

Lenampicillin hydrochloride (KBT-1585) およびその代謝物の 変異原性に関する研究

岩田寿雄・国場節子・有賀文彦・平松保造

(株)日本バイオリサーチセンター羽島研究所

能勢尚志

鐘紡株式会社薬品研究所

青山卓夫

鳥居薬品株式会社研究所

Lenampicillin hydrochloride (KBT-1585, LAPC) および diacetyl, acetoin, 2, 3-butanediol の変異原性について検討し、次の結果を得た。

1. 細菌を用いる復帰変異試験：KBT-1585 について *S. typhimurium* TA 100 および TA 98 に対して最高 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA 1535 および TA 1538 に対して 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$, TA 1537 に対しては 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$, さらに *E. coli* WP 2 *uvrA* に対しては 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度で, preincubation 法により検討したが, S-9 mix 添加ならびに無添加いずれにおいても変異原性は認められなかった。

diacetyl, acetoin および 2, 3-butanediol は 1~5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ の濃度で全菌株に対し plate 法により検討したが, S-9 mix 無添加の条件で変異原性は認められなかった。

2. マウスを用いる小核試験：KBT-1585 と diacetyl を単回および4回連続経口投与したが, 全赤血球中の多染性赤血球の割合は KBT-1585 の4回連続投与および diacetyl の 1,200, 2,400 および 300 \times 4 mg/kg 群で低値を示すものが散見されたが, 両被験物質とも小核の出現頻度には対照群との間に有意差がみられなかった。

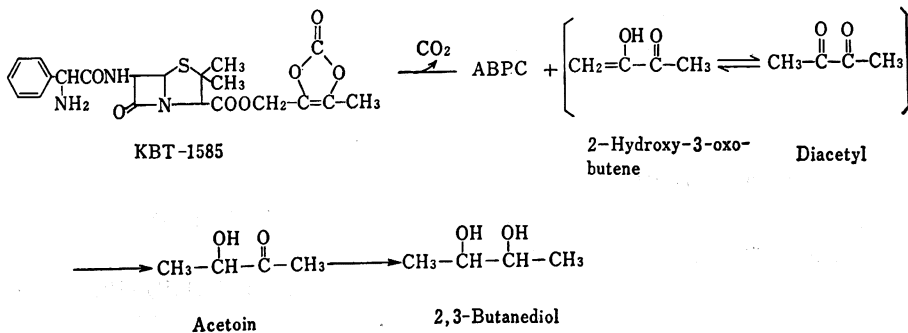
以上の結果により, KBT-1585 および diacetyl, acetoin, 2, 3-butanediol は細菌に対する突然変異誘発性を示さないものと考えられる。

また, KBT-1585 および diacetyl はマウス骨髄細胞に対して軽度の毒性を示す可能性が示唆されたが, 小核誘発性が認められないため, 生体における染色体異常誘発作用はないものと考えられる。

(5-Methyl-2-oxo-1, 3-dioxolen-4-yl) methyl-D- α -aminobenzyl penicillinate hydrochloride (Lenampicillin hydrochloride, KBT-1585) は鐘紡株式会社において Ampicillin の高い血中濃度が得られる抗菌剤として開発された Ampicillin の経口用 prodrug である。本剤はFig.1

示したように, 経口投与後消化管からの吸収過程で速やかに加水分解を受け, 生体中では抗菌作用を有する Ampicillin を生じるとともに, ester-moiety である oxodioxolenyl 基の代謝物として, acetoin および 2, 3-butanediol が見出されている。

Fig. 1 Metabolic pathway of KBT-1585



さらに、ラット肝ホモジネートとの incubation による *in vitro* 試験では代謝中間体として diacetyl が検出されている。

KBT-1585 の安全性については、急性、亜急性および慢性毒性、生殖試験が行なわれており、本剤に特有な毒性所見は認められていない。

今回、安全性試験の一環として KBT-1585 および ester-moiety の主代謝物の変異原性を AMES の方法¹⁾により検討するとともに、KBT-1585 および diacetyl については小核試験を実施したので、その成績を報告する。

