

## DL-8280 の細胞毒性に関する研究

横田 健・関口玲子  
順天堂大学医学部細菌学教室

DL-8280 の安全性を確認する目的で腫瘍型の CHO-K1 細胞, HeLa 細胞, マウス Neuroblastoma 18 細胞およびマウス正常線維芽細胞初代培養に対する細胞毒性を検討し, norfloxacin (NFLX), nalidixic acid (NA) 等と比較した。DL-8280 は世代時間の短い CHO-K1 細胞に対しては NFLX より強い細胞毒性を示したが, 世代時間の長い Neuroblastoma 18 細胞およびマウス線維芽細胞に対しては, NFLX より細胞毒性は弱かった。しかし NA に比べるといずれの細胞でも毒性が強かったため, 高い血中濃度が得られるような投与方法をとる時には注意が必要であることが示唆された。

ピリドンカルボン酸系合成抗菌薬の一つである DL-8280 は, ブドウ球菌を含むグラム陽性菌から, 緑膿菌等ブドウ糖非発酵菌を含むグラム陰性菌にわたり広い抗菌域を示す上, 殺菌力も強い。またこの系統に属する既存の薬剤, すなわち nalidixic acid (NA) や pipemidic acid (PPA) 等と交叉耐性を認めない。DL-8280 は 300 mg 1 回経口投与により 3  $\mu$ g/ml 程度の血中濃度のピーク値を示し, その半減期も 5.5 時間と比較的長いため, 耐性菌用経口  $\beta$ -lactam 薬剤が不完全な今日, 各種感染症に対する経口剤として期待されるところが大きい。

この系統の薬剤の作用機序は細菌の DNA 立体化酵素, DNA gyrase の阻害にあるといわれるが, なぜ人体に副作用が少ないかは, NA 以来の経験的なもので, 選択毒性の理論は確立されていない。

本研究の目的は DL-8280 の安全性を細胞毒性の面から検討したものである。

## I. 材料および方法

## 1) 使用薬剤

DL-8280 は第一製薬株式会社から分与された free base を, norfloxacin (NFLX) は杏林製薬株式会社から分与された塩酸塩を, NA および PPA は大日本製薬株式会社から分与された free base を使用した。

## 2) 培養細胞

腫瘍型の細胞として, チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞は S<sub>RE</sub> から分与された教室保存株, HeLa 細胞およびマウス Neuroblastoma 18 細胞は, それぞれ順天堂大学組織培養研究室菅沼助教授および三菱化成生命科学研究所天野博士から分与を受けたものを使用した。

非腫瘍型細胞としては, 妊娠後期の ICR マウスの胎児から得た線維芽細胞の初代培養を使用した。

## 3) 培地

CHO-K1 および HeLa 細胞は 5% 牛胎児血清 (GIBCO) 加 F12 培地 (ニッスイ) で, Neuroblastoma 18 細胞と

マウス線維芽細胞は 10% 牛胎児血清加 MCDB103 培地<sup>1)</sup> を使用し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> フラン器 (池本理化) 中で培養した。

## 4) 細胞毒性の検討

Falcon multidish の各 well に 1×10<sup>4</sup> 個の CHO-K1 細胞, HeLa 細胞, Neuroblastoma 18 細胞またはマウス線維芽細胞を含むそれぞれの培地 2 ml に, 0.1~1,000  $\mu$ g/ml の DL-8280, NFLX, NA または PPA を添加し分注した。これを CHO-K1 細胞では 3 日間, HeLa 細胞は 6 日間, Neuroblastoma 18 細胞とマウス線維芽細胞は 7 日間, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> フラン器中で培養した。培養終了後培地上清を除き, 0.002% EDTA 加 trypsin で 37°C 10~15 分間処理して細胞をはがした。細胞を 3 ml の Isotone 溶液に浮遊して Coulter counter で細胞数の自動測定をした。なお Neuroblastoma 18 細胞には, すべての実験で 1 mM の dibutyryl cyclic AMP を添加し神経細胞の分化 (神経線維の伸長) を計った。

各薬剤による細胞の形態変化は培養開始後 24 時間, 72 時間および 7 日目に倒立位相差顕微鏡写真装置 (ニコン) で記録した。また, 一部の細胞については薬剤による形態変化を走査型電子顕微鏡 (日立) でも記録した。電顕標本の作成は前報に準じた<sup>2)</sup>。

## II. 実験成績

## 1) DL-8280 と NFLX, NA および PPA 細胞毒性の比較

Fig. 1 にチャイニーズハムスター卵巣由来の腫瘍型細胞 CHO-K1 細胞に対する DL-8280, NFLX および NA の増殖に対する影響を示した。NA は 0.1~10  $\mu$ g/ml の濃度範囲で CHO-K1 細胞の増殖をやや促進したが, 100  $\mu$ g/ml 以上になると増殖抑制作用が始まり, 1,000  $\mu$ g/ml で強い細胞変性作用を示した。NFLX は低濃度における細胞増殖促進作用が認められない他は NA と

Fig. 1 Influence of DL-8280, NFLX and NA on the growth of the CHO-K1 cells

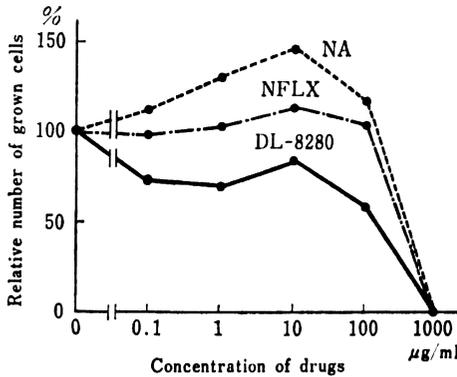
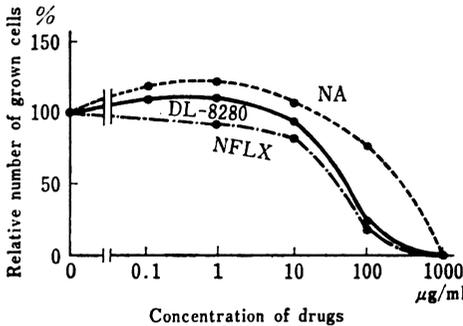


