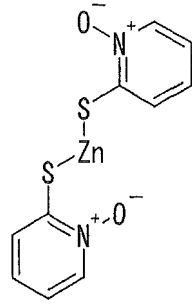


Fig. 1 zinc bis(2-pyridylthio-1-oxide)
(ZPT)

し、予備飼育ののち生後12週齢から試験に供した。妊娠動物を得るために、未経産の雌を雄と1対1で同居させた。その後、毎朝膈垢を鏡検し、精子の確認された雌を妊娠動物とし、その日を妊娠0日と起算した。精子の確認されなかった雌は5日を限度として雄と同居させた。1群の妊娠動物数は20匹とした。動物は温度 23 ± 2 °C、点燈時間7時から19時の環境下で飼育した。予備飼育および試験期間中はオリエンタル固形飼料NMFを与え、飲料水として水道水を自由に摂取させた。

3. 催奇形性試験

3-1 投与量および投与方法

本試験における投与量を設定するために、1群当たり3～4匹のJcl:Wistar系妊娠ラットを用いて、妊娠動物の器官形成期(妊娠7-17日)にZPTを1日1回強制経口投与した後、妊娠20日に胎児の外表を観察した。投与量は0、1、3、30、45、60 mg/kgとして合計6群を設けた。その結果、いずれの投与群も妊娠動物の途中死亡はなかったが、妊娠動物の体重増加量は30 mg/kg以上の投与群で減少し、また摂餌量も30 mg/kg以上の投与群で減少した。30 mg/kg以上の投与群では妊娠8あるいは9日以降全例に自発運動の減少および後肢麻痺が認められた。これらの症状は投与終了翌日(妊娠18日)以降に軽減あるいは消失した。一方、3 mg/kg以下の投与群には一般状態に全く異常は認められなかった。妊娠20日の観察における母獣および胎児への影響として、45および60 mg/kg群のすべての妊娠動物で1腹全ての胎児が死亡し、30 mg/kg群でも4例中1例で1腹全ての胎児が死亡した。さらに、30 mg/kg群で生存胎児数の減少および生存胎児体重の減少が、さらに母獣の胃重量と脾重量の増加がみられた。しかし、3 mg/kg以下の母獣および胎児への影響はみられなかった。外表観察においてZPTによると考えられる奇形は認められなかった。

予備試験において30 mg/kgの投与用量では母獣の体重増加量と摂餌量の減少、胃と脾重量の増加が認められ、妊娠中に1腹全ての胎児が死亡した妊娠動物は4例中1例であることから、本試験の最高投与量として

は毒性影響が強すぎると考えられた。一方、3 mg/kgの投与量では母獣および胎児に毒性影響がみられなかった。そこで、本試験の最高投与量を24 mg/kgとした。さらに中間用量を8 mg/kgとし、母獣および胎児に毒性影響がみられない投与量を検索するための低用量群として2.7 mg/kg群を設けた。投与期間は妊娠7日から妊娠17日までの器官形成期とした。投与に際してはZPTを所定の濃度になるように局方オリブ油(投与液量2 ml/kg)に溶解または懸濁し、毎日の体重を基に投与液量を計算して1日1回経口ゾンデを用いて強制経口投与した。対照群には局方オリブ油2 ml/kgを同様に強制経口投与した。

3-2 観察

妊娠動物について、毎日体重および摂餌量を測定するとともに一般状態を観察した。

妊娠20日に動物をエーテル麻酔により致死せしめ、ただちに開腹して主要臓器を肉眼的に観察したのち、妊娠動物の胃、脾臓と妊娠子宮重量を測定したほか、黄体数、着床数、生存胎児数、早期死亡胎児数(着床痕、胎盤遺残)および後期死亡胎児数(浸軟胎児、死亡胎児)を調べた。生存胎児については体重測定を行い、性別および外表異常の有無を調べた。また、妊娠期間中の母獣の体重増加量から妊娠子宮重量を差し引いて調整体重増加量を算出した。各母体あたり約半数の生存胎児については95%エタノールで固定した後Dawson法⁵⁾に従いalizarin red Sによる骨格染色を行い、骨格異常の有無と化骨進行度(胸骨核化骨数、前肢指骨化骨数、後肢趾骨化骨数および腰椎後椎骨化骨数)を調べた。残りの約半数の生存胎児はBouin液で固定後、Wilson法⁶⁾に従って内臓異常の有無を調べた。