I. 試験材料および方法

1. 被験物質および対照物質

KBT-1585, diacetyl, acetoin および 2, 3-butanediol は 鐘紡株式会社薬品研究所より入手した。

なお、acetoin は不安定なため、試験には水に溶解後、速やかに acetoin に変換する acetoin dimer を使用した。

陽性対照物質としては 4-nitroquinoline-N-oxide (和光純薬)、9-aminoacridine hydrochloride (Aldrich)、N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (半井化学)、sodium azide (和光純薬)、2-aminoanthracene (和光純薬)、Mitomycin C (MMC, 協和発酵) を用いた。

2. 細菌を用いる復帰変異試験

1) 被験物質の調製

各被験物質は滅菌蒸留水に溶解し、5,000 $\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ 溶液を調製し、それ以下の濃度の検体溶液は希釈法により調製した。

2) 試験に用いた菌株

試験菌株である *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98, TA 1535, TA 1537, TA 1538 は 1980 年に国立衛生試験所より、また *Escherichia coli* WP2uvrA は 1980 年に東京大学医科学研究所より分与を受けた。これらの菌株は、菌懸濁液 0.8 ml に *S. typhimurium* の場合は Dimethyl sulfoxide を、*E. coli* の場合は 50 w/w% Glycerol を 0.07 ml 加えてドライアイスアセトンで凍結し、 -80°C に保存した。

試験時には Nutrient-Broth (OXOID) 培地に植菌し、 37°C で 14 時間振盪培養して用いた。

試験菌の特性については、アミノ酸要求性、紫外線感受性、膜変異 *rfa* 特性および薬剤耐性因子 R-factor プラスミドの有無などの適合性を確認した。

3) S-9 mix

S-9 は、7 週齢の Crj: CD (SD) 系雄ラット (平均体重 $192.5 \pm 7.9\text{g}$, 日本チャールス・リバー) に 30 mg/kg の phenobarbital を腹腔内投与後、さらに 2, 3, 4 日目に、60 mg/kg を投与し併せて、80 mg/kg の 5, 6-benzoflavanone を 3 日目に投与し、最終投与の翌日に摘

出した肝臓から調製されたもの (オリエンタル酵母) を用いた。

S-9 mix は、S-9 mix 用の cofactor (オリエンタル酵母) を蒸留水で溶解、millipore filter (HA type) で濾過滅菌した後、使用直前に S-9 を加えて調製した。S-9 mix は 1 ml 中に S-9 0.1 ml, MgCl_2 8 μmol , KCl 33 μmol , G-6-P 5 μmol , NADH 4 μmol , NADPH 4 μmol , Na-リン酸緩衝液 100 μmol を含んでいる。

4) 培地

最少グルコース寒天平板培地は、VOGEL-BONNER 最少培地 E にグルコース 2%, 粉末寒天 (松栄寒天) 1.5% の割合になるようそれぞれ高圧蒸気滅菌後混合した。これを直径 90 mm の γ 線滅菌されたシャーレ (Falcon, 1001 type) に分注し、固化させて平板としたものを用いた。

トップアガーは Bacto-Agar (DIFCO) 0.6 w/w% および NaCl 0.5 w/w% の割合で調製し、高圧蒸気滅菌したものに、*S. typhimurium* の場合は 0.5 mmol L-histidine と 0.5 mmol L-biotin の水溶液を、*E. coli* の場合は 0.5 mmol L-tryptophan 水溶液を millipore filter (HA type) で濾過滅菌した後、10:1 の割合で混合して用いた。

5) 試験方法

検体濃度は試験菌に対して生育阻害を示す濃度もしくは 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ を上限として、8 段階を設定した。

