

NY-198の哺乳動物細胞におよぼす影響

越 浦 良 三・宮 本 謙 一・涌 沢 伸 哉

北陸大学薬学部創薬研究施設

NY-198の安全性を確認する目的で、ヒト子宮頸癌 HeLa-S3, ヒト神経芽細胞腫 IMR32, ヒト胎児肺由来細胞 HEL, ラット神経膠腫 C6BU-1, ラット正常肝由来細胞 BRL-3A, チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 CHO-K1, マウス神経芽細胞腫 N18TG-2, マウス胎仔由来細胞 NIH3T3, および、マウス胎仔初代培養細胞の9種の哺乳動物細胞に対する細胞毒性を検討し、pipemidic acid (PPA), ofloxacin (OFLX) および norfloxacin (NFLX) のそれと比較した。NY-198の細胞毒性については、いずれの細胞に対しても PPA や OFLX と同程度で、NFLX よりかなり低く、安全性は比較的高いものと思われた。NY-198の各細胞に対する50%増殖抑制濃度 (IC_{50}) は、各種細菌に対する MIC よりも著しく大きく、抗菌剤として選択性が高いことが確認された。また本剤の細胞毒性は傾向として腫瘍由来細胞に対して強く、正常組織由来細胞に対しては弱いことも明らかとなった。

抗生物質に対する耐性菌の増加が著しく、その対策を講じる必要性が迫られているなかで、これら耐性菌に有効かつ広い抗菌スペクトルを有するピリドンカルボン酸系合成抗菌剤の開発が、近年急激に進められている。NY-198は北陸製薬㈱中央研究所において開発されたフッ素置換キノロンカルボン酸誘導体であり、その抗菌力と抗菌スペクトルは pipemidic acid (PPA) をはるかに凌ぎ、ofloxacin (OFLX) や norfloxacin (NFLX) と同程度であるが¹⁾、経口吸収が良好であるという特徴を有する薬剤である²⁾。

一方、本剤の急性、亜急性毒性試験等がなされ、安全性の高さも示唆されている^{3,4)}。また、永山、大木⁵⁾および横田、関口^{6,7)}は、キノロンカルボン酸系抗菌剤の細胞毒性を試験することより、薬剤の選択毒性和安全性を判定することの可能性を提示している。

本研究は、8種の哺乳動物由来の樹立細胞とマウス胎仔初代培養細胞に対する NY-198の細胞毒性を検討し、本剤の安全性の基礎を与えることを目的に行なった。

I 材料および方法

1) 使用薬物

NY-198は北陸製薬株式会社より、ofloxacin(OFLX)は第一製薬株式会社よりそれぞれ分与された薬物を用いた。Norfloxacin (NFLX, 杏林製薬株式会社) および pipemidic acid (PPA, 大日本製薬株式会社) は、それぞれ市販のものより抽出した free base を用いた。実験には各薬剤を培養液に直接溶解して用いた。

2) 培養細胞

HeLa-S3および BRL-3A は教室保存株、また HEL, IMR32は北陸大学薬学部微生物学教室、福田教授より、C6BU-1, N18TG-2は金沢大学がん研究所薬理部、三木教授より、NIH3T3, CHO-K1は金沢大学薬学部放射薬品化学教室、二階堂教授よりそれぞれ分与されたものを用いた。さらに、妊娠後期の ICR マウスの胎仔の初代培養細胞を使用した。これらの細胞の由来組織および細胞型を Table 1 に一括して示す。

3) 培地

HEL, HeLa-S3, BRL-3A, NIH3T3, および CHO-K1 細胞は、10%牛胎仔血清 (GSL) 添加 Eagle's minimum essential medium (MEM, 日本) 中37℃の5% CO₂インキュベーター (池本理化) にて培養した。N18TG-2, C6BU-1, IMR32 細胞には10%牛胎仔血清添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO) を使用し、37℃の10% CO₂インキュベーター (ヤマト) 中で培養した。また、マウス胎仔初代培養は10%牛胎仔血清添加 Eagle's MEM 中、37℃の5% CO₂インキュベーターにて行なった。

4) 細胞毒性の検討

Falcon plastic Petri dish (3001)に各細胞0.5~1×10⁵個と、各種濃度の被験薬を含む培地2mlを入れ、上記条件下培養した。被験薬と細胞の接触時間は、各無処置細胞の増殖が confluent な状態になるまでとした。

培養終了後、培地上清を除き、0.01% trypsin (0.02% EDTA 溶液) にて37℃で約10分間処理して遊離細胞

Table 1. Origin and morphology of cell lines used in this study

Name	Origin	Morphology
HEL	Human embryonic lung	Fibroblast
HeLa-S3	Human uterine cancer	Epithelial
IMR32	Human neuroblastoma	Neuron-like
BRL-3A	Rat normal liver	Epithelial
C6BU-1	Rat glioma	Neuron-like
Mouse primary culture cells		Mixture of fibroblast and epithelial cells
NIH3T3	Mouse embryo	Fibroblast
N18TG-2	Mouse neuroblastoma	Neuron-like
CHO-K1	Chinese hamster ovary cell	Epithelial

とし、血球計算板上で顕微鏡下細胞数を計数した。なお、N18TG-2 細胞については、1 mM dibutyl cyclic AMP (dbc AMP, Sigma) 存在下の細胞増殖および神経細胞の分化（神経線維の伸長）に対する薬剤の効果も検討した。