Fig. 2 Influence of DL-8280, NFLX and NA on the growth of the HeLa cells



同程度の細胞毒性であった。これに対し DL-8280 は  $0.1 \mu\text{g/ml}$  の低濃度でもこの腫瘍細胞に軽度の増殖抑制作用を示し、 $100 \mu\text{g/ml}$  では対照の 50% 程度の増殖抑制が見られた。1,000  $\mu\text{g/ml}$  で完全な細胞変性を起こすことは他の薬剤と同様であった。

Fig. 2 に HeLa 細胞の増殖に対する各薬剤の影響を示した。ヒト子宮ガン由来のこの細胞に対しては NFLX が最も強い毒性を示し、わずか  $1 \mu\text{g/ml}$  で軽い影響が現れたが、DL-8280 と NA では  $10 \mu\text{g/ml}$  までほとんど影響が見られなかった。しかし  $100 \mu\text{g/ml}$  では DL-8280, NFLX とともに強い増殖抑制作用を示した。

Neuroblastoma 18 細胞に対する DL-8280, NFLX および NA の影響を Fig. 3 に示した。この場合も最も細胞毒性が顕著なものは NFLX であり、NA の毒性が最も低く、DL-8280 は両者の中間の細胞毒性を示した。

マウス線維芽細胞の初代培養に対しては、Fig. 4 のとおり DL-8280, NFLX, NA および PPA すべて  $10 \mu\text{g/ml}$  までは細胞毒性を示さなかったが、 $100 \mu\text{g/ml}$  では NFLX が完全に細胞を変性させ、DL-8280 は 30% 増殖を抑制したにとどまった。なお NA と PPA は  $100 \mu\text{g/ml}$

Fig. 3 Influence of DL-8280, NFLX and NA on the growth of the mouse neuroblastoma 18 cells

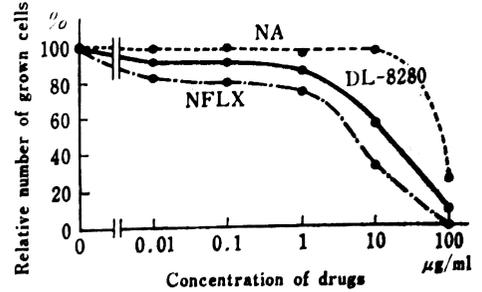
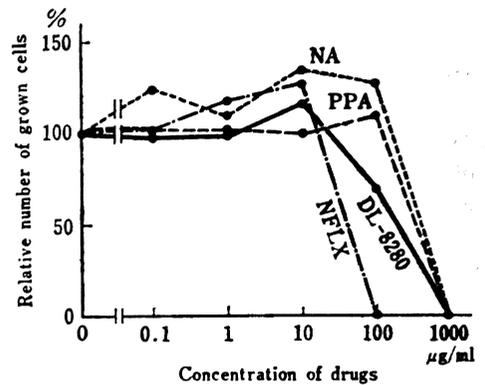


Fig. 4 Influence of DL-8280, NFLX and NA on the growth of mouse fetal fibroblasts



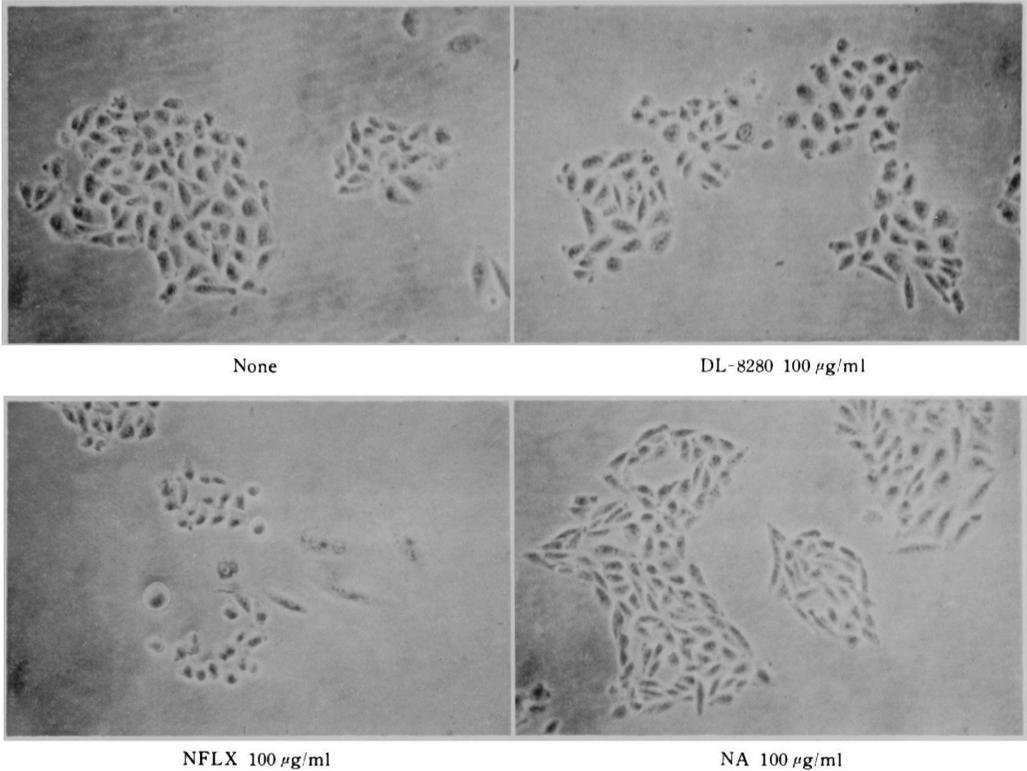
ml でもこの正常細胞に対しては毒性を示さなかった。4 薬剤すべて  $1,000 \mu\text{g/ml}$  では、細胞を完全に変性させた。