また対照として溶媒対照および陽性対照を別に設けた。

KBT-1585 は preincubation 法を用いて、代謝活性化によらない場合 (S-9 mix 無添加) ならびに代謝活性化による場合 (S-9 mix 添加) で実施し、diacetyl, acetoin, 2, 3-butanediol は plate 法により S-9 mix 無添加の条件で実施した。

すなわち、滅菌試験管に ① 検体溶液 0.1 ml, ② 0.1 mol Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4) あるいは S-9 mix 0.5 ml, および ③ 菌懸濁液 0.1 ml の順に加え、preincubation 法の場合は 37°C で 20 分間 preincubation を行なった。次いでトップアガー 2 ml を加えて混合したのち、最少グルコース寒天平板培地上にまき広げ、 37°C で 48 時間培養した。試験菌の生育阻害の状況は 100 倍の顕微鏡下で lawn の生育状態を観察することにより調べ、plate 上での析出物の有無は肉眼的に観察した。復帰変異コロニー数の計測には、各濃度ごとに 3 枚の平板培地を用い、その平均値を求めた。

3. マウスを用いる小核試験

1) 試験動物

7 週齢の Crj: CD-1 (ICR) 系雄マウス (日本チャールス・リバー) を室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ の条件下

で1週間予備飼育した後、1群5匹として試験に供した。試験開始時の体重は33.3~37.8gであった。飼育期間中は固型飼料(NMF, オリエンタル酵母)および水道水を自由に摂取させた。

2) 投与量, 投与期間および投与方法

KBT-1585はLD₅₀値(8,295 mg/kg, p.o.)²⁾にほぼ相当する8,000 mg/kgを最高用量とし、以下4,000, 2,000, 1,000 mg/kgの4群を設定し、それぞれ単回投与した。また、1,000 mg/kgを24時間間隔で4回連続投与した1群を別に設けた。さらに対照群として溶媒(蒸留水)を単回投与した群と陽性対照としてMMC 2mg/kgを

単回投与した群を別に設けた。

diacetylについてもKBT-1585と同様な方法で群設定を行なった。単回投与群は2,400(LD₅₀: 2,408mg/kg, p.o.)²⁾, 1,200, 600, 300 mg/kgを、4回連続投与群として300 mg/kgを設け、さらに溶媒対照群(蒸留水)と陽性対照群(MMC, 2mg/kg)とした。

両被験物質とも0.1 ml/10g体重となるよう用時調整して金属製胃ゾンデによって経口投与し、MMCは腹腔内投与とした。

3) 標本作製

単回投与群では、投与30時間後に、また4回連続投

Table 1 Revertant mutation test on KBT-1585 in bacterial strains in the absence or presence of S-9

Test substance	Concentration (μg/plate)	No. of revertant colonies per plate ^{c)}					
		Base-pair substitutions type			Frame shift type		
		TA100 - ^{a)} + ^{b)}	TA1535 - +	WP2 uvrA - +	TA98 - +	TA1537 - +	TA1538 - +
Vehicle control (Distilled water)		151 150	13 15	17 21	20 21	6 10	22 22
KBT-1585	0.005	—	—	—	—	6 9	—
	0.01	—	15 15	16 19	—	5 8	20 22
	0.05	—	13 13	19 20	—	7 7	20 21
	0.1	—	14 14	20 26	—	6 5	20 22
	0.5	—	14 15	23 22	—	6 7	20 20
	1	167 155	14 15	22 24	18 21	6 6	20 22
	5	162 167	14 13	23 23	17 21	5 5	21 20
	10	161 162	14 13	21 16	15 19	1* 1*	18 5
	50	161 163	6* 1*	1* 0*	15 17	—	6* 0*
	100	162 160	—	—	16 20	—	—
500	149 156	—	—	14 18	—	—	
1,000	176 167	—	—	16 20	—	—	
5,000	113* 120	—	—	19 21	—	—	
4-Nitroquinoline-N -oxide	0.025	458 —	—	—	—	—	—
	0.2	—	—	—	342 —	—	—
	0.25	—	—	—	—	—	187 —
Sodium azide	0.5	—	135 —	—	—	—	—
9-Aminoacridine	80	—	—	—	—	488 —	—
N-Ethyl-N'-nitro-N -nitrosoguanidine	2	—	—	416 —	—	—	—
2-Aminoanthracene	0.5	— 465	—	—	— 229	—	— 248
	2	—	— 143	—	—	— 160	—
	80	—	—	— 411	—	—	—