HeLa-S3, N18TG-2 細胞については、それらの形態変化を位相差顕微鏡写真撮影装置（ニコン）により記録した。

II 実験成績

1) NY-198とPPA, OFLXおよびNFLXの細胞増殖抑制作用の比較

各薬剤の種々の培養細胞の増殖におよぼす dose response curve を Fig. 1～10に示す。また、それぞれの薬剤の各細胞に対する50%増殖抑制濃度 (IC_{50}) を Table 2に一括して示す。NY-198, PPA および OFLX の各細胞に対する dose response curve はいずれも極めて近似しており、いずれも300 μ g/mlにて細胞の増殖をほぼ完全に阻止したが、各10 μ g/mlでは、いずれの細胞においても細胞増殖にはほとんど影響をおよぼさなかった。しかし、NFLXはCHO-K1細胞を除く全ての細胞において他薬剤よりも強い増殖抑制作用を示した。NFLX100 μ g/mlでは強い細胞変性作用を示すが、3 μ g/mlでは影響は認められなかった。CHO-K1細胞に対するNFLXの作用は弱く、本薬剤の溶解限度である100 μ g/mlでの増殖抑制率は約40%であった。

以上の結果より、NY-198とPPAおよびOFLXの培養細胞の増殖におよぼす作用は近似しているが、NFLXは比較的強い細胞増殖抑制作用を示した。しかし、CHO-K1細胞に対するNFLXの作用は、他の薬物と同程度

か弱いものであった。

2) NY-198の細胞間の作用の比較

NY-198の細胞増殖抑制作用が強かったのは、C6BU-1においてであり、最も弱かったのは、IMR32に対してであった。ヒト由来細胞ではIMR32<HEL<HeLa-S3, ラット由来細胞ではBRL-3A<C6BU-1, マウス由来細胞では、初代培養<NIH3T3<N18TG-2の順に強い細胞増殖抑制作用が認められた。したがって、NY-198の細胞毒性は由来臓器については一定の相関が認め難かったが、一般に、正常細胞に対するより癌細胞に対して強い細胞毒性を示すようであった。また、ヒトでは神経細胞、肺細胞への影響が比較的少ないことが示唆されるかもしれない。一方、N18TG-2細胞のdbc AMPによる分化に対する影響はほとんど認められず、30 μ g/mlでの細胞増殖抑制作用は減弱するなど、むしろ細胞毒性は弱まった。さらに、各細胞に対する IC_{50} は、細菌に対するMICより約50～500倍大きく、抗菌剤としての選択毒性の高いことも確認出来た。

3) NY-198, PPA, OFLXおよびNFLXのHeLa-S3細胞およびN18TG-2細胞に対する形態変化

各薬剤を添加してHeLa-S3細胞を培養した時の細胞の形態変化を位相差顕微鏡下で検討した。NY-198およびPPA, OFLXの各300 μ g/mlならびにNFLX100 μ g/mlを添加して24時間培養したHeLa-S3細胞には、いずれも明らかな形態変化を認めなかった(Fig. 11)。添加5日後ではNY-198, PPA, OFLX各100 μ g/mlおよびNFLX30 μ g/mlによっては明らかな変化をもたらさなかったが、各薬剤のそれ以上の濃度では細胞増殖がほぼ完全に抑制されるとともに、細胞の膨化および扁平化等の著しい細胞変性が認められた(Fig. 12)。