## 2) DL-8280, NFLX および NA の CHO-K1 細胞および HeLa 細胞に対する形態変化

つぎに CHO-K1 細胞の各薬剤による形態変化を検討した。顕微鏡では Fig. 5 のとおり、対照に比べ NA  $100 \mu\text{g/ml}$  添加ではほとんど形態変化を示さないが、NFLX  $100 \mu\text{g/ml}$  添加では増殖が抑えられるだけでなく多数の細胞変性が認められる。DL-8280  $100 \mu\text{g/ml}$  を加えた場合には増殖は強く抑えられているが、細胞変性は NFLX より軽度なようである。走査顕微鏡でこれらの細胞を検査すると、Fig. 6 のとおり NA  $100 \mu\text{g/ml}$  添加の細胞は対照とあまり変わらないが、DL-8280 または NFLX  $100 \mu\text{g/ml}$  では細胞の表面に多くの突起が現れ、全体の形も不規則になって強い影響を受けていることがわかる。

HeLa 細胞に対して各薬剤は Fig. 7 のような形態変化を与えた。すなわち、NA  $100 \mu\text{g/ml}$  でほとんど影響を与えなかったが、DL-8280 と NFLX は多くの細胞を強く変性した。

Fig. 5 Lightmicroscope of the CHO-K1 cells cultured for 3 days with or without 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of DL-8280, NFLX or NA



None

DL-8280 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ NFLX 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ NA 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 

### 3) DL-8280, NFLX および NA のマウス Neuroblastoma 18 細胞 に対する影響

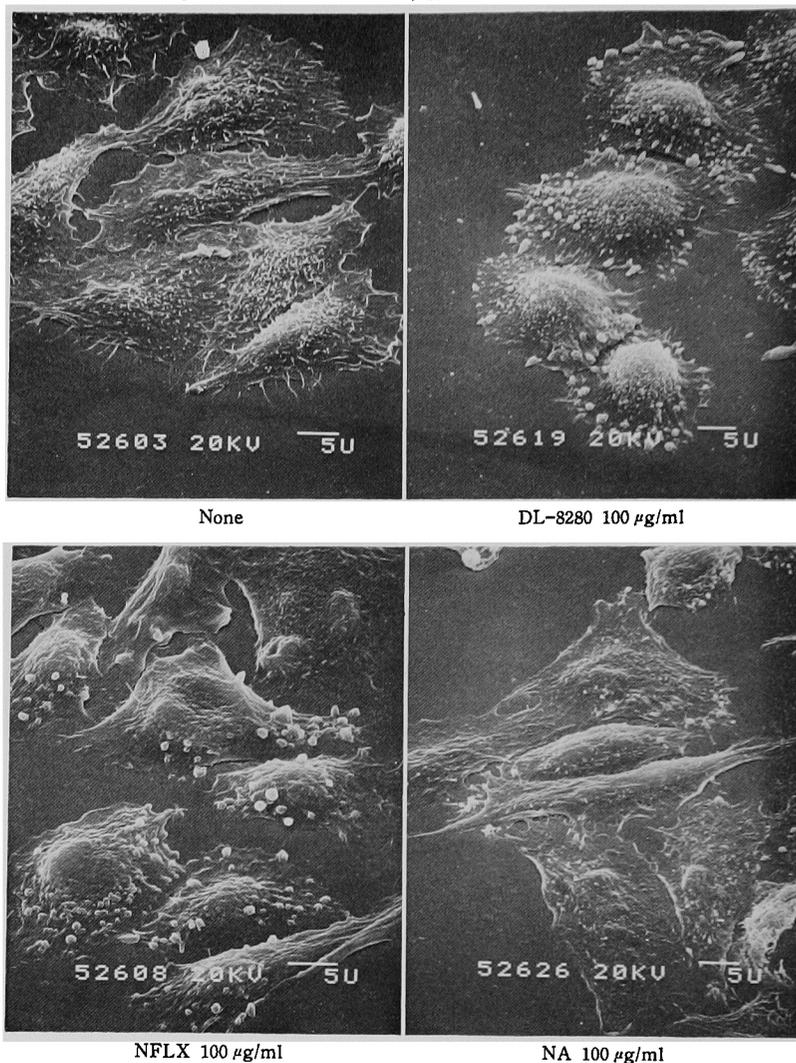
Fig. 8 のとおり 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の DL-8280, NA および NFLX は 7 日間神経芽細胞に接触させても全く変化を与えず、神経線維の伸長も良好に行われた。しかし Fig. 9~Fig. 12 に示すごとく 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加では、NFLX において 7 日目の細胞変性が相当認められ、神経線維の伸長もほとんど見られなかった。これに対し DL-8280 では対照とあまり変わらない正常な神経細胞の像が認められた。100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加になると NFLX では 24 時間後にほとんどの神経細胞を変性させたが、DL-8280 では 24 時間後はほとんど影響せず (Fig. 13)、3 日、5 日、7 日と日が経つにつれて細胞数の増加停止、細胞質の大型変形化等が認められたが、7 日目にも依然として生きた神経細胞が認められ神経線維の伸長も確認された。NA では DL-8280 よりさらに影響が少なかった (Fig. 14~Fig. 16)。