3-3 統計処理

体重増加量、摂餌量、臓器重量、妊娠子宮重量、調整体重増加量、妊娠黄体数、着床数および生存胎児数についてはBartlettの検定⁷⁾により等分散の場合はDunnett法⁸⁾を用いて、不等分散の場合はSteel法⁹⁾を用いてZPT投与群と対照群の間の有意差を検定した。生存胎児体重および化骨進行度については1腹を標本単位として計算し、Bartlettの検定により等分散の場合はDunnett法を用いて、不等分散の場合はSteel法を用いてZPT投与群と対照群の間の有意差を検定した。死亡・吸収胎児頻度、骨格奇形頻度、骨格変異頻度および内臓変異頻度についてはSteel法を用いてZPT投与群と対照群の間の有意差を検定した。性比、骨格奇形胎児数、骨格変異胎児数および内臓変異胎児数については χ^2 検定法を用いてZPT投与群と対照群の間の有意差を検定した。なお、これらの有意差検定にはYukms社製のExcel95用アドインソフトであるStatLight#4・多群の比較およびStatLight #5・カテゴリック検定を用いた。

実験成績

1. 妊娠動物におよぼす影響

体重増加量は8および24mg/kg投与群で妊娠9～20日に抑制が認められた。しかし、2.7mg/kg投与群は対照群とほぼ同様な体重増加量の推移がみられた (Fig. 2)。

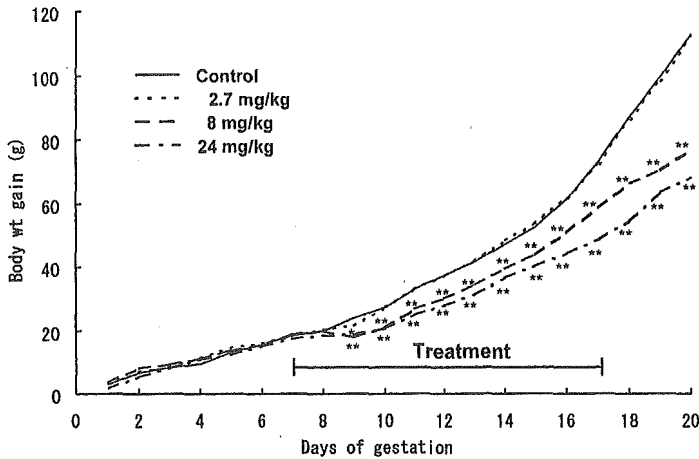


Fig. 2 Body weight gain of dams with living fetuses treated orally with ZPT
*Significantly different from control, $p < 0.05$
**Significantly different from control, $p < 0.01$

摂餌量に関して8mg/kg投与群で妊娠8～10日まで有意で急激な減少がみられ、妊娠11～12日に有意ではあるがやや回復傾向がみられた。その後妊娠16日まで対照群との間に有意差がみられなかった。しかし、妊娠17日以降から妊娠20日まで有意な減少が観察された。24mg/kg投与群でも妊娠8～11日まで有意で急激な減少がみられ、妊娠12日以降も有意な減少がみられた。妊娠19および20日には対照群と差がみられなかった。一方、2.7mg/kg投与群ではZPT投与による摂餌量への影響は認められなかった (Fig. 3)。

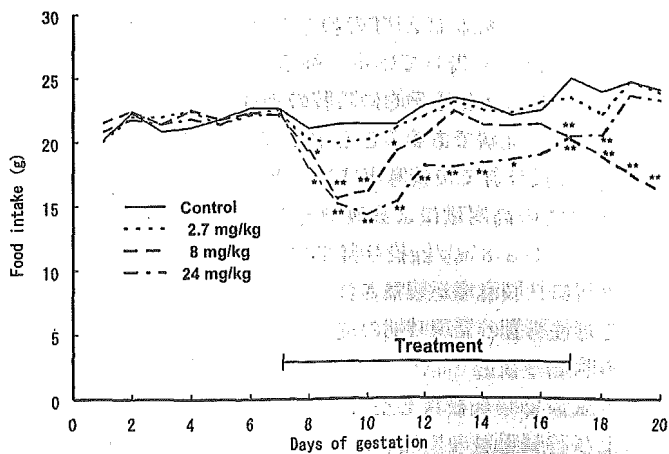


Fig. 3 Food intake of dams with living fetuses treated orally with ZPT
*Significantly different from control, $p < 0.05$
**Significantly different from control, $p < 0.01$

一般状態についていずれの投与群も妊娠動物の死亡例は認められなかった。8mg/kg投与群で妊娠8～10日にはほぼ全例に自発運動の減少がみられたが、妊娠11日にはほとんど症状は観察されなかった。しかし、妊娠16～17日にはほぼ全例に再度の自発運動の減少がみられ、妊娠18日以降に6例の母獣に腹ばい状態、後肢麻痺が観察され、妊娠20日まで続いた。24mg/kg投与群では妊娠8～9日に全例に自発運動の減少がみられ、さらに腹ばい状態および後肢麻痺が7例の母獣に観察された。腹ばい状態および後肢麻痺を示す母獣は10日以降も増加し、妊娠11～12日にはほぼ全例にこれらの症状が観察された。これらの症状は妊娠13日以降も観察されたが、投与終了翌日 (妊娠18日) 以降にはほぼ回復した。なお、妊娠9～15日に6例の母獣に下痢が単発的に観察された。一方、2.7mg/kg投与群には特記すべき変化は認められなかった。