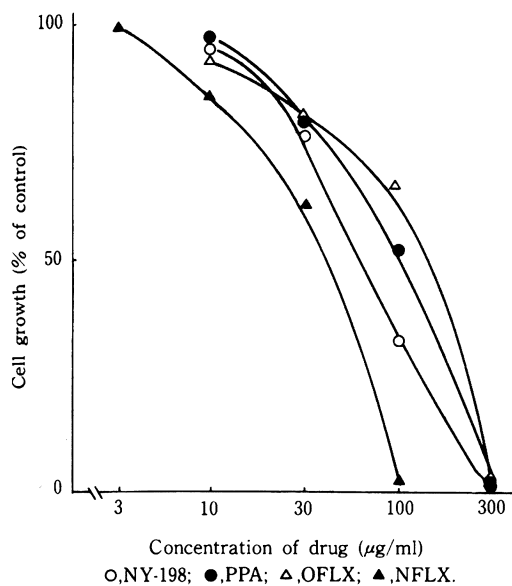


Fig. 1. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of HEL cells

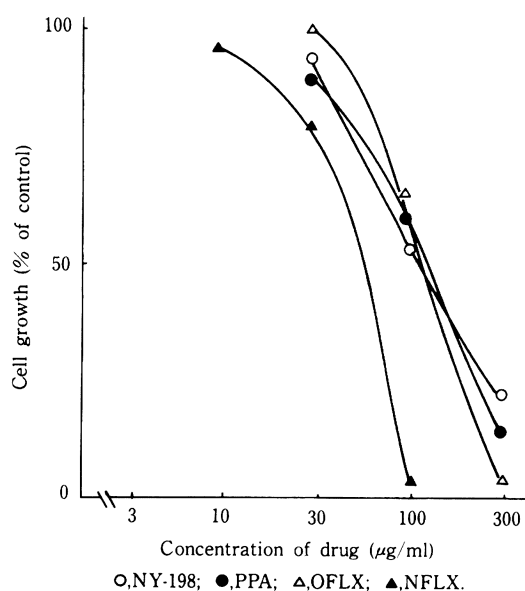


Fig. 3. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of IMR 32 cells

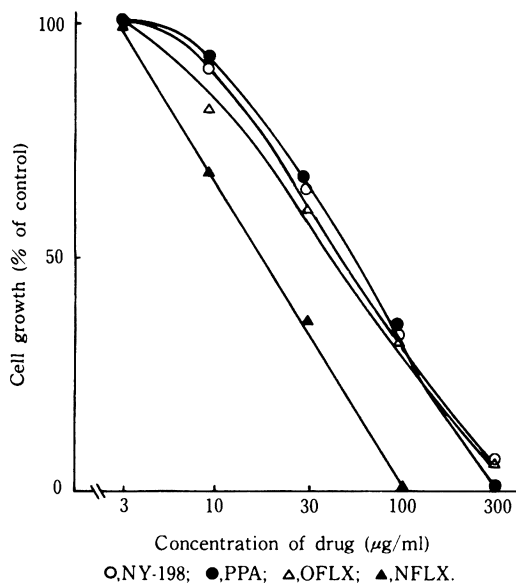


Fig. 2. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of HeLa-S3 cells

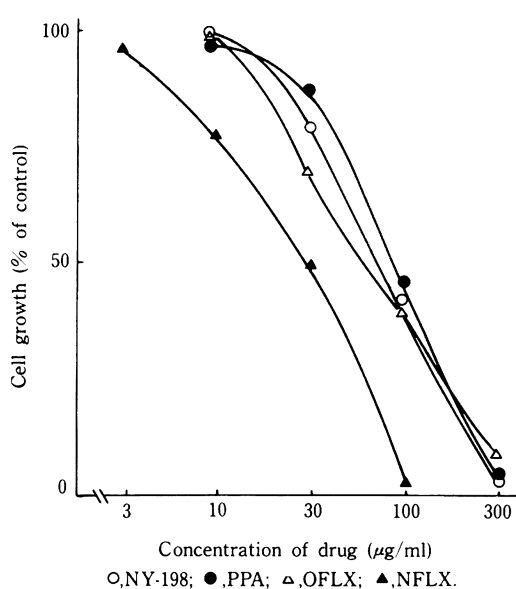


Fig. 4. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of BRL-3A cells

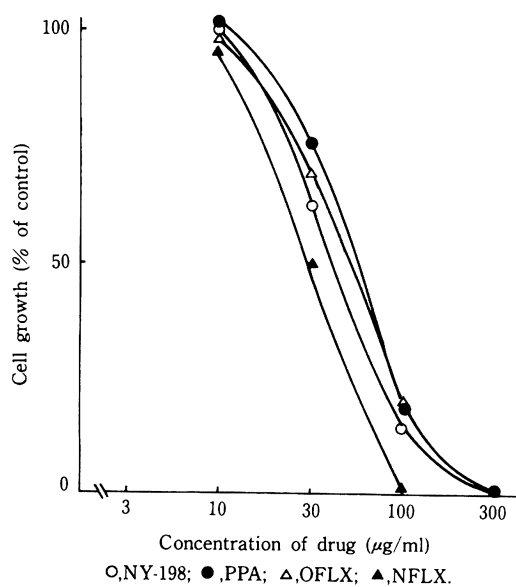


Fig. 5. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of C6BU-1 cells

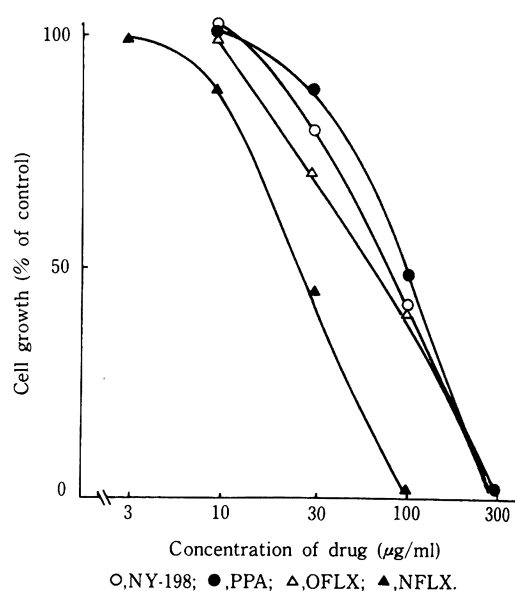


Fig. 7. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of NIH3T3 cells

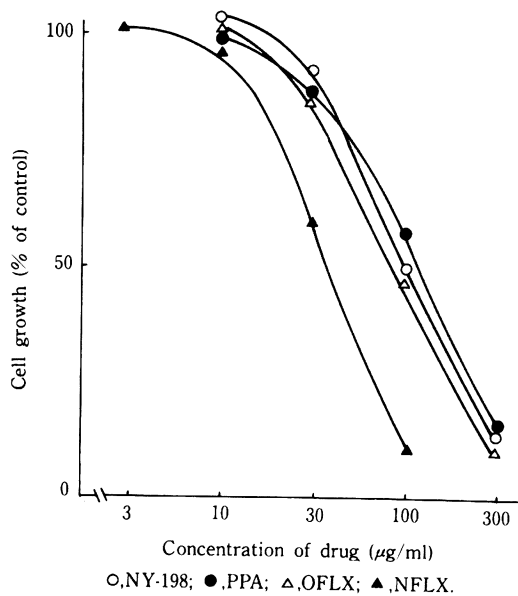


Fig. 6. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of mouse fetus primary culture cells

