

## NY-198の微生物を用いる変異原性試験

桶崎 英一・小池 祥二・牧野 栄一

北陸製薬株式会社 中央研究所

抗菌剤 NY-198の *in vitro* での微生物に対する変異原性を検討する目的で、次の試験を実施した。

(1) *Bacillus subtilis* の組換え修復能欠損株 (Rec<sup>-</sup>) と野生株 (Rec<sup>+</sup>) を用いた DNA 修復試験 (Rec-assay)

(2) *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰変異試験

その結果、NY-198は Rec-assay においては作用機序に起因すると考えられる弱陽性の傾向を示したが、復帰変異試験においては変異原性を示さなかった。

NY-198は北陸製薬中央研究所で開発中のピリドンカルボン酸系抗菌剤で、グラム陽性及び陰性の好気性菌に対して幅広い抗菌スペクトラムと強い殺菌作用を有するのみならず、嫌気性菌に対しても優れた抗菌作用を示す。更に、NY-198は *in vivo* での感染実験において優れた効果を示すことが確認されている<sup>1)</sup>ことから、各種の感染症に対して優れた治療効果が期待される薬剤である。

今回、著者らは本薬剤の変異原性を検討する目的で *Bacillus subtilis* を用いた Rec-assay および *Salmonella typhimurium* および *Escherichia coli* を用いた復帰変異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

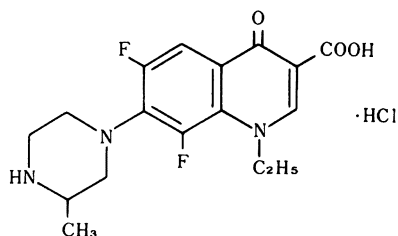
## 1. 被験物質

本試験に用いた NY-198は Fig. 1 に示す化学構造を持つ白色または黄白色の結晶性粉末で、水に可溶である。NY-198は蒸留水に溶解した後、ろ過滅菌し、滅菌蒸留水で希釈して試験に使用した。

## 2. DNA 修復試験 (Rec-assay)

*B. subtilis* の組換え修復能を欠損する株 M45 (Rec<sup>-</sup>) と野生株 H17 (Rec<sup>+</sup>) を用いた standard streak 法 (賀田らの方法<sup>2)</sup>) で試験を実施した。即ち、両菌株を MY broth (肉エキス、酵母エキス各 1%, NaCl 0.5%) 中にそれぞれ接種し、37°C で 15 時間振盪培養した。あらかじめ用意した MY 寒天培地にエーゼを用い両菌株の培養液を塗抹し、その頂点を覆うように被験物質溶液を浸み込ませた直径約 8 mm の円形ろ紙を置いた。37°C で 18 時間培養した後、ろ紙端を起点として生育阻止帯の長さを測定し、両菌株の阻止帯の長さを比較した。

対照薬剤として、chloramphenicol (CP, 和光純薬)



(±)-1-ethyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperazinyl)-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid hydrochloride.

Fig. 1. Chemical structure of NY-198

および 4-nitroquinoline-*N*-oxide (4NQO, 和光純薬) を用いた。

## 3. 復帰変異試験

*S. typhimurium* のヒスチジン要求株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538, TA92 および TA94) 並びに *E. coli* のトリプトファン要求株 (WP2 uvrA) を用いた。代謝活性化処理には、Table 1 の条件により製造された S 9 をオリエンタル酵母工業㈱から購入し用いた。また、S 9 Mix は Table 2 の組成になるように調製したものを用いた。陽性対照薬剤として、代謝活性化処理をしない場合には *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (ENNG, 半井化学)、9-aminoacridine (9AA, 半井化学)、2-nitrofluorene (2NF, 半井化学) および mitomycin C (MMC, 和光純薬)、代謝活性化処理をする場合には 2-aminoanthracene (2AA, 和光純薬) を用いた。

