

Cinoxacin の突然変異誘発性試験

白取 治・高瀬 史朗

塩野義製薬株式会社研究所

Cinoxacin の突然変異誘発性を調べるため、JCL-ICR マウスにおける細胞遺伝学的観察を行なった。

8 週齢の雄マウスに、Cinoxacin を 3,000 mg/kg 経口 1 回投与、あるいは 2,300 mg/kg/日 5 日間連続経口投与し、骨髓細胞の染色体を観察した。その結果、Cinoxacin 投与に起因すると考えられる染色体異常は認められなかった。

また、対照として用いた Nalidixic acid 1,700 mg/kg/日 を、1 回投与または 5 日間連続経口投与をして、骨髓細胞の染色体を観察したが、この場合も、染色体異常は認められなかった。

これに対して、突然変異誘発物質として用いた Mitomycin C 投与群 (3 mg/kg 1 回腹腔内投与) においては、chromatid break や exchange などの染色体異常が高頻度に出現した。

マウスを用いる *in vivo* 検定法の補助手段として、ヒト由来のリンパ球に対する染色体異常誘発性を調べたが、上述のマウス骨髓細胞で認められた成績と同様の結果が得られた。

結 言

Cinoxacin (CINX) は、アメリカ Eli Lilly 社で開発されたキノロンカルボン酸系抗菌剤である。今回、CINX の突然変異誘発性試験として、ヒト末梢血リンパ球による *in vitro* 染色体試験、ならびにマウスによる *in vivo* 染色体試験を行ない陰性の結果を得たので報告する。

材料および方法

1. 検 体

CINX および同系統の対照検体として Nalidixic acid (NA)¹⁾ を用いて実験を行なった。その化学構造は右記の通りである。

染色体試験の陽性対照としては、Mitomycin C (MC, 協和酸酵)^{2,3)} を用いた。

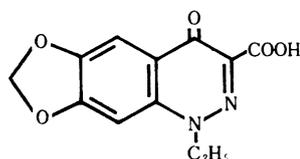
2. *In vitro* 染色体試験

In vitro 染色体試験法として、ヒト由来のリンパ球に対する染色体異常誘発性を検討した⁴⁾。

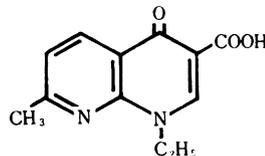
まずヒトリンパ球に作用させる検体の濃度を決定するため、マウス白血病由来の浮遊培養細胞 L-1210 に対する細胞毒性を調べて、ED₅₀ 値を算出した⁵⁾。

CINX および NA は水に難溶なため、0.1 N NaOH 溶液で 50 mg/ml に溶解後、RPMI-1640 培地で階段希釈を行ない細胞毒性を測定した。この希釈操作以外特

CINX



NA



別な pH 修正をしなくても、細胞毒性の測定に及ぼす pH の影響は全く認められなかった。

健康人から採血したヘパリン加末梢血液を Lymphoprep[®] に重層し、比重遠心分離して集めたリンパ球を 20% 仔牛胎児血清加 RPMI-1640 培地中に $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml になるよう調製し、リンパ球の幼若化をはかるため Phytohemagglutinin-P[®] を 200 μ g/ml の割合で添加した。37°C 48 時間培養後、予備試験で得られ

た ED₅₀ の濃度を参考にして階段希釈した検体を加え、21 時間再培養した。その後 0.2 µg/ml のコルセミドを添加し、更に 3 時間培養を続けた (検体との接触時間は合計 24 時間)。空気乾燥法で染色体標本をつくり観察をした。

3. *In vivo* 染色体試験

1) 実験動物および飼育条件

日本クレア産の JCL-ICR 系雄マウスを 6 週齢で購入し、2 週間飼育環境に馴化させ体重が 32~35 g に達してから実験に使用した。各動物は温度 24 ± 2°C、湿度 55 ± 5%、午前 7 時より 12 時間照明に調節された飼育室で金属ケージ 1 ケージ当り 5 匹収容して固型飼料 (CE-2, 日本クレア) および市水道水を自由摂取させて飼育した。