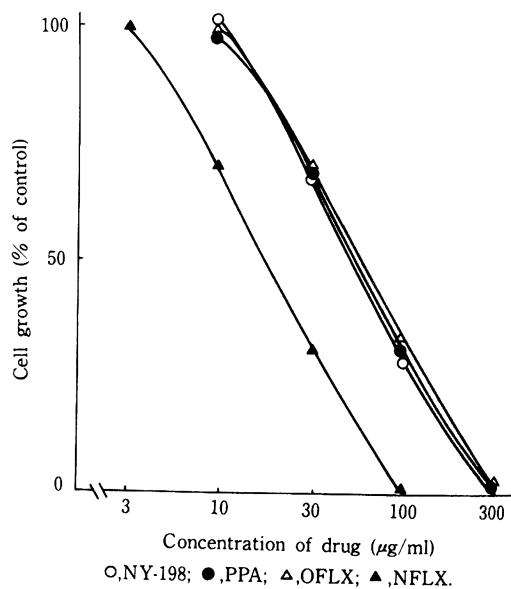


Fig. 8. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of N18TG-2 cells

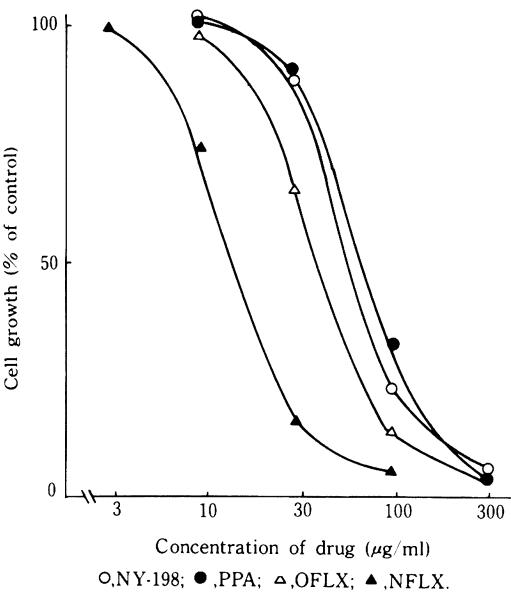


Fig. 9. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of N18TG-2 cells in the presence of dbcAMP

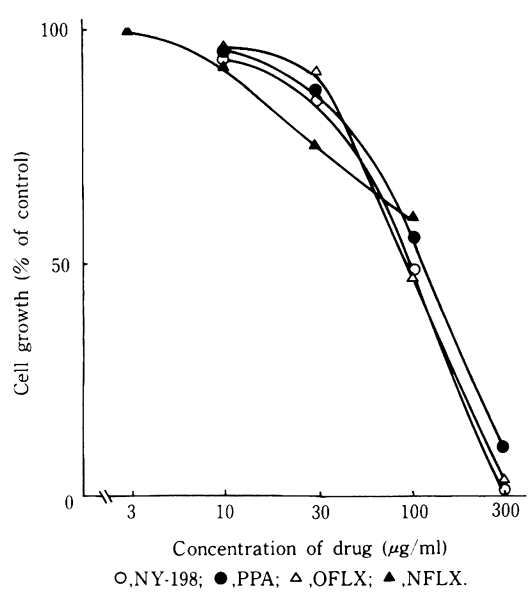


Fig. 10. Influence of NY-198 and other chemotherapeutics on the growth of CHO-K1 cells

Table 2. Growth inhibitory activity of NY-198 and other chemotherapeutics against several cells in culture

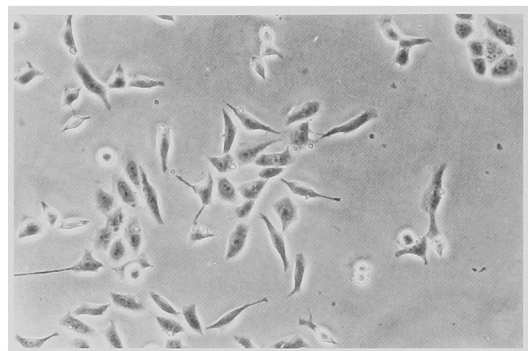
	IC ₅₀ (μg/ml)									
	HEL	HeLa-S3	IMR32	BRL-3A	C6BU-1	Mouse primary	NIH3T3	N18TG-2	N18TG-2 (+dbcAMP)	CHO-K1
NY-198	62	55	120	76	40	96	74	56	61	93
PPA	104	60	120	88	52	121	91	56	74	110
OFLX	133	48	130	71	48	89	67	56	40	94
NFLX	40	20	52	30	30	40	27	18	15	(>100)

N18TG-2 細胞に対しては、分化誘導剤である dbcAMP 非存在下および存在下の各薬剤の影響を検討した。NY-198, PPA, OFLX の各 300 μg/ml および NFLX 100 μg/ml は両条件下とも添加 24 時間後で細胞に著しい変性をもたらした死滅させた。DbcAMP 非存在下, NY-198, PPA および OFLX の各 100 μg/ml は、細胞との接触時間を延長しても、神経線維の伸長が比較的正常であり、細胞の形態には著しい変化を起こすことはなかった。NFLX に関しては、30 μg/ml が他薬剤の 100 μg/ml と同程度の作用であった。Fig. 13 に dbcAMP 非存在下各薬剤添加 4 日後の顕像を示す。

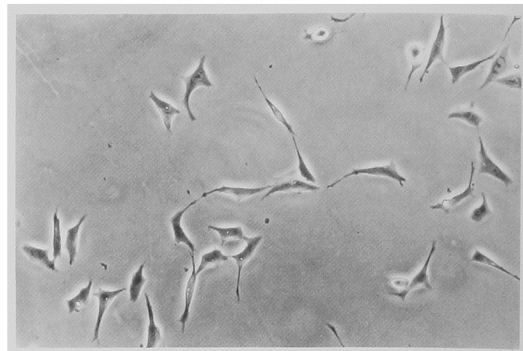
一方、Fig. 14, 15 および 16 は、dbcAMP 存在下の経時的な細胞の形態変化を示す。NY-198, PPA, OFLX

の各 100 μg/ml 以下あるいは NFLX の 30 μg/ml 以下では、添加 2 日後までの細胞の形態は対照と明らかな変化は認められないが (Fig. 14)、5 日後には神経線維の伸長が止まり、巨大細胞や萎縮した細胞が多く認められるなど、細胞の形態が著しく不規則となった (Fig. 15)。7 日目には、細胞変性ととも細胞増殖も著しく抑制された。しかしながら、NY-198, PPA, OFLX の 30 μg/ml および NFLX の 10 μg/ml 以下では、若干細胞増殖が抑制されるものの、神経線維の伸長などは正常と変わらない形態をしていた (Fig. 16)。