妊娠20日に屠殺した妊娠動物の剖検では肉眼的に胸腔内および腹腔内臓器にとくに異常はみられなかったが、8および24mg/kg投与群で胃重量が有意に増加し、24mg/kg投与群で脾重量も有意に増加した。妊娠子宮重量は24mg/kg投与群で有意に減少し、調整体重増加量は8および24mg/kg投与群で有意に減少した (Table 1)。

2. 妊娠および胎児におよぼす影響

妊娠中に1腹全ての胎児が死亡した妊娠動物数は24mg/kg投与群で20例のうち7例も認められたが、2.7および8mg/kg投与群では1例もなかった。妊娠黄体数、着床数および性比にZPT投与による影響は認められなかった。死亡・吸収胎児頻度 (早期、後期) および生存胎児数は2.7および8mg/kg投与群でZPT投与による影響は認められなかった。しかし24mg/kg投与群で後期死亡胎児頻度が有意に増加し、生存胎児数も有意に減少した。生存胎児体重は8mg/kg投与群で雌雄ともに有意に軽く、24mg/kg投与群で雄が有意に軽かった (Table 2)。

胎児の外表面観察の結果、ZPTを投与したいずれの群も奇形は観察されなかった (Table 3)。

胎児の内臓観察でもZPTを投与したいずれの群も奇形は観察されなかった。内臓変異として対照群を含む各投与群で胸腺頸部残留、腎盂拡張および屈曲尿管が散見されたが、これらの発生頻度は対照群との間に有意差はなかった (Table 3)。

生存胎児の骨格観察では骨格奇形児頻度が8および24mg/kg投与群で有意に増加した。それらの内訳として、8mg/kg投与群では胸椎弓欠損、肋骨癒合および肋骨欠損がみられた骨格奇形胎児数が有意に増加した。さらに有意な差はなかったが、胸椎弓癒合、肋骨短小がみられた奇形児も観察された。24mg/kg投与群では胸椎弓癒合、胸椎弓欠損、肋骨癒合および肋骨欠損がみられた骨格奇形胎児数が有意に増加し、有意な

Table 1. Effects of ZPT on organ weights, gravid uterus weights and adjusted body weight gain in pregnant rats.

	Olive oil (2ml/kg)	ZPT (mg/kg)		
		2.7	8	24
No of dams with living fetuses	20	20	20	13
Stomach wt. (g)	1.46 ± 0.14	1.52 ± 0.11	1.67 ± 0.10 **	1.85 ± 0.15 **
Spleen wt. (mg)	660 ± 51	705 ± 64	678 ± 137	974 ± 131 **
Gravid uterus wt. (g)	71.2 ± 14.3	74.1 ± 11.3	67.2 ± 14.3	34.7 ± 24.4 **
Adjusted body wt. gain (g) ^a	41.9 ± 8.4	37.9 ± 9.0	9.9 ± 17.2 **	31.4 ± 9.8 *

Values are the means ± SD.

a (Body weight gain from day 0 to 20 of gestation) - (gravid uterus weight)

* Significantly different from control, p<0.05.

** Significantly different from control, p<0.01.

Table 2. Effects of ZPT on pregnant rats and their fetuses.

	Olive oil (2ml/kg)	ZPT (mg/kg)		
		2.7	8	20
No of pregnant females	20	20	20	20
No of dams with living fetuses	20	20	20	13
No of dams with total resorption	0	0	0	7
No of dead dams	0	0	0	0
No of corpora lutea	15.4 ± 1.5	16.4 ± 1.9	16.1 ± 1.6	15.5 ± 1.2
No of implants ^a	14.2 ± 2.8	15.3 ± 2.1	15.0 ± 2.5	13.2 ± 3.4
Incidence of dead or resorbed fetuses (%) ^b				
Early stage	5.6	5.8	5.6	24.7
Late stage	1.3	1.0	1.0	45.9 **
No. of living fetuses ^a	13.3 ± 3.1	14.3 ± 2.3	14.0 ± 2.6	4.2 ± 4.8 **
Sex ratio (M/F)	131/135	134/152	152/127	47/32
Body weight of living fetuses (g) ^{ac}				
Male	3.4 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.2 ± 0.4 *	3.1 ± 0.2 **
Female	3.2 ± 0.2	3.1 ± 0.2	3.0 ± 0.4 *	3.0 ± 0.2

^a Values are the means ± SD.