### III. 考 察

DNA 立体化酵素は一次構造の完成した二重鎖 DNA を基質とするので、DNA 一次構造の異なる生物間で酵素の性質に大きな差があることが想像される。従って

DNA 立体化酵素阻害剤であるピリドンカルボン酸系合成抗菌薬の中には、細菌の DNA gyrase は強く阻害するが、人体細胞のそれに対する影響の少ないものが存在しうる可能性はある。しかし以上の基礎理論が NA や PPA 等、すでに臨床で広く使われているものに対してさえ確立されている訳ではない。この抗菌薬の安全性は多分に経験的なものであり、未知の分野が多い。事実、永山および大木<sup>13)</sup>はマウス神経芽細胞 (Neuro 2A)、マウス線維芽細胞 (L)、ラット腎初代細胞およびヒト由来倍數本細胞 (WI 38) に対する NA と cinoxacin (CINX) の細胞毒性を比較し、両薬剤とも 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以下では WI 38 以外の細胞には毒性を示さないが、同時に使用したキノリンカルボン酸系の 1-ethyl-1, 4-dihydro-4-oxo-7-(4-pyridyl)-3 quinolinecarboxylic acid (TO-133) はかなり強い細胞毒性をもつことを明らかにした。また著者ら<sup>4)</sup>は NFLX, NA および PPA の *E. coli* および *S. aureus* に対する抗菌力と CHO-K1 細胞, HeLa 細胞, Neuroblastoma 18 細胞等に対する細胞毒性を比較し、少なくとも上記の 3 剤では抗菌力と高等動物細胞に対する細胞毒性が平行することを報告した。今回の DL-8280 の細胞毒性を検討すると、極めて興味深いことが類推で

Fig. 6 Scanning electronmicroscope of the CHO-K1 cells cultured for 3 days with or without 100 $\mu$ g/ml of DL-8280, NFLX or NA



None

DL-8280 100  $\mu$ g/mlNFLX 100  $\mu$ g/mlNA 100  $\mu$ g/ml

Table 1 Interrelationships between generation times and susceptibilities of cultured cells against DL-8280, NFLX and NA

Cells	Generation time	Cytotoxicity by		
		NA	DL-8280	NFLX
CHO-K1	^	<	>	
HeLa	^	<	<	
Neuroblastoma 18	^	<	<	
Fibroblast	^	<	<	

きる。すなわち、DL-8280 は Table 1 に示すとおり世代時間の短い CHO-K1 細胞に対しては NFLX と同程度の

強い細胞毒性を示すが、世代時間の長い Neuroblastoma 18 細胞やマウス線維芽細胞初代培養等に対しては、NFLX よりも細胞毒性が弱いことである。この薬剤は DNA 代謝が活発な腫瘍型細胞には強い毒性を示すが、世代時間の長い神経細胞やその他の正常細胞には毒性が弱い可能性がある。これがこの薬剤が臨床において比較的副作用の少ない理由の一つかもしれない。しかし正常な人体にも胎児期の体細胞や、成人の生殖細胞等比較的世代時間の短い細胞もあるので、それらのものに対する影響の検討がこの種の薬剤の将来にとって重要であろう。ここで使用された細胞は、特殊なものが多いので、この系統の薬剤を注射剤等で実用化するためには、さらに多くの研究を必要とすることを付け加えたい。

Fig. 7 Lightmicroscope of the HeLa cells cultured for 6 days with or without 100  $\mu$ g/ml of DL-8280, NFLX or NA

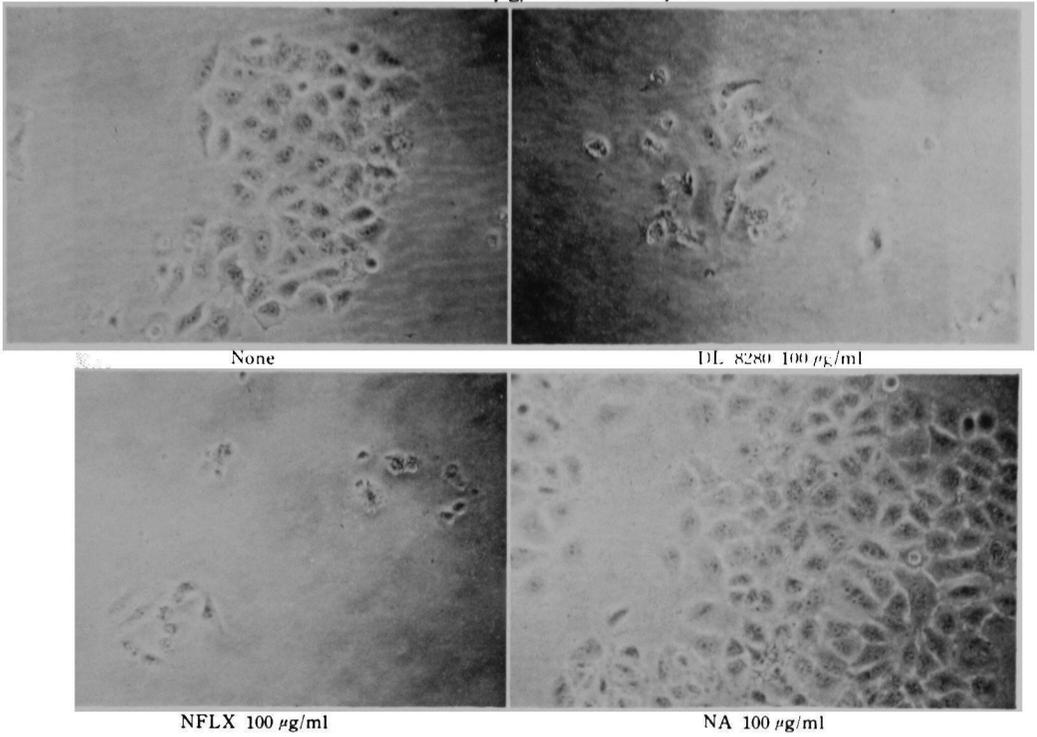


Fig. 8 Lightmicroscope of the mouse neuroblastoma 18 cells cultured for 7 days with or without 1  $\mu$ g/ml of DL-8280, NFLX or NA