以上より、これらの抗菌剤はいずれも HeLa-S3 細胞の変性作用は比較的弱いようであった。また、神経芽細胞腫 N18TG-2 に対しては、dbcAMP 存在下の方が非



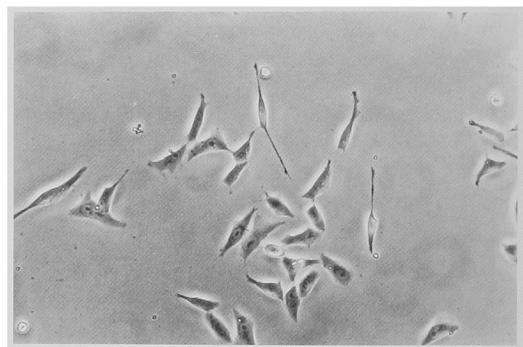
Control



NY-198 300 µg/ml



PPA 300 µg/ml

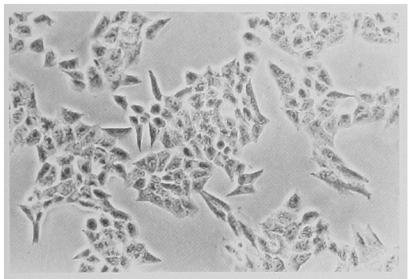


OFLX 300 µg/ml

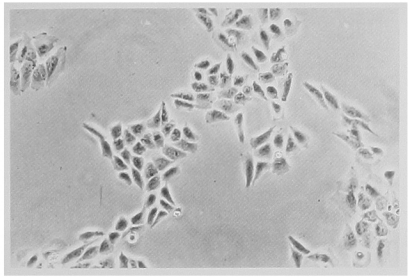


NFLX 100 µg/ml

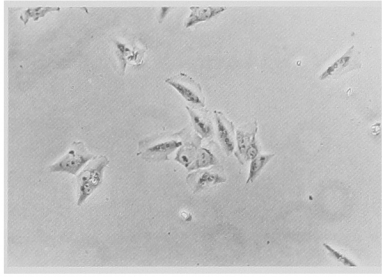
Fig. 11. Phase-contrast microscope of HeLa-S3 cells cultured for 24 h with chemotherapeutics



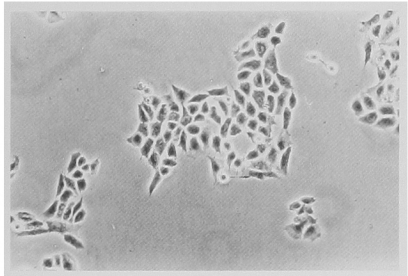
Control



NY-198 100 µg/ml



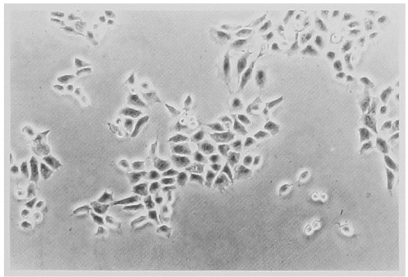
NY-198 300 µg/ml



PPA 100 µg/ml



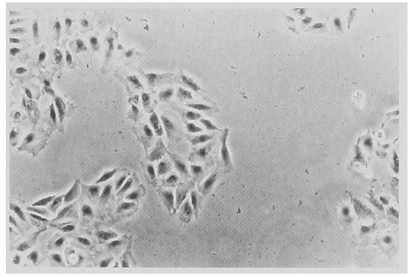
PPA 300 µg/ml



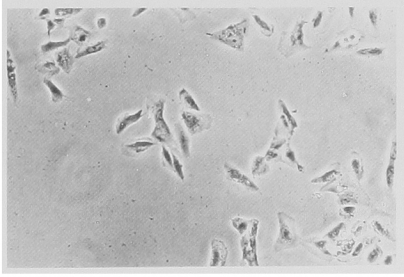
OFLX 100 µg/ml



OFLX 300 µg/ml

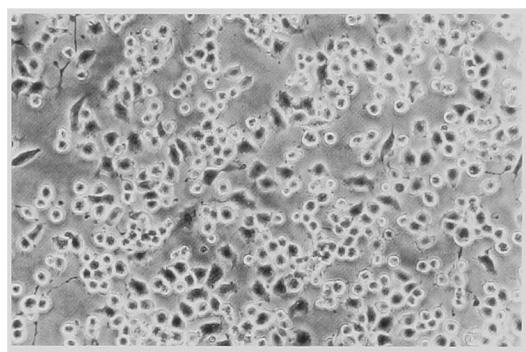


NFLX 30 µg/ml



NFLX 100 µg/ml

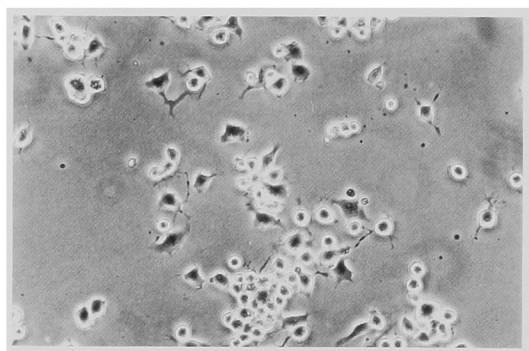
Fig. 12. Phase-contrast microscope of HeLa-S3 cells cultured for 5 days with chemotherapeutics



