

AM-715 の哺乳動物における突然変異原性試験

入倉 勉・鈴木 博・杉本 勉

杏林製薬株式会社中央研究所

新規合成抗菌剤である AM-715 の突然変異原性試験としてマウスにおいて優性致死試験、ハムスターおよびラットにおいて染色体試験をそれぞれ行なった。

1. 優性致死試験

AM-715 の 300 および 800 mg/kg をマウスに 1 回経口投与した。陽性対照として mitomycin C 3.0 mg/kg を 1 回腹腔内投与した。

着床卵の生存率および未着床に関して、精子形成のどの時期においても、AM-715 投与群は対照と比較し統計学的有意差はみられなかった。他方、mitomycin C は精母細胞および精原細胞に着床前優性致死を誘発した。

2. 染色体試験

AM-715 の 250 および 500 mg/kg をハムスターに 1 回経口投与し、1,000 mg/kg/day を 38 日間ラットに経口投与した。陽性対照として 6-mercaptopurine 250 mg/kg をハムスターに 1 回腹腔内投与した。

AM-715 1 回投与のハムスターおよび 38 日間投与のラットにおいて染色体の異常はみられなかった。他方、6-mercaptopurine は break, ring, fragment, exchange および pulverization などの染色体異常を誘発した。

以上の結果から、本検討に関する限り、AM-715 はマウス、ハムスターおよびラットに対して突然変異原性はないことが示唆された。

AM-715 は、杏林製薬株式会社において合成された新しい抗菌化合物で、その抗菌スペクトルは広く、グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方に優れた抗菌力を示すことが認められている¹⁾。

今回、AM-715 の安全性を確認するための毒性試験の一環として、マウスにおける優性致死試験を行うとともに、ハムスターに 1 回投与およびラットに 38 日間連続投与した後、骨髓細胞の染色体への影響につき調べたので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 実験動物

優性致死試験には、生後 10 週令の SLC-CDF₁ 雌雄マウス〔静岡実験動物(協)〕を、*in vivo* における染色体に関する 1 回投与試験には、生後 10 週令の雄チャイニーズハムスター(日本医科)を、38 日間連続投与試験には、生後 6 週令の JCL: Wistar 系雄ラット(日本クレア)をそれぞれ用いた。各動物は 1 週間以上の予備飼育を行った。

2. 優性致死試験

i) 投与量および投与方法

投与量は、ヒトの推定常用量 12 mg/kg の 25 倍に相当する 300 mg/kg および、66.7 倍に相当する 800 mg/kg の 2 用量を設定した。

AM-715 は、蒸留水で懸濁し、投与液量が 20 ml/kg になるように用時調製し、雄のみに 1 回経口投与した。

上記 AM-715 投与群の他に対照群と陽性対照群の 2 群を設定し、対照群には、蒸留水のみを 20 ml/kg の割合で 1 回経口投与し、陽性対照群には、mitomycin C (MMC) を 3.0 mg/kg 1 回腹腔内投与した。

ii) 交配方法

交配は、投与当日から週単位で、6 週間行い、各週の交配は、雄 1 匹に無処理の未経産雌 2 匹を同居させ行なった。交尾の確認は、陰栓の観察をもって行い、当日を妊娠 0 日目とした。

iii) 胎仔の観察

妊娠動物を妊娠 13 日目に頸椎脱臼により屠殺してから開腹し、子宮について着床数、生存胎仔数および死亡胚胎仔数、卵巣について黄体数を調べた。また、不妊の雌についても、交配期間の中間日から起算して、13 日目に同様な観察を行った。

iv) 優性致死誘発率の算出

薬物投与時における精子形成の各過程に対応させるために、交配を週単位で6週間行なった。結果は週単位で集計した。なお、対照群は全期間を一括集計した値を実験群との比較検討に用いた。

子宮内の胎仔および着床痕、黄体数をしらべ、卵の着床前死亡、さらに、次式より着床後における優性致死誘発率(J)および着床前後における優性致死誘発率(J')を求めた。

$$J = \left(1 - \frac{\text{実験群における各週の着床卵生存率}}{\text{対照群における全期間の着床卵生存率}} \right) \times 100 (\%)$$

$$J' = \left(1 - \frac{\text{実験群における各週の} \frac{1}{\text{母体あたりの生存胎仔数}}}{\text{対照群における全期間の} \frac{1}{\text{母体あたりの生存胎仔数}}} \right) \times 100 (\%)$$

2. In vivo 染色体試験

i) 投与量および投与方法

1回投与試験では、慢性毒性試験³⁾の中、高用量の250および500 mg/kgを用い、いずれも投与液量が10 ml/kgとなるように用時調製し1回経口投与した。

上記AM-715投与群の他に無処理群と陽性対照群の2群を設定した。陽性対照群には6-mercaptopurine (6-MP)の250 mg/kgを1回腹腔内投与した。