2) 試験方法

In vivo 染色体試験方法は、検体を 1 回投与あるいは 5 日間連続投与した時の骨髄細胞における染色体異常誘発性を検討した⁴⁾。CINX および NA は水に難溶のため、5%アラビアゴム溶液で懸濁液にして胃管を用いて経口投与をした。いずれの実験群においても投与液量が 10 ml/kg となるように調整して検体投与を行った。無処置対照群では、5%アラビアゴム溶液を同様に投与した。無処置対照群のほかに、蒸留水に溶かした MC 3 mg/kg を腹腔内 1 回投与をした陽性対照群を設けた。

検体 1 回投与実験では検体投与 24 時間後に、5 日間連続投与実験では最終検体投与 6 時間後に、それぞれ動物を屠殺した。分裂中期の骨髄細胞を集めるため、

屠殺 2 時間前にコルヒチン 1 mg/kg 腹腔内投与した。標本作製のために大腿骨をとり出して両端をハサミで切断し、RPMI-1640 培地を入れた注射器を用いて液と一緒に骨髄細胞をスピッツ遠心管に洗い出し、0.075 M KCl 溶液で 15 分間低張処理をしたのち、Acetic-alcohol (Acetic acid : Methanol=1 : 3) で固定した。染色体標本は、空気乾燥法で作製し GEMSA 染色の後検鏡した。

実験結果

A. *In vitro* 染色体試験

1. マウス白血病細胞 L-1210 における ED₅₀ 値
マウス白血病細胞 L-1210 を用いて算出した ED₅₀ 値を Table 1 に示した。

ED₅₀ 値は、CINX 330 µg/ml, NA 170 µg/ml, MC 0.05 µg/ml であった。

2. ヒトリンパ球における *in vitro* 染色体試験

CINX 及び NA の作用濃度として 2 × ED₅₀ 値 (660

Table 1 Growth inhibitory effects of cinoxacin, nalidixic acid and mitomycin C on cultured L-1210 mouse leukemia cells

Agent	ED ₅₀ (µg/ml)
Cinoxacin	330
Nalidixic acid	170
Mitomycin-C	0.05

Table 2 *In vitro* chromosome studies of human lymphocyte cells after treatment with cinoxacin, nalidixic acid and mitomycin C

Agent	Dose (µg/ml)	Observed cells	Achromatic gap		Type of aberrations						Aberrant cells (%)
			Chromatid	Iso-chromatid	Break		Ring	Exchange	Fragment	Total	
					Chromatid	Iso-chromatid					
Control	Untreated	250	18	1	3	1	0	0	0	4	3(1.2)
Mitomycin C	0.1	250	41	4	29	6	0	28	16	79	75(30.0)*
	0.05	250	26	3	9	1	0	10	0	20	20(8.0)*
Cinoxacin	660	250	15	3	2	2	1	0	0	5	5(2.0)
	330	250	9	2	3	0	0	0	0	3	3(1.2)
Nalidixic acid	340	250	34	2	6	3	0	1	0	10	10(4.0)*
	170	250	13	1	3	0	0	0	0	3	3(1.2)

Significant differences from control are marked * (p<0.05)

および 340 $\mu\text{g/ml}$ と ED_{50} 値 (330 および 170 $\mu\text{g/ml}$) の 2 用量を用いた。

各実験群とも、250 個の分裂中期像について染色体異常と achromatic gap の有無を調べ、結果を Table 2 に示した。

無処置対照群では、chromatid break と isochromatid break の両方が、1 個の細胞に、chromatid break が 2 個の細胞に観察され、染色体異常の出現頻度は 3/250 (1.2%) であった。また achromatic gap は 19/250 の細胞に認められた (Photo. 1)。

CINX の作用群では、 $2 \times \text{ED}_{50}$ 値において、chromatid break (Photo. 2) および isochromatid break がおのおの 2 個の細胞で、ring が 1 個の細胞で合計 5 個 (2.0%) の染色体異常細胞が観察された。achromatic gap は 18 個観察されたが (Photo. 3)、その内 isochromatid gap が 3 個含まれていた。 ED_{50} 作用群では chromatid break が 3 個の細胞で観察され、achromatic gap が 11 個認められた。いずれの実験群においても、無処置対照群と比べ染色体異常細胞の出現頻度、achromatic gap とともに有意の差はみられなかった。