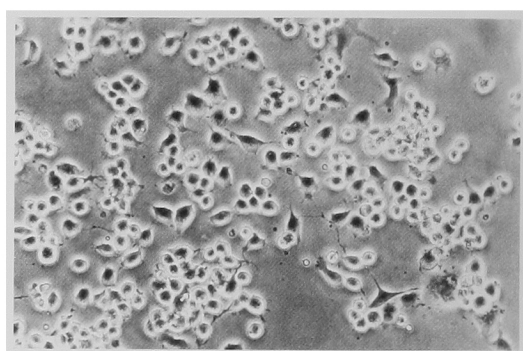
Control



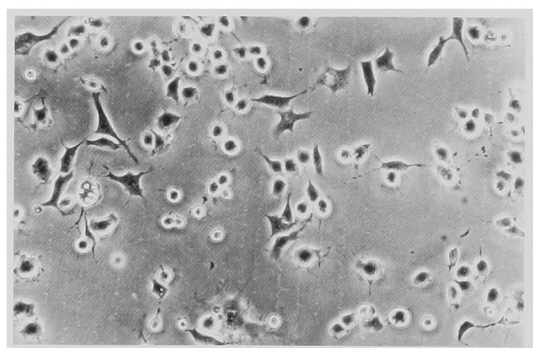
NY-198 100 µg/ml



PPA 100 µg/ml

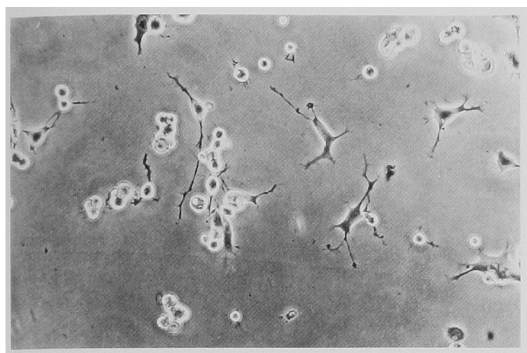


OFLX 100 µg/ml



NFLX 30 µg/ml

Fig. 13. Phase-contrast microscope of N18TG-2 cells cultured for 4 days with chemotherapeutics in the absence of dbcAMP



Control

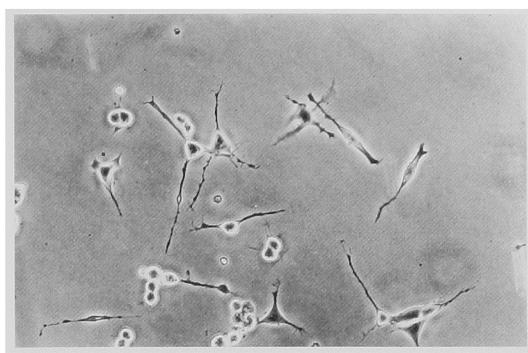
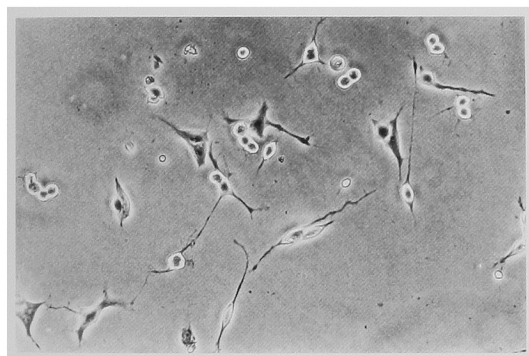
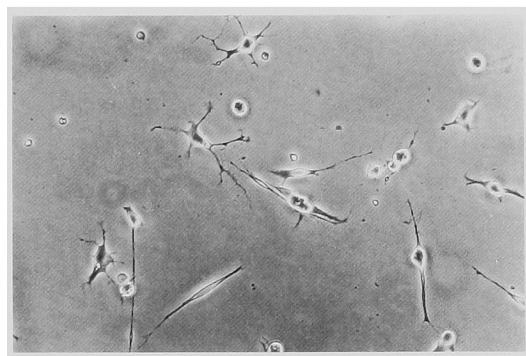
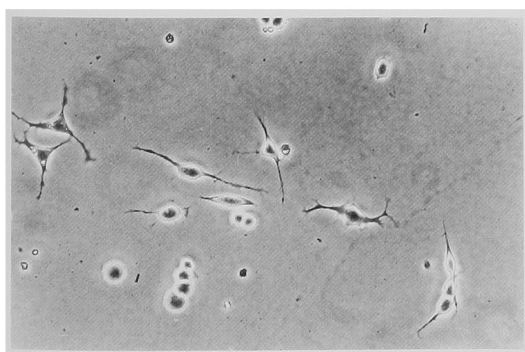
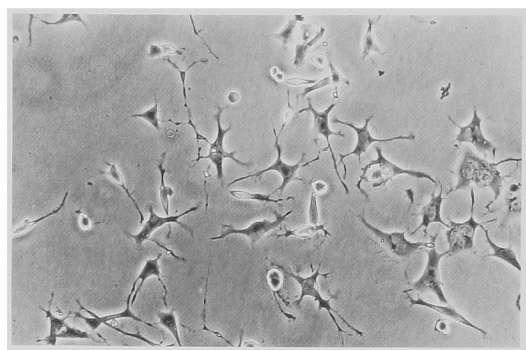
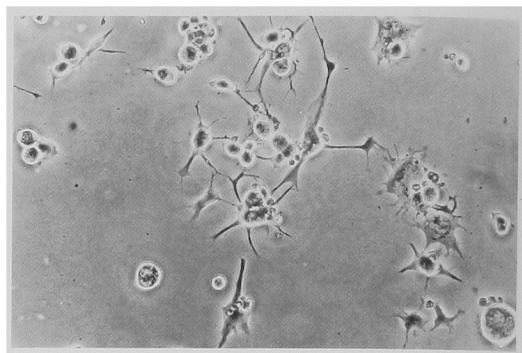
NY-198 100 $\mu\text{g/ml}$ PPA 100 $\mu\text{g/ml}$ OFLX 100 $\mu\text{g/ml}$ NFLX 30 $\mu\text{g/ml}$