連続投与試験では、亜急性毒性試験²⁾の高用量である1,000 mg/kgを用い、投与液量が20 ml/kgとなるように用時調製し、連続経口投与した。対照群には、蒸留水のみを同液量経口投与した。投与期間は38日間とした。

ii) 染色体標本の作成

1回投与の試験においては薬物投与48時間後に、連続投与試験では最終投与24時間後に骨髓細胞を採取した。なお、染色体の分裂中期像を得るために、屠殺2時間前にコルヒチン4 mg/kgを腹腔内投与した。骨髓細胞は大腿骨からTYRODE氏液を用いて採取し、0.075 M KCl水溶液で10分間低張処理を行なった後、酢酸-エタノール(1:3)混液で固定した。固定後空気乾燥し、ギムザ染色して標本とした。鏡検に際して、100~250の細胞について、Ad Hoc Committee⁴⁾の報告にしたがってギャップを除外して、染色体異常細胞数を計算した。

II. 実験結果

1. 優性致死試験

結果をTable 1に示した。300 mg/kg群では、妊娠率はいずれの週においても、対照群との間に有意な差は認められなかった。

黄体数は、1~5週では対照群とほぼ同じであったが、6週で8.6と対照群より有意に少なかった。したがって、

6週では着床数と生存胎仔数もそれぞれ8.1および7.5と、対照群より有意に少なかった。卵の死亡は、4週の着床前死亡率9.5%、1週の着床後死亡胎仔数0.9と、それぞれやや高値であったが、対照群との間に有意差はなかった。

J'は6週で15.1%とやや高い値が認められたが、他の週とともに陰性であった。また、Jは各週-1.9~2.9%と低く陰性であった。

800 mg/kg群では、妊娠率および黄体数は、いずれの週においても、対照群との間に有意な差は認められなかった。着床数は、4週で8.4と対照群より有意に少なかったが、他の週では、対照群の変動値内でバラツキが見られ、有意な差は認められなかった。生存胎仔数は、5週と6週で8.1、8.2と対照群より有意に少なかったが、他の週では、対照群とはほぼ同様な変動を示した。卵の死亡は、着床前死亡率および着床後死亡胎仔数ともに、いずれの週においても、対照群との間に有意な差は認められなかった。

Jは各週-5.5~-0.2%、J'は各週-10.2~-8.9%と低く、いずれも優性致死作用は陰性であった。

陽性対照のMMC群では、3週までは対照群との間に有意な差は認められなかったが、4週以降にMMCの影響が現われ、卵の着床前死亡率は対照群より有意に高く、特にこの変動は、4週と6週で顕著であった。したがって、J'が4週と6週で20%以上を示し、優性致死作用は陽性であった。

2. In vivo 染色体試験

結果をTable 2に示した。1回投与試験では各群ともに3個体につき、100または150個の分裂中期像を調べた。250 mg/kg群では、染色体異常をもつ細胞はみられなかったが、500 mg/kg群の3個の細胞にギャップが認められた。無処理群では、4個の細胞にギャップが、1個の細胞に切断が認められた。

一方、6-MP群では、切断と交換を主体とする染色体異常が、35個の細胞に認められ、ギャップの出現頻度も高かった。

連続投与試験では、各群ともに5個体につき、250個ずつの分裂中期像を調べた。1,000 mg/kg群の1個の細胞にギャップがみられたが対照群の細胞には異常は認められなかった。

III. 考察および結語

AM-715をSLC-CDF₁マウスに300および800 mg/kg 1回投与したときの優性致死作用、チャイニーズハムスターに250および500 mg/kg 1回投与あるいはJCL: Wistar系ラットに1,000 mg/kg 38日間連続投与し

Table 1 Results of dominant lethal test in SLC-CDF₁ male mice administered with AM-715