* : Growth inhibition of tester strain

a) : Absence of S-9 mix

b) : Presence of S-9 mix

c) : An average of 3 plates

Table 2 Revertant mutation test on diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol in bacterial strains in the absence of S-9

Test substance	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	No. of revertant colonies per plate ^{a)}					
		Base-pair substitutions type			Frame shift type		
		TA100	TA1535	WP2 uvrA	TA98	TA1537	TA1538
Vehicle control (Distilled water)		160	12	23	14	7	20
Diacetyl	1	175	9	21	14	7	15
	5	174	11	26	11	8	16
	10	179	10	29	11	6	13
	50	164	10	30	14	6	16
	100	182	18	32	14	5	17
	500	214	10	29	17	9	20
	1,000	202	12	29	12	10	23
	5,000	0*	0*	26*	16*	0*	0*
Acetoin	1	173	14	18	17	5	14
	5	182	11	22	18	6	19
	10	177	10	17	14	4	16
	50	165	18	26	16	10	23
	100	156	11	30	15	7	23
	500	164	14	25	17	6	17
	1,000	174	13	27	17	8	20
	5,000	177	13	26	17	12	20
2,3-Butanediol	1	153	11	17	24	10	19
	5	179	14	19	22	7	16
	10	182	11	19	21	6	17
	50	176	12	15	17	7	20
	100	169	14	27	32	5	14
	500	161	15	28	21	9	18
	1,000	172	15	29	22	6	15
	5,000	174	13	36	25	7	19
4-Nitroquinoline-N-oxide	0.025	444	—	—	—	—	—
	0.2	—	—	—	280	—	—
	0.25	—	—	—	—	—	156
Sodium azide	0.5	—	132	—	—	—	—
9-Aminoacridine	80	—	—	—	—	641	—
N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	2	—	—	478	—	—	—

* : Growth inhibition of tester strain

a) : An average of 3 plates

与群では最終投与から24時間後に標本を作製した。

マウスを頸椎脱臼により屠殺したのち、大腿骨を摘出し、大腿骨断端より牛胎仔血清 (GIBCO) を約0.5ml 注入して流出した骨髓細胞を各個体ごとに遠沈管に集めた。さらに1,000 rpm, 5分間遠心し、上清液を除去後、底にわずかに残った上清液で骨髓細胞を再浮遊させ、その一滴をスライドグラスに塗抹した。室温下で一晩乾燥後methanol中で5分間固定し、ただちに2.8% Giemsa液で約30分間染色した。

4) 標本観察

個体当たり1,000個の多染性赤血球を観察し、その中の小核を有する細胞数を計測した。同時に全赤血球中に占める多染性赤血球の割合を求めた。

5) 統計学的処理法

投与群と対照群の有意差検定に際しては、小核を有す

る多染性赤血球の割合は二項検定法³⁾を用い、全赤血球中の多染性赤血球の割合はSTUDENTのt検定法を用いた。

II. 試験成績

1. 細菌を用いる復帰変異試験

KBT-1585の結果およびdiacetyl, acetoinおよび2,3-butanediolの結果をそれぞれTable 1およびTable 2に示す。

KBT-1585は試験菌に対し比較的低濃度で生育阻害作用を示したため、Ampicillinに耐性であるTA 100およびTA98以外の試験菌株については50 µg/plate以下で検討した。Table 1および2からも明らかなように、KBT-1585, diacetyl, acetoin および 2, 3-butanediol によって誘発された復帰変異コロニー数/plateは溶媒対照の値に近似しており、有意な増加は認められなかった。