Table 1. Preparation of S9

| Animal used      |              | Inducer               |                                                                      |
|------------------|--------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Species & strain | crj : SD rat | Name                  | Phenobarbital (PB)                                                   |
| Sex              | Male         |                       | 5, 6-benzoflavone (BF)                                               |
| Age              | 7weeks       | Route                 | i. p.                                                                |
| Body weight      | 196.8 ± 5.9g | Dosage<br>&<br>period | 1 day : PB 30mg/kg<br>2,3,4 days : PB 60mg/kg<br>3 days : BF 80mg/kg |

Table 2. Composition of S9 mixture

| Ingredient                   | Amount in 1 ml<br>of S9 mixture |
|------------------------------|---------------------------------|
| S9                           | 0.1 ml                          |
| MgCl <sub>2</sub>            | 8 μmol                          |
| KCl                          | 33 μmol                         |
| G-6-P                        | 5 μmol                          |
| NADPH                        | 4 μmol                          |
| NADH                         | 4 μmol                          |
| Na-phosphate buffer solution | 100 μmol                        |

試験方法は、AMESらの方法<sup>3,4)</sup>および「GLP基準および毒性試験法ガイドライン解説」<sup>5)</sup>に準じて行なった。即ち、-80℃の凍結保存株をnutrient broth(Difco, 0.5% NaCl添加)に接種し、37℃で15時間振盪培養(約1~2×10<sup>8</sup>CFU/ml)した。検体溶液0.1ml, S9 Mix(代謝活性化処理をしない場合には0.1M Na-リン酸緩衝液, pH7.4) 0.5mlおよび菌懸濁液0.1mlを試験管内で混合し、37℃で20分間振盪培養した。その後、*S. typhimurium* には L-histidine および D-biotin を、*E. coli* には L-tryptophan をそれぞれ0.05mM 含む軟寒天培地 2 ml を混合し、これを Vogel-Bonner の最少グルコース寒天平板培地に重層し、更に37℃で48時間培養した。試験菌株の生育阻害の有無を実体顕微鏡で観察し、復帰変異による発生コロニー数を計測した。

II 成 績

1. DNA 修復試験 (Rec-assay)

NY-198のDNA修復試験をstandard streak法を用いて行なった。その結果をTable 3に示した。タンパク合成阻害剤であるCPは10~80μg/discでH17株およびM45株を同程度に生育阻止したが、変異原性物質として知られている4NQOは10~80μg/discでH17株に比べ、M45株に対して明らかに強い生育阻止を示した。

NY-198は1.56~100μg/discでH17株に比べM45株に対してやや強い生育阻止を示したが、その差は1.3~3.0mmで4NQOの5.0~9.9mmと比較するとわずかであった。

2. 復帰変異試験

NY-198の復帰変異試験をプレインキュベーション法を用いて行なった。その結果をTable 4に示した。NY-198はTA100, TA1535およびTA1537では0.313μg/plate以上, TA1538では0.625μg/plate以上, TA94およびWP2uvrAでは1.25μg/plate以上, TA92では2.5μg/plate以上で、代謝活性化法による場合、代謝活性化法によらない場合のいずれの場合においても生育阻害を示した。また、TA98では代謝活性化法によらない場合においては0.625μg/plate以上、代謝活性化法による場合においては1.25μg/plate以上で生育阻害を示した。しかし、生育阻害を示した濃度より低い濃度においては溶媒対照群と同程度のコロニー数しか示さなかった。

III 考 察

今回、NY-198の変異原性を検討する目的で、まず最初に現在化学物質の変異原性を調べる方法として繁用されている*B. subtilis*を用いたDNA修復試験(Rec-assay)および*S. typhimurium*や*E. coli*を用いた復帰変異試験を実施した。

NY-198と同系薬剤であるnalidixic acid<sup>6)</sup>, norfloxacin<sup>6)</sup>, ofloxacin<sup>7)</sup>ではRec-assayにおいて弱陽性を示すことが報告されている。今回著者らが行った試験においてもNY-198はDNA修復能欠損株のM45株に対してやや強い生育阻止作用を示したが、4NQOのような明らかな差はみられなかった。Norfloxacin, ofloxacinについてはRec-assayにおいて陽性を示すが、これは作用機序によるものと考えられ、哺乳動物を用いた染色体異常誘発試験や小核試験においては変異原性を示さないことが既に報告<sup>6,7)</sup>されている。NY-198についても同様の報告<sup>8-10)</sup>があることから、NY-198の