Group	Mating (week)	Females fertilized		Corpora lutea		Total implants		Dead implants		Survival implants		Loss ^{b)}		Dominant lethality (%)	
		No.	(%)	No.	Mean	No.	Mean	No.	Mean	No.	Mean	No.	Rate ^{a)}	J	J'
300mg/kg	1	29	(96.7)	290	10.0	273	9.4	25	0.9	248	8.6	5.9	90.8	2.9	-3.4
	2	27	(93.1)	293	10.9	271	10.0	13	0.5	258	9.6	7.5	95.2	-1.8	-7.9
	3	25	(86.2)	227	9.1	213	8.5*	10	0.4	203	8.1	6.2	95.3	-1.9	8.3
	4	26	(86.7)	295	11.3	267	10.3	15	0.6	252	9.7	9.5	94.4	-0.9	-9.4
	5	24	(85.7)	241	10.0	225	9.4	17	0.7	208	8.7	6.6	92.4	1.2	2.1
	6	21	(86.7)	180	8.6*	171	8.1*	13	0.6	158	7.5*	5.0	92.4	1.2	15.1
AM-715															
800mg/kg	1	22	(100.0)	222	10.0	204	9.3	6	0.3	198	9.0	8.1	97.1	-3.8	-1.6
	2	17	(89.5)	182	10.7	172	10.1	6	0.4	166	9.8	5.5	96.5	-3.2	-10.2
	3	20	(100.0)	210	10.5	196	9.8	7	0.4	189	9.5	6.7	96.4	-3.1	-6.7
	4	18	(90.0)	168	9.3	152	8.4*	2	0.1	150	8.3	9.5	98.7	-5.5	5.9
	5	14	(87.5)	130	9.3	120	8.6	7	0.5	113	8.1*	7.7	94.2	-0.7	8.9
	6	17	(94.4)	155	9.1	150	8.8	10	0.6	140	8.2*	3.2	93.3	0.2	7.0
MMC	1	29	(100.0)	284	9.8	268	9.2	18	0.6	250	8.6	5.6	93.3	0.3	2.7
	2	27	(93.1)	255	9.4	237	8.8	14	0.5	223	8.3	7.1	94.1	-0.6	6.7
	3	23	(92.0)	236	10.3	222	9.7	15	0.7	207	9.0	5.9	93.2	0.3	-1.6
	4	20	(83.3)	188	9.4	153	7.7*	15	0.9	138	6.9*	18.6	90.2	3.6	22.1
	5	25	(89.3)	238	9.5	214	8.6	20	0.9	194	7.8*	10.1	90.7	3.1	12.4
	6	12	(42.9)*	75	6.3*	44	3.7*	4	0.3	40	3.3*	41.3	90.9	2.8	62.4
Control	1	21	(100.0)	201	9.6	192	9.1	16	0.8	176	8.4	4.5	91.7	-	-
	2	21	(95.5)	208	9.9	198	9.4	14	0.7	184	8.8	4.8	92.9	-	-
	3	18	(94.7)	192	10.7	185	10.3	12	0.7	173	9.6	3.6	93.5	-	-
	4	20	(90.0)	227	11.4	207	10.4	14	0.7	193	9.7	8.8	93.2	-	-
	5	20	(100.0)	199	10.0	182	9.1	12	0.6	170	8.5	8.5	93.4	-	-
	6	19	(95.0)	173	9.1	163	8.6	5	0.3	158	8.3	5.8	96.9	-	-
1-6		119	(96.0)	1200	10.1	1127	9.5	73	0.6	1054	8.9	6.1	93.5	-	-

* : Significant difference from control ($p < 0.05$)

a) : Survival rate of implants (%)

b) : Pre-implantation loss (%)

Table 2 Results of in vivo cytogenetic test in Chinese hamster or Wistar rats administered with AM-715

Agent	Dose (mg/kg)	Route	Animals Species	Used No.	Observed cells	Type of aberrations					Aberrant(d) cells (%)	
						Gap	Break	Ring	Fra ^{a)}	Ex ^{b)}		Pul ^{c)}
AM-715	250	single	po	hamster	3	100	0	0	0	0	0	0
AM-715	500	single	po	hamster	3	150	3	0	0	0	0	0
Intact	—	—	—	hamster	3	150	4	1	0	0	0	1 (0.6)
6-MP	250	single	ip	hamster	3	150	12	19	2	7	22	35 (23.3)*
AM-715	1000	38 days	po	rat	5	250	1	0	0	0	0	0
D.W.e)	—	38 days	po	rat	5	250	0	0	0	0	0	0

* : Significant difference from control ($p < 0.05$)

a): Fragment

b): Exchange

c: Pulverization

d): Gap was neglected for aberrant cells.

e): Distilled water

たときの染色体への影響につき、それぞれ調べた。

優性致死試験における卵の死亡は、着床前死亡と着床後死亡に大別でき、優性致死誘発率の算出には、後者が重要な指標となる。しかし、優性致死作用が強い場合は、着床前死亡が増加⁴⁾するため、前者も検討しておく必要がある。一般に、精子形成のいずれかの過程で、Jが10%、J'が20%をこえた場合にはあきらかに陽性と判定される⁵⁾。

AM-715の300 mg/kg群では、卵の死亡はいずれの時期をみても対照群との間に有意な差はなく、JおよびJ'はともに陰性であった。6週にJ'が15.1%と高い値を示したが、これは、排卵数が対照群より少ない結果から着床数および生存胎仔数の減少したことに起因するもので、AM-715の優性致死効果による変動とは考えられない。なぜならば、AM-715の800 mg/kg群で、卵の死亡は、いずれの時期をみても、対照群との間に有意な差はなく、JおよびJ'はともに陰性であった。