Table 3 Micronucleus test on bone-marrow in mice at single and four times oral administration with KBT-1585

Dose (mg/kg)	No. of mice	No. of PCE	Frequency of MNPCE (%) (Range)	Frequency of PCE (%) (Range)
Control	5	5,000	0.20 (0.1~0.3)	50.74 (43.8~55.6)
1,000	5	5,000	0.24 (0.1~0.5)	50.50 (48.6~54.4)
2,000	5	5,000	0.22 (0.1~0.3)	48.48 (44.6~54.2)
4,000	5	5,000	0.12 (0.1~0.2)	53.56 (44.9~56.4)
8,000	5	5,000	0.28 (0~0.5)	52.52 (39.4~61.9)
1,000 × 4	5	5,000	0.18 (0~0.4)	34.58# (25.5~43.9)
MMC 2	5	5,000	7.08** (4.4~9.1)	35.14# (23.6~46.1)

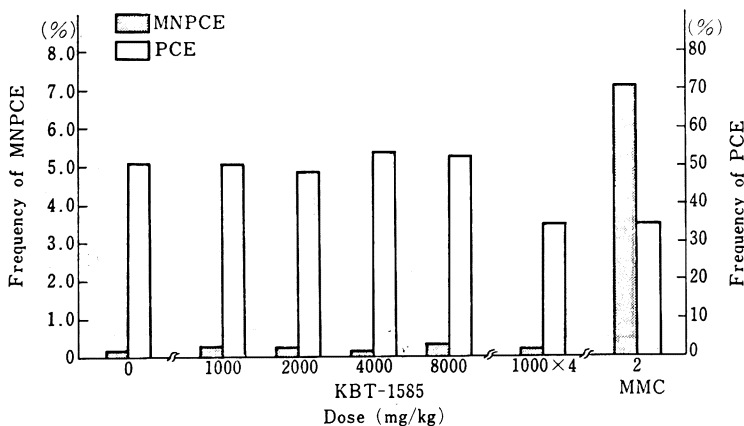
** : Significantly different from the control at $P < 0.01$ (binominal test)

: Significantly different from the control at $P < 0.01$ (t-test)

PCE : Polychromatic erythrocytes

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes

Fig. 2 Micronucleus test on bone-marrow in mice at single and four times oral administration with KBT-1585



なお、プレート上での析出物は全く認められなかった。

2. マウスを用いる小核試験

KBT-1585 による小核試験の結果を Table 3 に示す。本剤による動物死亡例は認められなかった。

KBT-1585 の単回投与群および4回連続投与群ともに小核の出現頻度は対照群との間に差がみられなかった。一方, MMC 投与群では対照群の 0.20% に対して 7.08% と有意 ($P < 0.01$) に増加した。全赤血球に対する多染性赤血球の割合は KBT-1585 の単回投与群では対照群との間に差はみられなかったが, 4回連続投与群では対照群が 50.74% であるのに対して 34.58% と有意 ($P < 0.01$) に減少した。MMC 投与群においても 35.14% と有意 ($P < 0.01$) に減少した。

diacetyl の 2,400 mg/kg 投与群では4匹が死亡した。本剤の小核観察の結果を Table 4 に示す。

小核の出現頻度は単回投与群および4回連続投与群ともに対照群との間に差はみられなかった。一方, MMC 投与群は対照群の 0.18% に対して 7.90% と有意 ($P < 0.01$) に増加した。全赤血球中の多染性赤血球の割合も同様単回投与群および4回連続投与群ともに対照群との間に差はみられなかった。しかしながら個体によっては 1,200, 2,400 mg/kg および 300 mg/kg × 4 投与群で稀に低値を示すものが存在した。MMC 投与群は 37.44% と有意 ($P < 0.01$) に減少した。