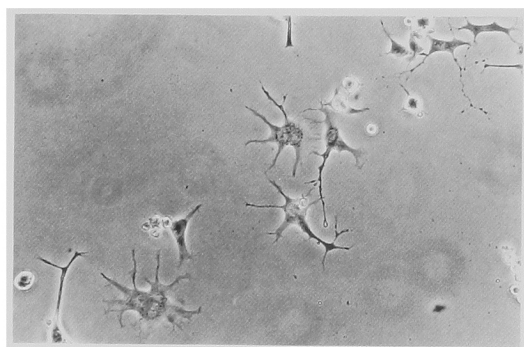
Fig. 14. Phase-contrast microscope of N18TG-2 cells cultured for 2 days with chemotherapeutics in the presence of dbcAMP



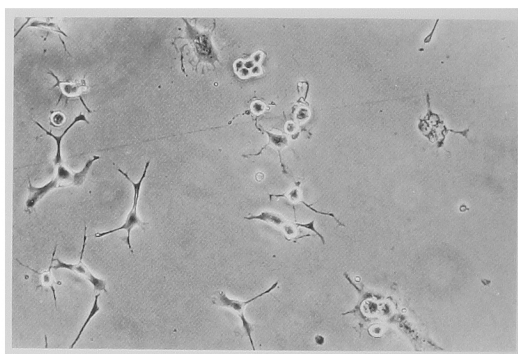
Control



NY-198 100 µg/ml



PPA 100 µg/ml

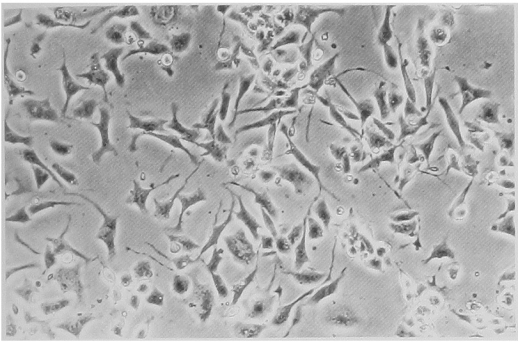


OFLX 100 µg/ml

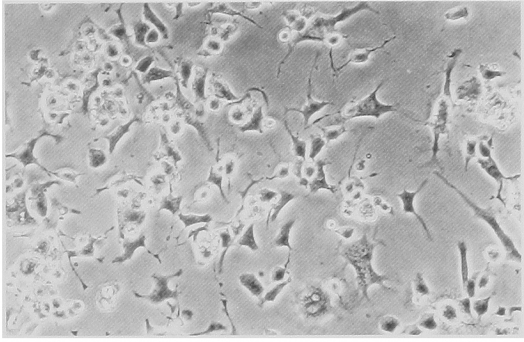


NFLX 30 µg/ml

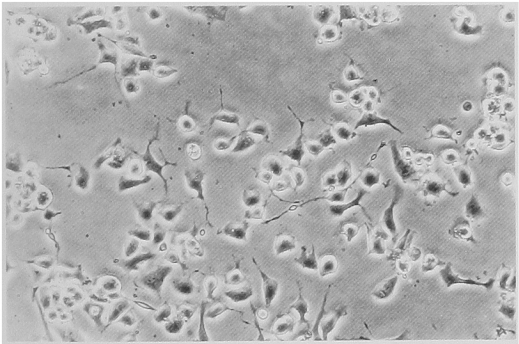
Fig. 15. Phase-contrast microscope of N18TG-2 cells cultured for 5 days with chemotherapeutics in the presence of dbcAMP



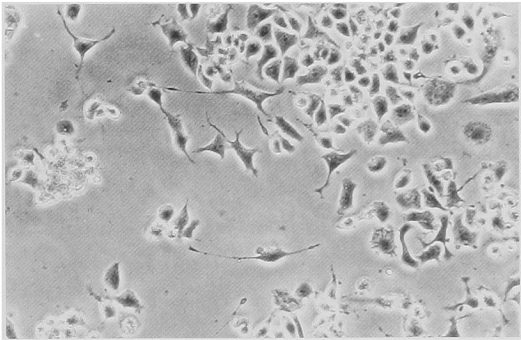
Control



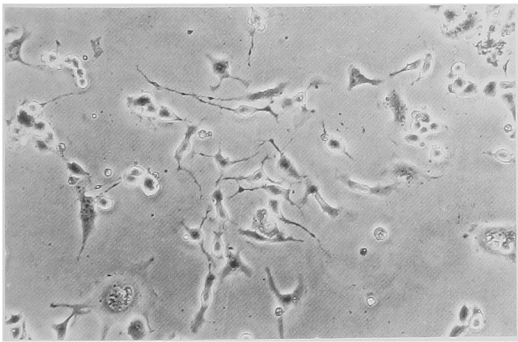
NY-198 30 µg/ml



PPA 30 µg/ml



OFLX 30 µg/ml



NFLX 10 µg/ml

Fig. 16. Phase-contrast microscope of N18TG-2 cells cultured for 7 days with chemotherapeutics in the presence of dbcAMP