対照検体である $\text{NA } 2 \times \text{ED}_{50}$ 作用群では、chromatid break 6 個、isochromatid break 3 個 (Photo. 4)、および exchange 1 個などの染色体異常が 10/250 個 (4%) 認められ、染色体異常細胞の出現頻度は無処置対照群に比べ有意に多かった ($p < 0.05$)。しかし、 ED_{50} 作用群では、chromatid break が 3 個、また、achromatic gap が 14 個認められ、染色体異常細胞の出現頻度、achromatic gap とともに無処置対照群と比べ有意差はみられなかった。

これに対し、陽性対照群 MC 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ($2 \times \text{ED}_{50}$)

および 0.05 $\mu\text{g/ml}$ (ED_{50}) の作用群では、無処置対照群と比べ、染色体異常細胞の出現頻度は用量作用関係を持っており、各々 75/250 (30%) および 20/250 (8.0%) と有意な高値を示した。これらの異常は chromatid break と exchange (Photo. 5) であったが、isochromatid break あるいは fragment なども観察された。Exchange の大部分は 2 個の染色体の centric fusion であり、このため異数性の細胞が増加した。

また、achromatic gap はおのおの 45/250、29/250 の頻度で認められた。

B. *In vivo* 染色体試験

1. マウスにおける死亡率

In vivo 染色体試験の投与量を決定するため、1 回あるいは 5 日間連続経口投与した時の死亡率を調べ、結果を Table 3 に示した。

2. マウスにおける *in vivo* 染色体試験

CINX の 1 回投与実験では、最大耐量である 3,000 mg/kg を最高投与量とし、以下その 1/2、および 1/4 量の 3 投与量群を設定した。5 日間投与実験においても、最大耐量 2,300 mg/kg を最高投与量とし、以下その 1/2、1/4 および 1/8 量の 1,150、575 および 287 mg/kg/日 の 4 投与量群を設定した。同様に NA の 1 回投与実験及び 5 日間投与実験では 1,700 mg/kg/日 を選択した。

各群とも 5 匹のマウスを用い、250 個の分裂中期像について染色体異常と achromatic gap の有無を調べた。NA 1,700 mg/kg/日 5 日間連続投与群は、投薬期間中に毒性のためマウスが 1 匹死亡したので、生存した 4 匹のマウスから染色体標本を作製し観察をした。結果は Table 4 に示した。

Table 3 Mortality of mice (JCL-ICR, 8 weeks old, male mice)

Agent	Dose (mg/kg/day)	Route	Mortality	Note
Cinoxacin	3,000 ; single	p. o.	0/5	loss of weight
	2,500 ; single	p. o.	0/5	loss of weight
	2,300 ; 5 days	p. o.	0/5	loss of weight
	1,150 ; 5 days	p. o.	0/5	
Nalidixic acid	3,400 ; single	p. o.	3/5	1**, 1, 1
	1,700 ; single	p. o.	0/5	Weight is almost unchanged.
	3,400 ; 5 days*	p. o.	4/5	1, 1, 2, 4
	1,700 ; 5 days	p. o.	1/5	2
	850 ; 5 days	p. o.	0/5	

* In this experiment the treatment was made by single administration.

** Time of death : days after treatment

Photo. 1 Normal metaphase of human lymphocyte cell. Untreated. 46 chromosomes (Male)

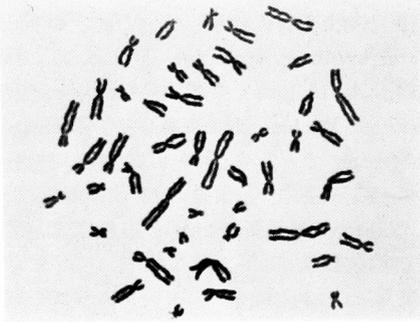


Photo. 2 Metaphase of human lymphocyte cell with chromosome aberration. Chromatid break by 660 $\mu\text{g/ml}$ of CINX (arrow).