^b Means of ((No. of dead or resorbed fetuses)/(No. of implants) × 100)

^c Values represent means of litter means within each group.

* Significantly different from control, p<0.05.

** Significantly different from control, p<0.01.

差はなかったが肋骨短小がみられた奇形児も観察された (Table 3)。

骨格変異として胸骨開裂/不相称および腰肋痕が8および24 mg/kg投与群の胎児に多く見られ、これらの群の骨格変異発現率は対照群との間に有意差が認められた。また、観察した化骨進行度のうち胸骨核化骨数および前肢指骨化骨数が8 mg/kg投与群で有意に減少した (Table 3)。

考 察

本試験においてZPT投与による母獣への影響として、8および24mg/kgで母獣の一般状態の変化、体重増加量および摂餌量の減少、胃および脾臓重量の増加、さらに妊娠子宮重量の減少が観察された。したがって、これらの2用量は母獣に毒性影響を及ぼす用量と考えられた。一方、2.7mg/kg投与群では母獣への影響は認められなかった。

ZPTの母獣への影響として8および24mg/kg投与群で後肢麻痺がみられた。NolenとDierckman¹⁾も妊娠ラットに7.5および15mg/kgのZPTを投与すると母獣に後肢麻痺がみられたことを報告している。さらに、

ZPT投与による後肢麻痺はラットにおけるZPTの典型的な毒性影響として報告されている^{10,11)}。RossとLawhorn¹¹⁾は50 ppmZPT添加飼料でラットを14日間飼育したとき、投与8日目に後肢の握力が対照群に比べて有意に低下し、さらに12日目に前肢の握力も低下し、これらの症状はZPTの投与中止4～8日目に回復したことを報告している。彼らはZPT投与による後肢麻痺は電気生理学的に四肢の神経筋接合部の異常に関連した症状であることを示唆している¹¹⁾。なお、24mg/kg投与群で後肢麻痺は投与期間中全例に観察され、ZPTの高用量による典型的な毒性影響が認められた。しかし8 mg/kg投与群では投与終了翌日に数例の母獣に後肢麻痺が観察された。このような投与量による毒性影響の発現時期の違いに関する原因については不明である。

本試験で観察されたZPTの母獣への影響として胃および脾臓重量の増加もみられた。ZPTはマウスやウサギで皮膚刺激性があることが報告されており¹²⁾、経口投与されたZPTの直接的な刺激により胃重量の増加が引き起こされたものと考えられる。脾臓重量への影響に関して詳細は不明であるが、ZPTが生体内

Table 3. External, skeletal and visceral observations of fetuses from dams treated with ZPT on days 7-17 of gestation.

	Olive oil (2ml/kg)	ZPT (mg/kg)		
		2.7	8	24
<i>External observations</i>				
No. of fetuses examined	266	286	279	79
Incidence of fetuses with malformations (%) ^a	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Skeletal observations</i>				
No. of fetuses examined	142	151	150	45
Incidence of fetuses with malformations (%) ^a	0.0	0.0	10.0 **	71.7 **
No. of fetuses with malformations	0	0	15 (8) **	30 (10) **
Fusion of thoracic vertebral arches	0	0	3 (2)	7 (6) **
Absence of thoracic vertebral arches	0	0	8 (4) *	27 (10) **
Fusion of ribs	0	0	8 (4) *	16 (8) **
Shortness of ribs	0	0	2 (2)	1 (1)
Absence of ribs	0	0	9 (5) **	24 (9) **
Incidence of fetuses with variations (%) ^a	0.0	0.7	11.1 **	47.3 **
No. of fetuses with variations	0	1 (1)	17 (11) **	21 (9) **
Cleft or asymmetry of the sternbrae	0	0	5 (4)	12 (7) **
Rudimentary lumbar rib	0	1 (1)	12 (11) **	11 (7) **
Degree of ossification ^{b,c}				
No. of sternbrae	4.7 ± 0.5	4.6 ± 0.3	4.2 ± 0.9 *	4.2 ± 0.8
No. of proximal and middle phalanges				
Fore limb	3.6 ± 1.1	3.4 ± 0.4	3.1 ± 0.3 *	3.2 ± 0.4
Hind limb	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.0	3.9 ± 0.2	4.0 ± 0.1
No. of sacral and caudal vertebrae	7.0 ± 0.5	6.7 ± 0.4	6.4 ± 0.9	6.7 ± 0.8
<i>Visceral observations</i>				
No. of fetuses examined	124	135	129	34
Incidence of fetuses with malformations (%) ^a	0.0	0.0	0.0	0.0
Incidence of fetuses with variations (%) ^a	6.1	1.8	4.1	24.2
No. of fetuses with variations	7 (6)	2 (2)	6 (4)	4 (4)
Thymic remnant in the neck	1 (1)	0	0	0
Dilatation of renal pelvis	4 (4)	2 (2)	2 (2)	2 (2)
Kinked ureter	3 (3)	0	4 (3)	2 (2)

^a Means of (No. of fetuses with malformation or variation) / (No. of fetuses examined) × 100

^b These values represent means of litter means within each group.