Table 3. Rec-assay of NY-198 by standard streak method

| Compound <sup>1)</sup> | Amount <sup>2)</sup><br>(μg/disc) | Growth inhibition (mm)                     |                                            |
|------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                        |                                   | <i>B. subtilis</i> H17 (Rec <sup>+</sup> ) | <i>B. subtilis</i> M45 (Rec <sup>-</sup> ) |
| H <sub>2</sub> O       |                                   | 0<br>0 ( 0 )                               | 0<br>0 ( 0 )                               |
| DMSO                   |                                   | 0<br>0 ( 0 )                               | 0<br>0 ( 0 )                               |
| CP                     | 80                                | 13.18<br>13.14 (13.2)                      | 14.79<br>14.69 (14.7)                      |
|                        |                                   | 11.99<br>11.65 (11.8)                      | 12.86<br>12.86 (12.9)                      |
|                        | 20                                | 9.49<br>9.26 ( 9.4)                        | 9.49<br>9.55 ( 9.5)                        |
|                        |                                   | 5.77<br>5.77 ( 5.8)                        | 7.33<br>7.50 ( 7.4)                        |
|                        | 40                                | 8.28<br>9.04 ( 8.7)                        | 18.04<br>19.11 (18.6)                      |
|                        |                                   | 7.63<br>7.89 ( 7.8)                        | 15.86<br>15.70 (15.8)                      |
|                        | 20                                | 7.48<br>6.76 ( 7.1)                        | 11.92<br>12.96 (12.4)                      |
|                        |                                   | 5.57<br>5.48 ( 5.5)                        | 10.85<br>10.12 (10.5)                      |
| 4NQO                   | 100                               | 13.77<br>13.85 (13.8)                      | 14.11<br>16.52 (15.3)                      |
|                        |                                   | 11.60<br>11.35 (11.5)                      | 14.55<br>14.35 (14.5)                      |
|                        | 25                                | 8.94<br>8.77 ( 8.9)                        | 10.74<br>10.94 (10.8)                      |
|                        |                                   | 7.59<br>7.27 ( 7.4)                        | 8.47<br>8.93 ( 8.7)                        |
|                        | 6.25                              |                                            |                                            |
|                        |                                   |                                            |                                            |
|                        | 1.56                              |                                            |                                            |
|                        |                                   |                                            |                                            |

( ) : mean of 2 plates CP : chloramphenicol  
DMSO : dimethylsulfoxide 4NQO : 4-nitroquinoline-*N*-oxide  
<sup>1)</sup> : CP and NY-198 were dissolved in sterile purified water.  
4NQO was dissolved in DMSO.  
<sup>2)</sup> : Volume of each drug solution was 40 μl/disc.

Rec-assay における結果はこれらのピリドンカルボン酸系抗菌剤共通の作用機序による特異的なものと考えられた。  
復帰変異試験においては、NY-198は各菌株に対して

強い感受性を示したものの、代謝活性化法による場合および代謝活性化法によらない場合のいずれの場合においても突然変異誘発作用を示さなかった。  
本試験は昭和60年2月～6月に実施した。

Table 4-1. Reverse mutagenecity test of NY-198 (–S9 mixture)