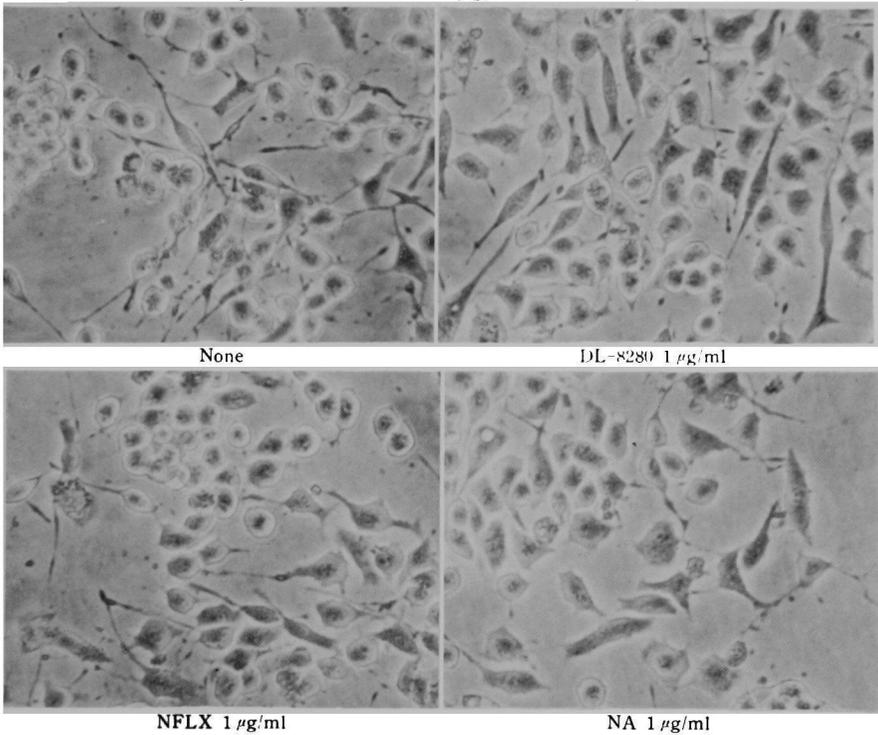


Fig. 9 Lightmicroscope of the mouse neuroblastoma 18 cells cultured for 24 hours with or without 10  $\mu$ g/ml of DL-8280, NFLX or NA

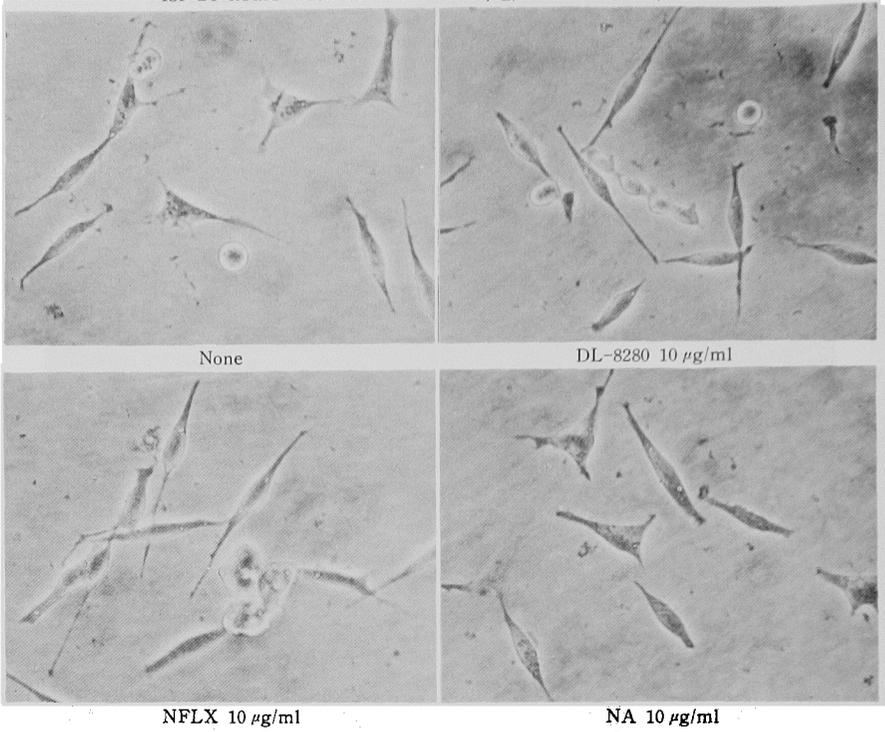


Fig. 10 Lightmicroscope of the mouse neuroblastoma 18 cells cultured for 3 days with or without 10  $\mu$ g/ml of DL-8280, NFLX or NA