^c Values are the means ± S.D.

() Number of conceived mothers with case.

*: Significantly different from control, p < 0.05

**: Significantly different from control, p < 0.01

の免疫系に影響をおよぼす可能性が考えられる。

ZPTの催奇形性に関してウサギにおけるZPTの経皮および経口投与による催奇形性試験¹³⁾およびブタにおける経皮投与による催奇形性試験⁴⁾で外表、内臓および骨格奇形の発現は報告されていない。一方、NolenとDierckman¹⁾はSD系ラットを用いて妊娠6～15日にZPTを経口投与した催奇形性試験において15mg/kg投与群で骨格奇形児数が有意に増加し、その内訳として肋骨欠損、肋骨分枝および肋骨癒合などの肋骨に関する奇形児数が有意に増加したことを報告している。さらに、7.5mg/kg投与群でも有意な差はないものの上記の肋骨奇形が観察されている。この催奇形性試験ではZPTの投与用量として7.5および15mg/kgの2用量を採用しているが、いずれの投与群でも母獣の妊娠0-15日の体重増加量が対照群よりも有意に減少し、両群ともに明らかな母獣に対する毒性影響がみられる。本試験では8および24mg/kg投与群の母獣で、体重増加量、摂餌量および調整体重増加量の有意な減少、胃および脾重量の有意な増加がみられ、これらの群で母獣に明らかな毒性影響がみられた。これらの群で骨格奇形頻度が有意に増加し、肋骨に関する奇形児数が有意に増加し、さらに胸椎に関する奇形児数の有意な増加も観察された。このように骨格奇形に関

して本試験結果とNolenとDierckman¹⁾の催奇形性試験の結果に若干の差異がみられたが、これは用いた動物の系統、投与期間あるいは投与用量の差異によるかもしれない。しかし、本試験で母獣に対する毒性影響がみられなかった2.7mg/kg投与群では骨格奇形児はまったく観察されなかった。すなわち本試験およびNolenとDierckman¹⁾の催奇形性試験の結果から、母獣に対する毒性影響がみられた投与用量のみに胎児に骨格奇形を誘発する可能性が示唆された。今後さらに、母獣に対する毒性影響と胎児の骨格奇形の誘発との関連性を明らかにするためにより詳細な検討が必要と考えられる。

ラット、ウサギ、サルおよびイヌに放射性同位元素で標識したZPTを経口投与するとZPTが消化管から吸収され、24時間で尿中に63～86%が排泄されることが報告されている¹³⁾。これらの動物にZPTを経口投与したとき、血清中の主な代謝物として2-(methylsulfonyl)pyridineが同定されている¹⁰⁾。一方、尿中の主な代謝物として、2-pyridinethiol-1-oxide-S-glucuronideおよび2-pyridinethiol-S-glucuronideなどが同定されているが、ラットでは他の動物とは異なり尿中に2-pyridinethiol-1-oxide-S-glucosideがほとんど検出されない¹³⁾。ZPTの生体内代謝における種差がラット

胎児のみに骨格奇形を発現することと関連性があるかもしれない。

本試験で検討した母獣および胎児におよぼす影響から、母獣および胎児に対する無毒性量 (NOAEL) はいずれも 2.7mg/kg/日と推定された。

結 論

ラットの器官形成期に ZPT 2.7、8 および 24mg/kg を強制経口投与した時の妊娠動物および胎児におよぼす影響を検討した結果、以下の結論を得た。

1. ZPTの投与により 8 および 24mg/kg投与群で妊娠動物の体重増加量が減少し、摂餌量も減少した。
2. 8 および 24mg/kg投与群で妊娠動物の胃重量が増加し、24mg/kg群で脾臓重量が増加した。8 および 24mg/kg投与群では調整体重増加量が減少し、24mg/kg投与群で妊娠子宮重量が減少した。
3. 24mg/kg投与群で胎児死亡頻度が増加し、生存胎児数が減少した。8 および 24mg/kg投与群で生存胎児重量が減少した。
4. 胎児の外表および内臓観察では ZPT投与に起因すると考えられる奇形は認められなかった。また内臓変異の発現頻度にも ZPTの影響は認められなかった。
5. 骨格観察において 8 および 24mg/kg投与群で骨格奇形の発生率が増加した。これらの骨格奇形として胸椎弓癒合、胸椎弓欠損、肋骨癒合、肋骨欠損が観察された。しかし、2.7mg/kg投与群では骨格奇形は認められなかった。骨格変異発現率も 8 および 24mg/kg投与群で増加した。