存在下より強い形態変化と細胞変性を誘起することが明らかとなった。

III 考 察

9種の哺乳動物細胞に対するNY-198の細胞毒性を、PPA、OFLXおよびNFLXと比較したところ、NY-198の細胞毒性はPPAやOFLXとほぼ同程度であり、その抗菌作用¹⁾を合わせ考えると、細菌に対する選択毒性は極めて優れているといえる。NFLXの細胞毒性はCHO-K1細胞に対しては比較的弱かったが、他の細胞に対しては他3剤に比して明らかに強い増殖抑制作用を示した。これは、NFLXの細胞毒性がPPA等の同系の抗菌剤と比較して強いことを示した、横田、関口の報告^{6,7)}とも一致している。さらに、彼らは世代時間の短い細胞程、この種の抗菌剤の影響を受け易いと報告している⁷⁾。今回、実験に用いた培養細胞を世代時間の短いものから順に並べると次のようになる。N18TG-2(-dbc AMP) < HeLa-S3 ≅ BRL-3A < IMR32 < C6BU-1 < N18TG-2(+dbc AMP) < NIH3T3 < CHO-K1 < HEL < マウス初代培養、一方、NY-198のIC₅₀の順位はC6BU-1 < HeLa-S3 < N18TG-2(-dbc AMP) < N18TG-2(+dbc AMP) < HEL < NIH3T3 < BRL-3A < CHO-K1 < マウス初代培養 < IMR32となる。培養条件の違い等を考慮しなければならないが、細胞の世代時間と細胞毒性との間には明らかな相関関係は認め難いようだ。ただし、傾向としては、正常細胞に対してより毒性が低いことが示された。ピリドンカルボン酸系合成抗菌剤は、細菌のDNA立体化酵素阻害作用により抗菌作用をもたらすと考えられている⁸⁾。哺乳動物細胞のDNA gyraseの構造、機能が細菌のそれと異なり、その差が選択毒性となって表われている可能性は十分考えられる。本実験において、腫瘍型の細胞により強い細胞毒性を示す傾向にあったことより、腫瘍細胞のDNA gyraseが正常細胞よりは細菌型に近い性質を有していることも考えられる。また、NY-198はマウス神経芽細胞腫N18TG-2に対して分化型より非分化型により強い細胞増殖抑制作用を示したが、本薬剤による細胞の形態変化は、分化型の細胞

の方が大きいようであった。NY-198は、幸い中枢移行性が低い⁹⁾ので、通常の経口投与では神経系の副作用の発現は少ないが、血液-脳関門異常が疑われる疾患にはその使用に注意を要するものと考えられる。

NY-198の哺乳動物培養細胞に対する細胞毒性はNFLXよりも弱く、PPAやOFLXと同程度のものであり、本剤の安全性と抗菌選択毒性は、既存のPPAやOFLXと同程度に高いことが示唆された。

文 献

- 1) 桶崎英一, 大道光一, 小池祥二, 高橋慶衛, 牧野栄一: NY-198の細菌学的評価—*in vitro* および *in vivo* 抗菌作用—. *Chemotherapy* 36 (S-2): 99~111, 1988
- 2) 桶崎英一, 大道光一, 小池祥二, 高橋慶衛, 牧野栄一, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198とNorfloxacinおよびOfloxacinのBioassay法による体内動態比較. *Chemotherapy* 36 (S-2): 188~194, 1988
- 3) 猪俣哲行, 青木康治, 下武男, 山崎光雄: NY-198のマウスおよびラットにおける急性毒性試験. *Chemotherapy* 36 (S-2): 338~342, 1988
- 4) 野村岳之, 渡辺満利, 河上喜之, 平田真理子, 鈴木修三, 柳田知司: NY-198のラット13週間経口投与亜急性毒性試験. *Chemotherapy* 36 (S-2): 343~370, 1988
- 5) 永山在明, 大木一憲: 組織培養細胞におよぼす各種薬剤の影響 第一報 キノロンカルボン酸系抗菌剤. *Chemotherapy* 28 (S-4): 400~405, 1980
- 6) 横田 健, 関口玲子: AM-715とナリジクス酸およびビベミド酸との動物細胞に対する毒性の比較. *Chemotherapy* 29 (S-4): 49~55, 1981
- 7) 横田 健, 関口玲子: DL-8280の細胞毒性に関する研究. *Chemotherapy* 32 (S-1): 99~108, 1984
- 8) LINUS L. SHEN, ANDRE G. PERNET: Mechanism of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: The target of the drugs is DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, pp 307-311, 1985
- 9) 永田 治, 山田健久, 山口俊明, 桶崎英一, 寺崎哲也, 辻 彰: NY-198の体内動態IV—¹⁴C-NY-198によるラット, イヌにおける吸収, 分布, 排泄—. *Chemotherapy* 36 (S-2): 151~173, 1988

CYTOTOXICITY OF NY-198 ON MAMMALIAN CELLS IN CULTURE

RYOZO KOSHIURA, KENICHI MIYAMOTO and SHINYA WAKUSAWA

Research Laboratory for Development of Medicine, School of Pharmacy,
Hokuriku University, Kanazawa

We investigated the cytotoxicity of NY-198 and compared it with pipemidic acid (PPA), ofloxacin (OFLX) and norfloxacin (NFLX) on nine mammalian cell lines such as human embryonic lung (HEL) cells, human uterine cancer HeLa-S3 cells, human neuroblastoma IMR32 cells, rat normal liver BRL-3A cells, rat glioma C6BU-1 cells, mouse embryo primary culture cells, mouse NIH3T3 cells, mouse neuroblastoma N18TG-2 cells and Chinese hamster ovary CHO-K1 cells. We evaluated the safety of NY-198 as a chemotherapeutic.

The cytotoxicity of NY-198 on all cell lines was similar to those of PPA and OFLX and much lower than that of NFLX. Its 50% growth-inhibitory concentrations on the culture cells were generally significantly higher than the MICs against bacteria. Also, the cytotoxicity of NY-198 on normal cells tended to be lower than on tumor cells. We conclude therefore, that NY-198 possesses high selectivity and safety as an antibacterial chemotherapeutic.