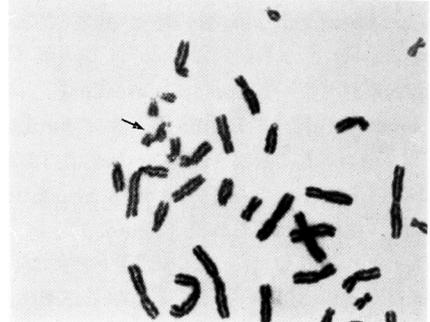


Photo. 3 Metaphase of human lymphocyte cell with chromatid gap by 660 $\mu\text{g/ml}$ of CINX (arrow).



Photo. 4 Metaphase of human lymphocyte cell with chromosome aberration. Isochromatid break by 340 $\mu\text{g/ml}$ of NA (arrow).

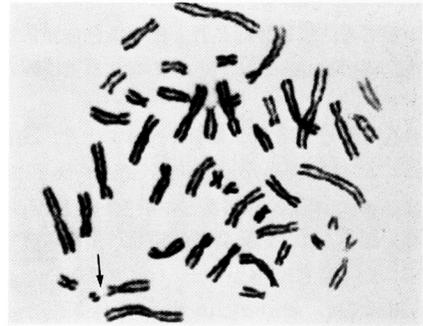


Photo. 5 Numerous aberrations by mitomycin-C (0.1 $\mu\text{g/ml}$)

B : chromatid break

G : chromatid gap

E : exchanges

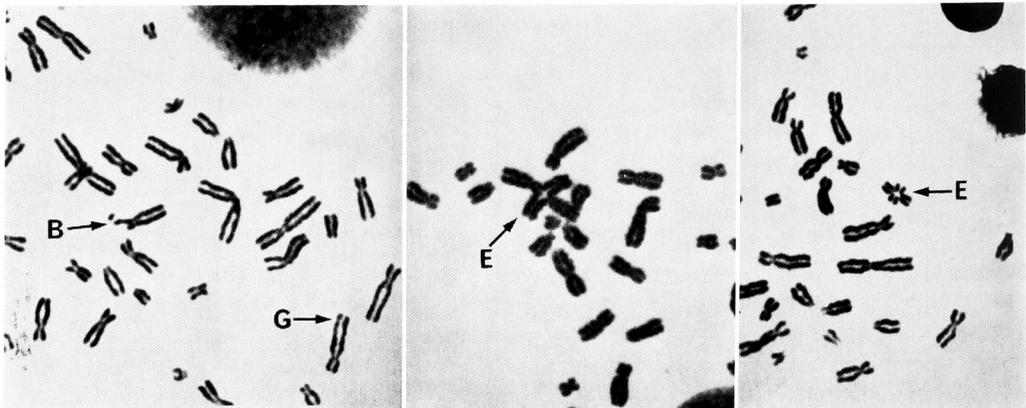
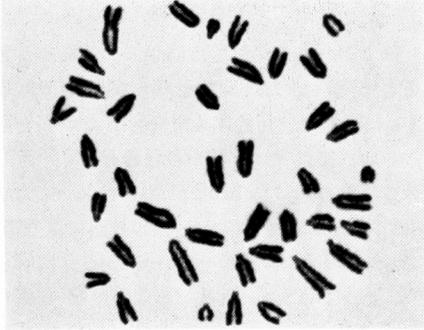


Photo. 6 Normal metaphase of mouse bone marrow cell. Untreated. 40 chromosomes.



無処置対照群では chromatid break が1個の細胞にみられ、染色体異常の出現頻度は 1/250 (0.4%) であった (Photo. 6)。

CINX 3,000 mg/kg 1回投与群では、chromatid break が2つの細胞で1個ずつ (0.8%) 観察された (Photo. 7)。1,500 mg/kg および 750 mg/kg 1回投与群における染色体異常細胞の出現頻度は 0.8% (2/250 個) および 1.2% (3/250 個) であった。

5日間連続投与群のうち、2,300 mg/kg/日 投与群では chromatid break が3つの細胞で1個ずつ (1.2

Photo. 7 Metaphase of mouse bone marrow cell with chromosome aberration after a single p. o. administration of 3,000 mg/kg of CINX 40 chromosomes with chromatid break (arrow).