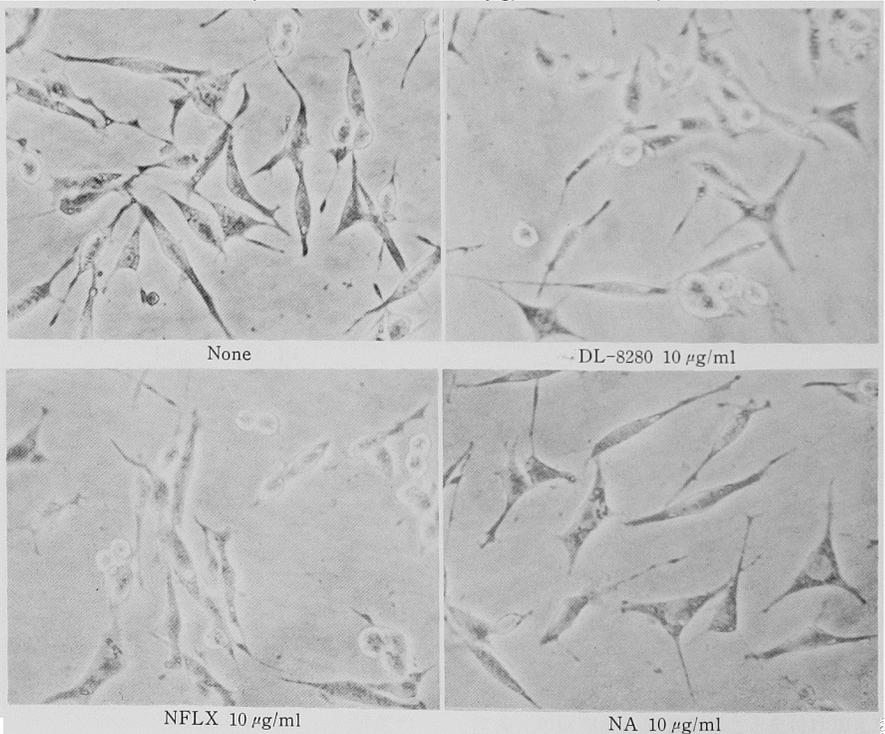


Fig. 11 Lightmicroscope of the mouse neuroblastoma 18 cells cultured for 5 days with or without 10  $\mu\text{g/ml}$  of DL-8280, NFLX or NA

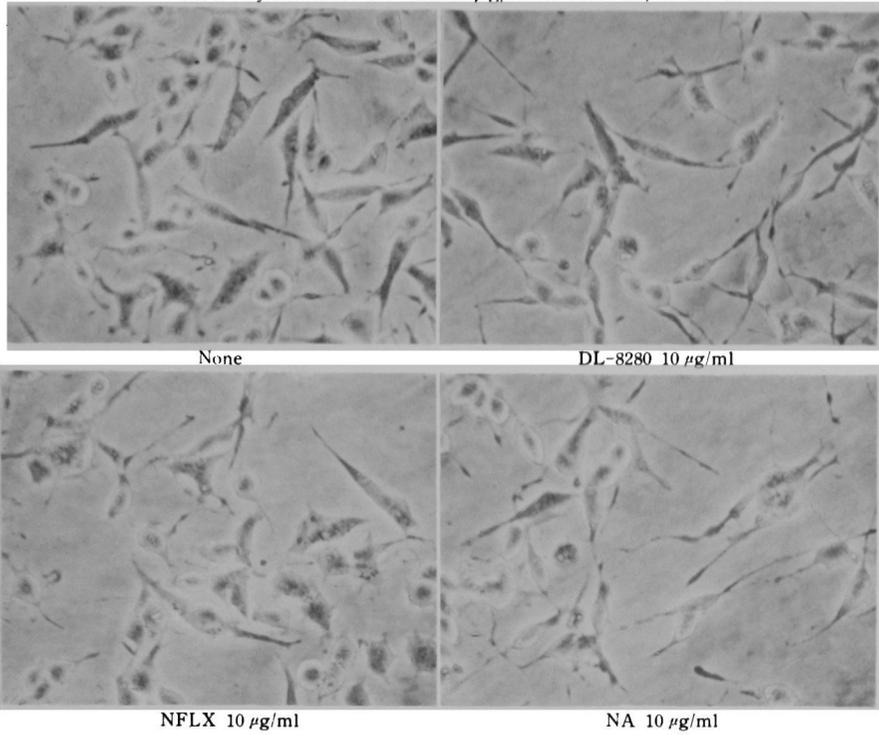


Fig. 12 Lightmicroscope of the mouse neuroblastoma 18 cells cultured for 7 days with or without 10  $\mu\text{g/ml}$  of DL-8280, NFLX or NA

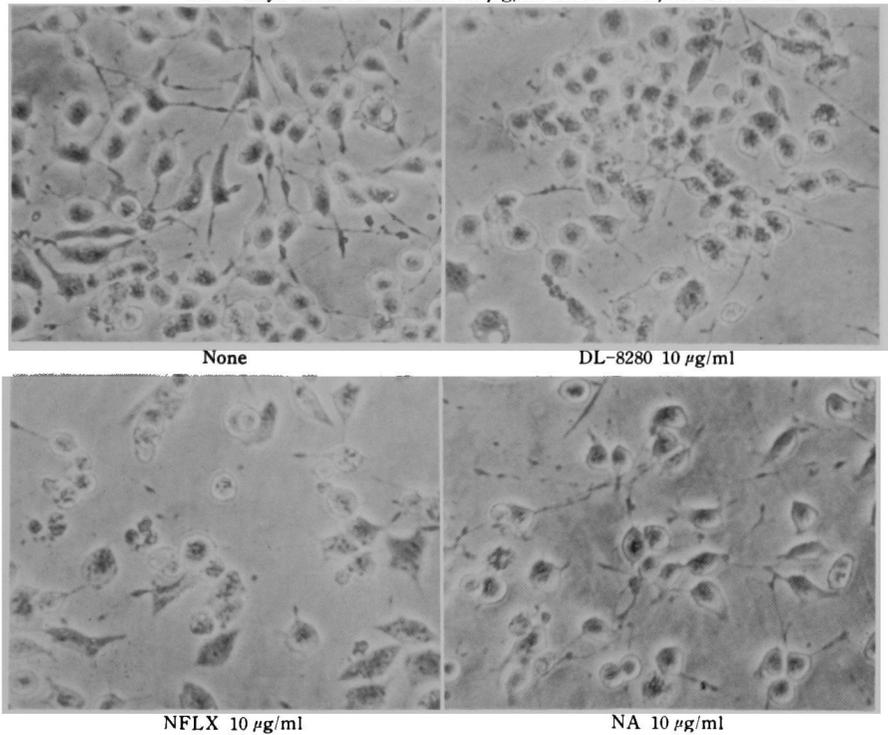


Fig. 13 Lightmicroscope of the mouse neuroblastoma 18 cells cultured for 24 hours with or without 100  $\mu\text{g/ml}$  of DL-8280, NFLX or NA