III. 考 察

AMES 法¹⁾ により開発された細菌を用いる復帰変異試験 (いわゆる AMES テスト) は癌原性との相関が比較的

Table 4 Micronucleus test on bone-marrow in mice at single and four times oral administration with diacetyl

Dose (mg/kg)	No. of mice	No. of PCE	Frequency of MNPCE (%) (Range)	Frequency of PCE (%) (Range)
Control	5	5,000	0.18 (0~0.4)	52.12 (40.7~57.4)
300	5	5,000	0.20 (0~0.6)	55.76 (45.7~62.5)
600	5	5,000	0.02 (0~0.1)	51.38 (42.0~57.6)
1,200	5	5,000	0.24 (0.1~0.4)	47.64 (31.5~59.4)
2,400	5	1,000 ^{a)}	0.2	38.2
300 × 4	5	5,000	0.16 (0.1~0.3)	45.64 (39.8~50.0)
MMC 2	5	5,000	7.90** (6.4~10.7)	37.44## (29.4~41.9)

** : Significantly different from the control at $P < 0.01$ (binominal test)

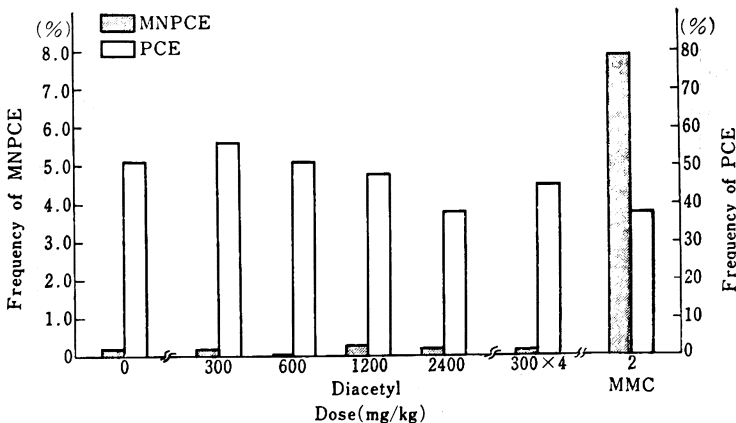
: Significantly different from the control at $P < 0.01$ (t-test)

PCE : Polychromatic erythrocytes

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocytes

a) : Not include died mice

Fig. 3 Micronucleus test on bone-marrow in mice at single and four times oral administration with diacetyl



よく検討され、簡便に実施できることから現在最も広く用いられている変異原性試験の一つである。

一方、化学物質の遺伝毒性および癌原性の有無を推測するための *in vivo* における変異原性試験の一つとして SCHMID⁴⁾により開発された小核試験は、染色体異常を直接観察する代りに、染色体切断作用や紡垂体機能の阻害作用の結果形成される小核 (micronucleus) の有無を観察し、被験物質の染色体異常誘発能を推定するものである。

今回、KBT-1585 および diacetyl, acetoin, 2, 3-butanediol の変異原性の有無を検討する目的で、これらの試験を実施した。

AMES 試験において、KBT-1585 はいずれの菌に対しても、S-9_{mix} 添加および無添加の条件で復帰変異コロニー数の増加を示さず、また diacetyl, acetoin および 2, 3-butanediol も同様に増加を示さなかった。

KBT-1585 と同様に Ampicillin の prodrug である Talampicillin, Bacampicillin の変異原性についての報告は見当らず、その有無は明らかではないが、KBT-1585 および Ampicillin について ROSENKRANZ⁵⁾ は *S. typhimurium* による AMES 試験で変異原性は認められなかったと報告している。一方、diacetyl に関して BJELDANES⁶⁾ はバター、ビール、コーヒー等の食品中の芳香成分としての diacetyl の変異原性試験を実施し、*S. typhimurium* TA 98 では影響がなかったものの、TA 100 では弱い復帰変異コロニー数の増加があったと報告している。その後、FLORIN⁷⁾ はタバコの煙中の成分としての diacetyl (2, 3-butanedione) について、TA 100 による AMES 試験で変異原性を認めておらず、さらに ROSENKRANZ⁵⁾ は、ketone 体や aldehyde 体の突然変異誘発性に感受性が優れている TA 102 による AMES 試験でも変異原性陰性の成績を得ている。以上の結果から、KBT-1585 および acetoin, 2, 3-butanediol は遺伝子