以上の実験結果から、本実験条件下において妊娠動物に対する NOAEL は 2.7mg/kg/日、胎児に対する NOAEL も 2.7mg/kg/日と推定された。

参考文献

- 1) Nolen, G.A. and Dierckman, T.A.: Reproduction and teratology studies of zinc pyrithione administered orally or topically to rats and rabbits. *Food Cosmet. Toxicol.*, 17, 639-649 (1979)
- 2) Goka, K.: Embryotoxicity of zinc pyrithione, an antidandruff chemical, in fish. *Environ. Res.*, 81, 81-83 (1999)
- 3) Nolen, G.A., Patrick, L.F. and Dierckman, T.A.: A percutaneous teratology study of zinc

pyrithione in rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 31, 430-433 (1975)

- 4) Wedig, J.H., Kennedy, G.L.Jr., Jenkins, D.H., Henderson, R. and Keplinger, M.L.: Teratologic evaluation of dermally applied zinc pyrithione on swine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 36, 255-259 (1976)
- 5) Dawson, A. B.: A note on the staining of the skeleton of cleared specimen with alizarin red S. *Stain Technol.*, 1, 123-125 (1926)
- 6) Wilson, J. G.: Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. "Teratology-principles and techniques." (Wilson, J.G., Warkany, J. eds) p. 262-277, University of Chicago Press, Chicago. (1965)
- 7) 吉村功, 大橋靖雄: バートレットの等分散検定, "毒性試験講座14・毒性試験データの統計解析", p.24-25, 地人書館, 東京 (1992)
- 8) 吉村功, 大橋靖雄: ダネットの多重比較, "毒性試験講座14・毒性試験データの統計解析", p.96-98, 地人書館, 東京 (1992)
- 9) 吉村功, 大橋靖雄: スチールの多重比較, "毒性試験講座14・毒性試験データの統計解析", p.102-104, 地人書館, 東京 (1992)
- 10) Gibson, W. B., Jeffcoat, A. R., Turan, T. S., Wendt, R. H., Hughes, P. F. and Twine, M. E.: Zinc pyridinethione: Serum metabolites of zinc pyridinethione in rabbits, rats, monkeys, and dogs after oral dosing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 62, 237-250 (1982)
- 11) Ross, J. F. and Lawhorn, G. T.: ZPT-related distal axonopathy: Behavioral and electrophysiologic correlates in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12, 153-159 (1990)
- 12) Landsdown, A.B.G.: Interspecies variations in response to topical application of selected zinc compounds. *Food Chem. Toxicol.* 29, 57-64 (1991)
- 13) Jeffcoat, A.R., Gibson, W.B., Rodriguez, P.A., Turan, T.S., Hughes, P.F. and Twine, M.E.: Zinc pyridinethione: Urinary metabolites of zinc pyridinethione in rabbits, rats, monkeys, and dogs after oral dosing. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 56, 141-154 (1980)

基礎講座 カビ検査法⑨

抗カビ試験

村松芳多子¹, 高鳥 浩介²

薬剤などの抗カビ評価を試験する場合には、薬剤及び抗カビ製品がどの程度カビに有効か調べることになる。抗カビ試験は試験法として単純であるが、具体的な試験操作になるといくつかの問題点を持つ。そこで、具体的な操作手順をしめしながら、それぞれのキーポイントを以下の図表にまとめた。特に重要な点は、カビの操作で、孢子液調製をどのようにするかであるとの成績に大きく影響を及ぼすことと、どのような試験が適しているかの判断である。さらに判定をどのように評価するかにある。ここでは抗カビ試験法の基本とそれぞれの重要なポイントを重点的にまとめた。

1. 孢子液作製

抗カビ試験には原則として孢子液を用いる。孢子液の調製は試験に特に影響することから慎重に行う。

<操作>

①前培養 (斜面, 平板) 25~30°C, 7~14日間



②界面活性剤*添加生理食塩液 (0.5~1 ml程度) を①の斜面または平板培地に静かに入れ、ゆっくりかつ十分ピペティングする (図1参照)。



③孢子 (菌糸) は目の粗い濾紙またはガーゼにより、試験管に集め、ヘモサイトメーター (改良型ノイバウエル血球計算盤) で孢子数を測定する。菌糸が多い場合は、滅菌ガーゼで濾過し、菌糸を除く (孢子の濾過に一定粒径のフィルターを用いることもある)。