一方、陽性対照として用いたMMCには、染色体の切断や転座を高頻度に誘発する作用が報告されている^{6,7)}。今回、MMCの3.0 mg/kgを投与し、優性致死突然変異作用の有無を調べ、その結果、4週と6週でJ'が20%以上を示し、精母細胞と精原細胞の時期にその誘発作用があることが示唆された。

染色体異常を指標とする試験は、哺乳動物を用いたスクリーニング法として、その有用性は高いとされている⁸⁾。

1回投与および連続投与試験で、AM-715投与群には、ギャップのみが観察されたが、その出現頻度は低く、無処理群とほぼ同率に出現していることから、特にAM-715の影響によるものとは考えられなかった。

陽性対照として用いた6-MPには、23.3%の染色体異常が認められたが、この値はFROBERGら⁹⁾の同一投与量でみられた15.1%の出現率に比べ高かったが、染色体異常の種類からみると大差なかった。

以上を総括すると、AM-715は、マウスにおいて

MMCが示すような優性致死突然変異誘発作用を有さず、また、チャイニーズハムスターにおいて6-MPが示すような骨髄染色体の異常を起す作用も有さない。さらに、ラットに38日間1,000 mg/kg/日連続投与した場合にも骨髄染色体に影響をおよぼさないことが確かめられた。

文 献

- 1) ITO, A.; K. HIRAI, M. INOUE, H. KOGA, S. SUZUE, T. IRIKURA & S. MITSUHASHI: In vitro antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. *Antimicrob. Agents & Chemother.* 17: 103~108, 1980
- 2) 入倉 勉, 杉本 勉, 相島 博, 棚瀬裕文, 土屋 剛: AM-715の毒性学的研究, 第1報, マウスおよびラットにおける急性ならびにラットにおける亜急性毒性試験。 *Chemotherapy* 29 (S-4): 766~784, 1981
- 3) 入倉 勉, 杉本 勉, 相島 博, 土屋 剛: AM-715の毒性学的研究, 第4報, ラットにおける慢性毒性試験。 *Chemotherapy* 29 (S-4): 829~848, 1981
- 4) SOCIETY AND THE INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH: Report of the Ad Hoc Committee of the Environmental Mutagen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 22: 269~275, 1972
- 5) 日本製薬工業会・安全性委員会・基礎研究部会・第5チーム編: 医薬品の遺伝毒性試験—現状分析と暫定的試験法(上)。月刊薬事 19: 773~783, 1977
- 6) COHEN, M. M. & M. W. SHAW: Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J. Cell Biol.* 23: 386~395, 1964
- 7) SHAW, M. W. & M. M. COHEN: Chromosomes exchanges in human leukocytes induced by mitomycin C. *Genetics* 51: 181~190, 1965
- 8) 日本公定書協会編: 医薬品の突然変異誘発試験に関する資料, IV 染色体異常による検定——その現状と今後取組むべき問題点——(外村 晶, 佐々木正夫), 15~18頁, 日本公定書協会, 1973
- 9) FROBERG, H. & M. S. SCHENCKING: In vivo cytogenetic investigations in bone marrow cells of rats, Chinese hamsters and mice treated with 6-mercaptopurine. *Arch. Toxicol. (Berl)* 33: 209~224, 1975

MUTAGENICITY STUDIES OF AM-715 IN ANIMALS

TSUTOMU IRIKURA, HIROSHI SUZUKI and TSUTOMU SUGIMOTO

Central Research Laboratories, Kyorin Pharmaceutical Co., Ltd.

Mutagenicity study of AM-715, a new synthetic antibacterial agent, was carried out in mice for the dominant lethal test, and in hamsters and rats for the cytogenetic test.

1. Dominant lethal test

AM-715 was orally administered at a single dose of 300 and 800 mg/kg. As a positive control, mitomycin C was intraperitoneally administered at a single dose of 3.0 mg/kg.

In the survival rate of implants and the preimplantation loss, no significant difference was observed in AM-715-dose groups as compared with the control group at any spermatogenesis stages. On the other hand, mitomycin C induced the preimplantation dominant lethality in both the spermatocyte and the spermatogonia stages.

2. Cytogenetic test

AM-715 was orally administered at a single dose of 250 and 500 mg/kg in hamsters, and at a daily dose of 1,000 mg/kg for 38 days in rats. As a positive control, 6-mercaptopurine was intraperitoneally administered at a single dose of 250 mg/kg in hamsters.

No chromosomal aberration was observed in hamsters treated with a single dose of AM-715, and also in rats treated with AM-715 for 38 days. On the other hand, 6-mercaptopurine induced a many sort of chromosomal aberration, that is to say, as break, ring, fragment, exchange and pulverization.

Therefore, it is concluded that AM-715 has no mutagenic effect in mice, hamsters and rats under the present test conditions.