突然変異誘発性は有していないと結論された。また、diacetyl は前述のごとく弱い突然変異誘発性を示唆する成績はあるものの、変異原性を示さない報告も多く、今回我々が実施した AMES 試験においても遺伝子突然変異誘発性は認められなかった。

また、小核試験においては、骨髄に対する影響を示唆する全赤血球中の多染色赤血球の割合は KBT-1585 の連続投与群および diacetyl の 2, 400, 1, 200 および 300 mg/kg×4 投与群で低値を示す個体が散見された。しかし、小核の出現頻度は KBT-1585 および diacetyl は単回投与および連続投与でも対照群と差がみられなかった。この結果から KBT-1585 および diacetyl は染色体異常誘発性を有しないと結論された。

文 献

- 1) AMES, B. N.; J. McCAN & E. YAMASAKI: Method for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31: 347~363, 1975
- 2) 鐘紡株式会社: 未報告
- 3) KASTENBAUM, M. A. & K. O. BOWMAN: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Res.* 9: 527~549, 1970
- 4) SCHMID, W.: The micronucleus test. *Mutation Res.* 31: 9~15, 1975
- 5) YAMABE, S.; E. C. McCOY & H. S. ROSENKRANZ: Non-mutagenicity of KBT-1585, a novel ester of ampicillin. *Chemioterapia*, Vol. III-n. 1-February, 1984
- 6) BJELDANES, L. F. & H. CHEW: Mutagenicity of 1, 2-dicarbonyl compounds: maltol, kojic acid, diacetyl and related substances. *Mutation Res.* 67: 367-371, 1979
- 7) FLORIN, I.; L. RUTBERG; M. CURVELL & C. R. ENZELL: Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test. *Toxicology*, 18: 219-232, 1980

THE MUTAGENICITY OF LENAMPICILLIN HYDROCHLORIDE (KBT-1585) AND ITS METABOLITES

TOSHIO IWATA, SETSUKO KOKUBA, FUMIHIKO ARIGA and YASUZO HIRAMATSU

Nihon Bioresearch Center Inc. Hashima Laboratory

TAKASHI NOSE

Pharmaceuticals Research Center, Kanebo, Ltd.

TAKUO AOYAMA

Research Laboratories, Torii & Co., Ltd.

The mutagenicity of Lenampicillin hydrochloride (KBT-1585), diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol was tested using *S. typhimurium* TA 100, TA 1535, TA 98, TA 1538, TA 1537 and *E. coli* WP 2 uvr A.

The micronucleus test using mouse bone-marrow cells was also conducted for KBT-1585 and diacetyl.

The results were as follows ;

1. Reverse mutation test in bacteria

KBT-1585 exhibited no demonstrable mutagenicity for any of the above bacterial strains in the absence or presence of S-9 mix by a preincubation method. Diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol exhibited no demonstrable mutagenicity to all these strain at the concentration ranging from 1 to 5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ by a plate method.

2. Micronucleus test in mice

The frequency of the micronucleated polychromatic erythrocytes in the bone-marrow of mice treated with KBT-1585 did not differ significantly from that in the control group, although the polychromatic erythrocytes decreased significantly in the group treated with KBT-1585. There was no difference in the frequency of the micronucleated polychromatic erythrocytes between the diacetyl treated group and control group.

In conclusion, it was suggested that KBT-1585, diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol had no mutagenic activity in bacteria, and that both KBT-1585 and diacetyl had no micronucleus-inducing capacity in the mouse bonemarrow erythrocytes.