④孢子数が $1 \sim 2 \times 10^6 / \text{ml}$ になるように調製する。

1)* 界面活性剤の種類と使用濃度

界面活性剤	使用濃度
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート	0.05~0.1%
ラウリル硫酸ナトリウム	0.01%
スルホコハク酸ジオクチルナトリウム	0.005~0.01%

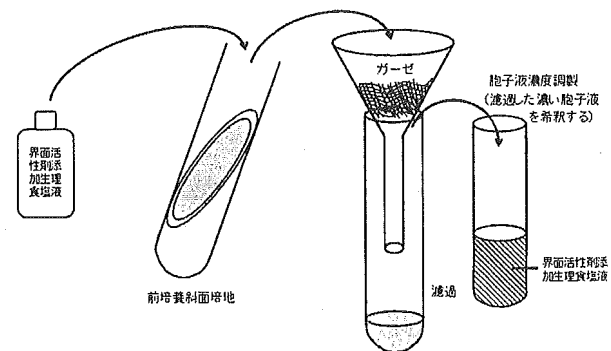


図1. 孢子液作製法

2) ヘモサイトメーター (改良型ノイバウエル血球計算盤) による孢子数測定 (図2参照)

¹ 県立新潟女子短期大学 〒950-8680 新潟市海老ヶ瀬471 ☎025-270-0379

² 国立医薬品食品衛生研究所 〒158-0098 東京都世田谷区上用賀1-18-1 ☎03-3700-9048

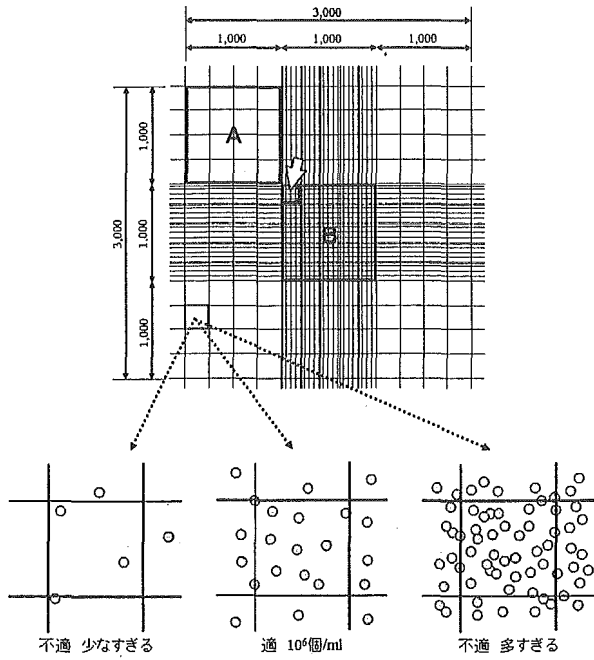


図2. ヘモサイトメーターによる孢子数の測定と適・不適

(1) 1 mm²中 (大枠A) にある孢子数を測定する。

この枠内に孢子が a 個あった場合、1 ml ありの孢子数は a × 10⁴/ml となる。

a 個は 100~200 個が望ましい。

(2) 孢子数が多い場合は、B 枠内の中の小枠内 (矢印の指し示す部分) の孢子数を測定する。

この矢印の指し示す部分の枠内に孢子が b 個あった場合、1 ml ありの孢子数は b × 25 × 10⁴/ml となる。

2. 抗カビ抵抗性試験

(1) 試験片による抗カビ試験

試料面の発育の有無および抗カビ剤添加試料の阻止帯形成などの抗カビ性を評価する。定性試験である。

<操作>

試験 (試料) 片 3 cm × 3 cm (正方形) または直径 2 cm (円形) を準備する。

①前培養 (斜面, 平板) 25~30°C, 7~14 日間



②孢子液を作製する (孢子液数; 1~2 × 10⁶/ml)。



③平板培地に孢子液 (0.1~0.5ml) をコンラージ棒で塗抹する。



④③の塗抹平板の中央に試験片をのせる (図3参照)。



⑤培養 (25~30°C, 7~28日間)

【培養期間】

- a. 試験片から薬剤が溶出しやすい場合; 7~14日間
- b. 試験片から薬剤が溶出しにくい場合; 14~28日間



⑥判定 (試料周辺での発育の有無, 阻止帯形成の有無)

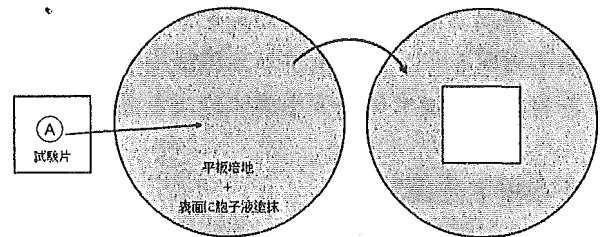


図3. 試験片による抗カビ試験

判定結果の見方 (図4参照)