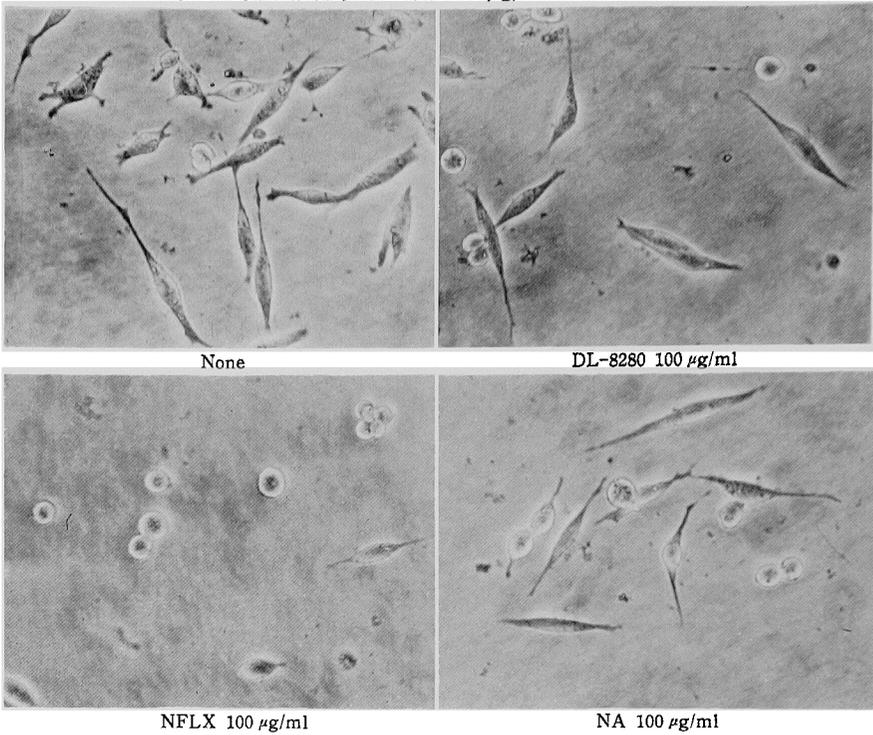


Fig. 14 Lightmicroscope of the mouse neuroblastoma 18 cells cultured for 3 days with or without 100  $\mu\text{g/ml}$  of DL-8280, NFLX or NA

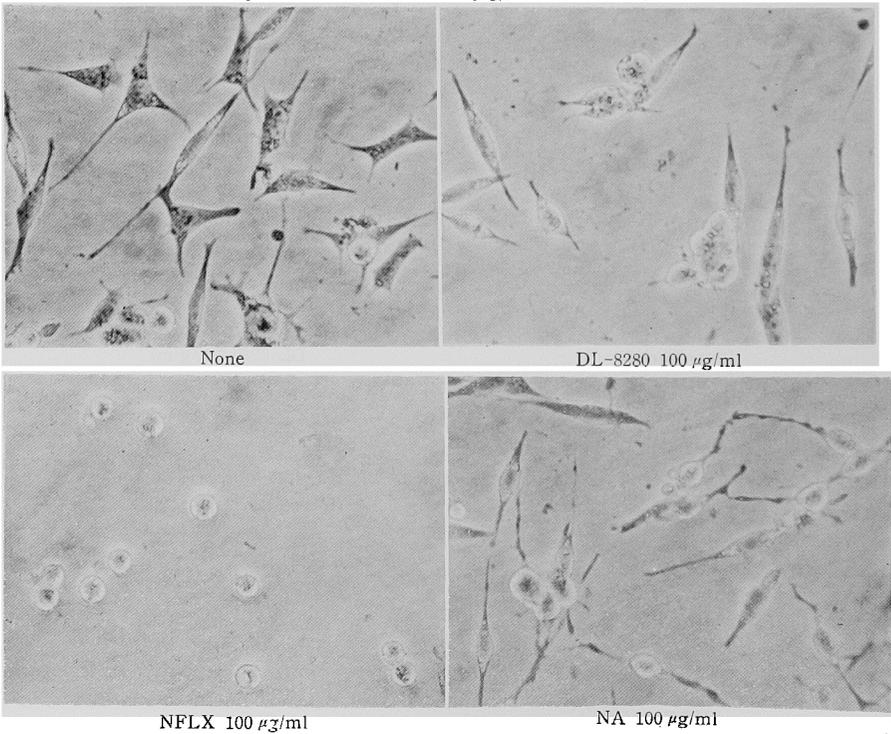


Fig. 15 Lightmicroscope of the mouse neuroblastoma 18 cells cultured for 5 days with or without 100  $\mu$ g/ml of DL-8280, NFLX or NA