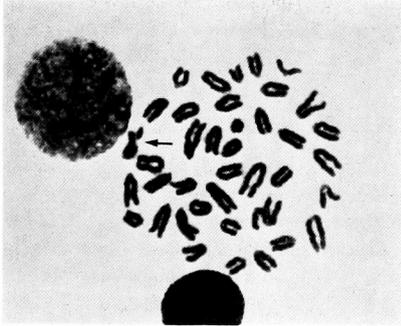
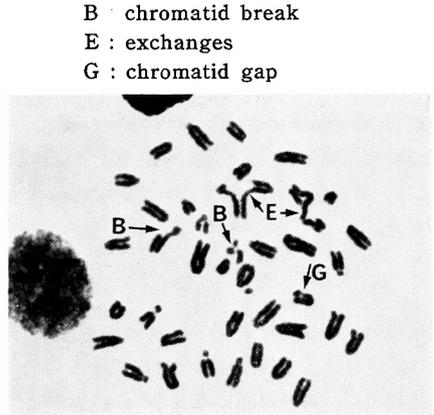


Photo. 8 Metaphase of mouse bone marrow cell with chromosome aberration (arrows) after a single i. p. administration of 3 mg/kg of mitomycin-C. 38 chromosomes.



B : chromatid break
E : exchanges
G : chromatid gap

Table 4 *In vivo* chromosome studies of bone marrow cells in male mice after treatment with cinoxacin, nalidixic acid and mitomycin C

Agent	Dose (mg/kg/day)	Route	No. of mice	Observed cells	Achromatic gap		Type of aberrations					Aberrant cells (%)		
					Chromatid	Iso-chromatid	Break		Fragment	Ring	Exchange		Total	
							Chromatid	Iso-chromatid						
Control	Untreated	—	5	250	11	2	1	0	0	0	0	0	1	1 (0.4)
Mitomycin C	3 single	i. p.	5	250	72	3	55	4	7	1	27	94	74 (29.6)*	
Cinoxacin	3,000 single	p. o.	5	250	13	0	2	0	0	0	0	2	2 (0.8)	
	1,500 single	p. o.	5	250	12	1	2	0	0	0	0	2	2 (0.8)	
	750 single	p. o.	5	250	15	0	3	0	0	0	0	3	3 (1.2)	
	2,300 5 days	p. o.	5	250	29	1	3	0	0	0	0	3	3 (1.2)	
	1,150 5 days	p. o.	5	250	17	1	3	0	0	0	0	3	3 (1.2)	
	575 5 days	p. o.	5	250	12	0	1	0	0	0	0	1	1 (0.4)	
	287 5 days	p. o.	5	250	10	0	2	0	0	0	0	2	2 (0.8)	
Nalidixic acid	1,700 single	p. o.	5	250	5	0	0	0	0	0	0	0	0 (0)	
	1,700 5 days	p. o.	4	250	18	0	4	0	0	0	0	4	4 (1.6)	

Significant difference from control is marked * (p<0.05).

%) 観察された。Achromatic gap は 30 個観察された。1,150 mg/kg/日, 575 mg/kg/日 および 287 mg/kg/日 投与群における染色体異常細胞の出現頻度は 0.4% から 1.2% であった。

CINX 投与群では、いずれの実験群においても、chromatid break 以外の染色体異常像は観察されなかった。また、染色体異常細胞の出現率は無処置対照群と比べ、1 回投与群および 5 日間連続投与群ともに有意差は認められなかった。

NA 1,700 mg/kg 1 回投与群では、染色体異常はまったくみられなかったが、5 日間連続投与をすると chromatid break が 4 個 (1.6%) の細胞で観察された。染色体異常細胞の出現頻度および achromatic gap の出現頻度は、いずれの群においても無処置対照群との間に有意差はなかった。

これに対し陽性対照の MC 3 mg/kg 腹腔内 1 回投与群 (1/2 LD₅₀ に相当) では、染色体異常細胞が 74/250 個 (29.6%) と著しく増加した。これらの異常は、大部分が chromatid break で、fragment および exchange も出現した (Photo. 8)。また、achromatic gap は 75 個観察され、無処置対照群に比べ著しい増加を示した。