- a. 試験片から薬剤が溶出しやすい場合;
 - ・目視による
- b. 試験片から薬剤が溶出しにくい場合;
 - ・実体顕微鏡により観察する
 - ・試験片周辺での発育状態をもって判断する
 - ・必ず対照試料を用いる

コメント

- ・肉眼によるカビ抵抗試験として客観的な判断がしやすい。
- ・阻止帯が大きいほど薬剤が溶出しやすい。
- ・抗カビ剤の溶出していない試料の判定は、試料周辺のカビ発育性を実体顕微鏡で観察する。
- ・抗カビ効果が得られる場合は、カビの発育が不

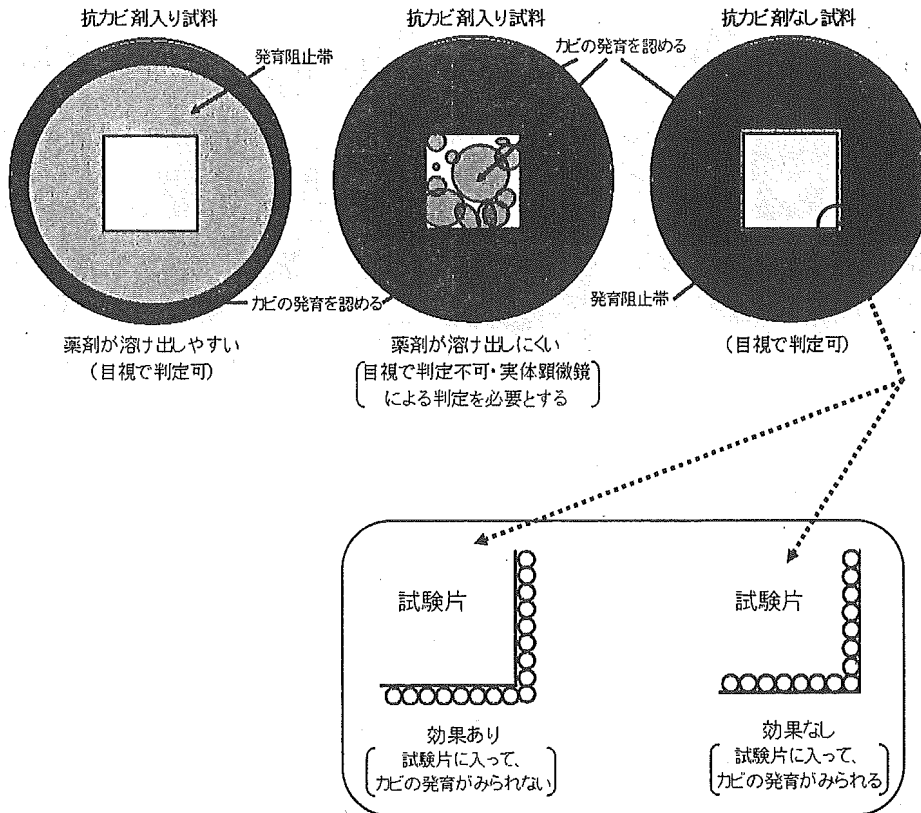


図4. 試験片による抗カビ試験判定結果の見方

均一となることが多い。

(2)ペーパーディスクによる抗カビ試験

ペーパーディスクに各薬剤の一定濃度を含ませ、その抗カビ性を比較する半定量試験法である。

<操作>

①孢子液（孢子数； $1 \sim 2 \times 10^6$ /ml）を作製し、平板培地に孢子液（0.1~0.5ml）をコンラージ棒で塗抹する。

②試験薬剤の調製を行う。

【薬剤調製法】

- a. 調製原液：各薬剤0.1g+精製水または溶剤10ml (10,000 μ g/ml)
- b. 各濃度の調製：例) 調製原液0.1ml+精製水9.9ml (100 μ g/ml)

③ペーパーディスクに調製した薬剤濃度液の一定量を吸収させる。

④③のペーパーディスクを①の平板上に等間隔で配置する。

⑤培養（25~30℃，7日間）

⑥判定（阻止帯により抗カビ性を判定する。）

判定例

薬剤濃度 (μ g/ディスク)	100	50	25	12.5	6.3	対照
判定 (+; 阻止帯あり, -; 阻止帯なし)	+	+	+	+	-	-

判定結果の見方 (図5参照)

コメント

- 各薬剤の抗カビ性を比較することはできるが、半定量的である。
- 定量的数値を求めるには、最小発育阻止濃度（MIC）測定試験によらなければならない。