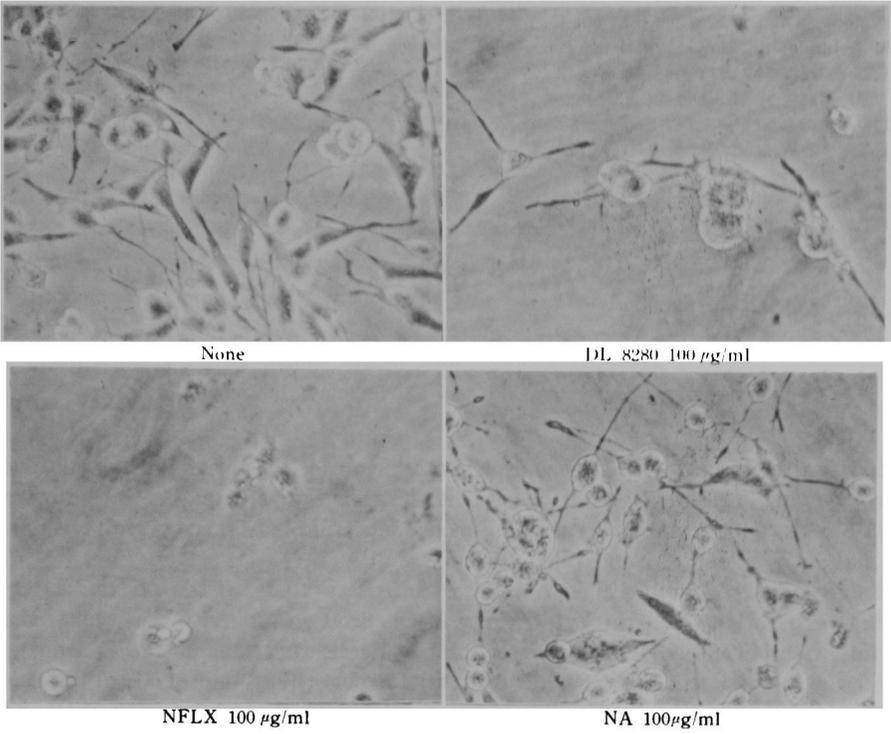
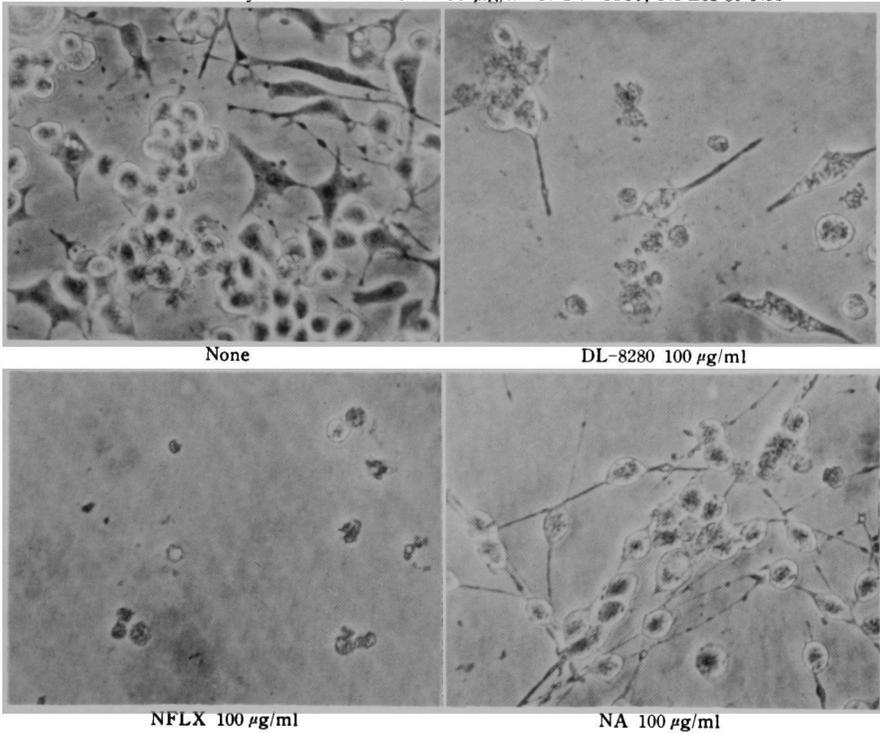


Fig. 16 Lightmicroscope of the mouse neuroblastoma 18 cells cultured for 7 days with or without 100  $\mu$ g/ml of DL-8280, NFLX or NA



## 文 献

- 1) MCKEEHAN, W. ; W.G. HAMILTON & R.G. HAM : Selenium is an essential trace nutrient for growth of WI 38 diploid human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 : 2023~2027, 1976
- 2) 横田 健, 関口玲子, 東 映子 : Cefmenoxime (SCE-1365) の各種  $\beta$ -lactamase および ペニシリン結合タンパク質に対する親和性と その抗菌力との関係。Chemo-therapy 28 (S-5) : 44~49, 1980
- 3) 永山在明, 大木一憲 : 組織培養法におよぼす各種薬剤の影響 第一報 : キノロンカルボニ酸系抗菌剤。Chemo-therapy 28 (S-4) : 400~405, 1980
- 4) 横田 健, 関口玲子 : AM-715 とナリジクス酸およびピペミド酸との動物細胞に対する毒性の比較。Chemo-therapy 29 (S-4) : 49~55, 1981

## STUDIES ON THE CYTOTOXICITY OF DL-8280

TAKESHI YOKOTA and REIKO SEKIGUCHI

Department of Bacteriology, School of Medicine, Juntendo University

To clarify the safety of DL-8280 as a chemotherapeutic, the cytotoxicity was investigated on tumor-type cells, Chinese hamster ovary CHO-K1 cells, human HeLa cells and mouse neuroblastoma 18 cells, and on normal type cells, mouse fetal fibroblasts, comparing with norfloxacin (NFLX) nalidixic acid (NA) and pipemidic acid (PPA).

Although DL-8280 exhibited a stronger cytotoxicity than NFLX on the CHO-K1 cells with a short generation time, the cytotoxicity of DL-8280 was found to be weaker than NFLX on the HeLa, neuroblastoma 18 and mouse fibroblast cells that possess rather long generation times. The cytotoxicity of DL-8280, however, was stronger than that of NA in the every cases. It was suggested that careful studies should be completed on the cytotoxicity of DL-8280 if the drug is planned to be developed for parenteral use that will give a high serum concentration.