考 察

ヒト由来のリンパ球を用いる *in vitro* 染色体試験で、ED₅₀ 値の濃度を作用させた群における染色体異常細胞の出現率は、陽性対照である MC が 8% と無処置対照群と比較して有意の値 ($p < 0.05$) を示したのに対して、CINX および、NA いずれの群においても無処置対照群との間に有意な差は認められなかった。しかし、 $2 \times ED_{50}$ に濃度を高くして作用させた群では、染色体異常細胞の出現率に違いが認められた。すなわち、陽性対照 MC 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の作用群では、染色体異常細胞が用量依存性をもって 30% と高率に出現した。NA 340 $\mu\text{g/ml}$ の作用群では、染色体異常細胞の出現率が 4% で無処置対照群と比較して有意の値を示した ($p < 0.05$)。これに対して、CINX 660 $\mu\text{g/ml}$ の作用群では、染色体異常細胞の出現率は 2% で無処置対照群との間に有意差は認められなかった。したがって、*in vitro*

染色体試験の結果 CINX は染色体異常細胞の出現頻度が NA よりも低く、突然変異誘発性は全くないと判断された。

次に、*in vivo* 染色体試験の結果についてみると、陽性対照として用いた MC 3 mg/kg 腹腔内 1 回投与群 (1/2 LD₅₀ 値) では、染色体異常細胞が 29.6% と高率に出現し、この成績はツツ町等⁶⁾の報告とよく一致した。また染色体異常の像は chromatid break, exchange, fragment などが観察され、1 個の細胞に複数の染色体異常のみられる例が約 20 個あった。これに対して、CINX、および NA の一回投与あるいは 5 日間の連続投与では、極めて大量の検体を投与した群をはじめ、いずれの投与群においても染色体異常細胞の出現頻度には用量作用関係はみられず、また無処置対照群との間に有意差は認められなかった。以上より、CINX および NA には *in vivo* 骨髄細胞染色体試験においても、突然変異誘発性は認められなかった。

今回の *in vitro* および *in vivo* 染色体試験の結果からみて、本実験条件下では、CINX は何ら突然変異誘発性を示さないものと結論される。

文 献

- 1) 中沢昭三, 中村敬子, 丹羽能子, 余公元子: 新化学療法剤 Nalidixic acid に関する基礎的研究。Chemotherapy 13: 139~145, 1965
- 2) COHEN, M. M. & M. W. SHAW: Effects of mitomycin C on human chromosomes. J. Cell Biol. 23: 386~395, 1964
- 3) MANYAK, A. & E. SCHLEIERMACHER: Action of mitomycin C on mouse spermatogonia. Mutation Res. 19: 99~108, 1973
- 4) Report of the *ad hoc* committee of the environmental mutagen society and the institute for medical research: Chromosome methodologies in mutation testing. Toxicol. Appl. Pharmacol. 22: 269~275, 1972
- 5) SHIRATORI, O.: Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: *In vitro* and *in vivo* studies Gann 58: 521~528, 1967
- 6) ツツ町晋也, 菊地康基: Thiamin tetrahydrofurfuryl disulfide hydrochloride の突然変異性試験。武田研究所報 34: 509~515, 1975

MUTAGENIC ACTIVITY TESTS ON CINOXACIN
IN VITRO AND *IN VIVO* CYTOGENETIC TESTS
IN MAMMALIAN CELLS

OSAMU SHIRATORI and SHIRO TAKASE

Shionogi Research Laboratories, Shionogi & Co., Ltd.

Cinoxacin (CINX) was examined for the mutagenicity by *in vivo* cytogenetic test and its capability to induce chromosome damage in human lymphocytes *in vitro*. Nalidixic acid, reference compound used in the present study, was tested for cytogenetic effects in the same way as CINX. The cytogenetic effects of compounds on JCL-ICR male mice bone marrow cells *in vivo* were examined. Compounds were given orally to adult mice either once or daily for five successive days, except for mitomycin C. The mice were treated with a single oral administration of 3,000 mg/kg or five successive oral administrations of 2,300 mg/kg/day of CINX. There was no increase of chromosome aberration as compared with the non-treated control in any group treated with CINX. Moreover, the results showed that CINX induced no chromosome aberration in human lymphocytes *in vitro*.