| Compound         | Amount<br>(μg/plate) | S9<br>Mix | Number of revertant colonies per plate |               |                 |                 |                  |                 |                 |                 |
|------------------|----------------------|-----------|----------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  |                      |           | Base pair change type                  |               |                 |                 | Frame shift type |                 |                 |                 |
|                  |                      |           | TA100                                  | TA1535        | WP2uvrA         | TA92            | TA98             | TA1537          | TA1538          | TA94            |
| H <sub>2</sub> O |                      | —         | 161<br>151(156)                        | 15<br>22 (19) | 14<br>19 (17)   | 51<br>38 (45)   | 15<br>13 (14)    | 7<br>5 (6)      | 15<br>24 (20)   | 22<br>24 (23)   |
| DMSO             |                      |           | 143<br>137(140)                        | 21<br>17 (19) | 14<br>17 (16)   | 43<br>46 (45)   | 16<br>14 (15)    | 4<br>5 (5)      | 18<br>13 (16)   | 24<br>27 (26)   |
| NY-198           | 0.01                 |           | 144<br>131(138)                        | 16<br>25 (21) | NT              | NT              | 14<br>16 (15)    | 4<br>6 (5)      | NT              | NT              |
|                  | 0.02                 |           | 123<br>145(134)                        | 24<br>21 (23) | 17<br>19 (18)   | NT              | 15<br>17 (16)    | 6<br>8 (7)      | 25<br>23 (24)   | 27<br>28 (28)   |
|                  | 0.039                |           | 168<br>158(163)                        | 17<br>19 (18) | 27<br>20 (24)   | NT              | 15<br>16 (16)    | 5<br>5 (5)      | 14<br>14 (14)   | 17<br>26 (22)   |
|                  | 0.078                |           | 147<br>127(137)                        | 26<br>13 (20) | 18<br>20 (19)   | 45<br>43 (44)   | 15<br>15 (15)    | 6<br>3 (5)      | 14<br>16 (15)   | 21<br>23 (22)   |
|                  | 0.156                |           | 126<br>124(125)                        | 20<br>22 (21) | 16<br>20 (18)   | 44<br>45 (45)   | 13<br>14 (14)    | 6<br>7 (7)      | 17<br>17 (17)   | 21<br>22 (22)   |
|                  | 0.313                |           | 0*<br>0*(0*)                           | 0*<br>0*(0*)  | 22<br>25 (24)   | 47<br>46 (47)   | 15<br>14 (15)    | 0*<br>0*(0*)    | 20<br>21 (21)   | 20<br>23 (22)   |
|                  | 0.625                |           | 0*<br>0*(0*)                           | 0*<br>0*(0*)  | 27<br>20 (24)   | 47<br>48 (48)   | 0*<br>0*(0*)     | 0*<br>0*(0*)    | 0*<br>0*(0*)    | 27<br>24 (26)   |
|                  | 1.25                 |           | NT                                     | NT            | 0*<br>0*(0*)    | 42<br>39 (41)   | NT               | NT              | 0*<br>0*(0*)    | 0*<br>0*(0*)    |
|                  | 2.5                  |           | NT                                     | NT            | NT              | 0*<br>0*(0*)    | NT               | NT              | NT              | NT              |
|                  | 5                    |           | NT                                     | NT            | NT              | 0*<br>0*(0*)    | NT               | NT              | NT              | NT              |
| ENNG             | 2                    |           | NT                                     | NT            | 341<br>337(339) | NT              | NT               | NT              | NT              | NT              |
|                  | 3                    |           | 507<br>507(507)                        | NT            | NT              | NT              | NT               | NT              | NT              | NT              |
|                  | 5                    |           | NT                                     | 86<br>92 (89) | NT              | NT              | NT               | NT              | NT              | NT              |
| 2NF              | 1                    |           | NT                                     | NT            | NT              | NT              | 268<br>249(259)  | NT              | NT              | NT              |
|                  | 2                    |           | NT                                     | NT            | NT              | NT              | NT               | NT              | 467<br>451(459) | NT              |
| 9AA              | 80                   |           | NT                                     | NT            | NT              | NT              | NT               | 351<br>286(320) | NT              | NT              |
| MMC              | 5                    |           | NT                                     | NT            | NT              | 134<br>126(130) | NT               | NT              | NT              | 216<br>220(218) |

( ) : mean of 2 plates

DMSO : dimethylsulfoxide

2NF : 2-nitrofluorene

MMC : mitomycin C

\* : growth inhibition

ENNG : *N*-ethyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

9AA : 9-aminoacridine

NT : not tested

Table 4-2. Reverse mutagenecity test of NY-198 (+S9 mixture)

| Compound         | Amount<br>(μg/plate) | S9<br>Mix | Number of revertant colonies per plate |                |               |                 |                  |                 |                 |               |
|------------------|----------------------|-----------|----------------------------------------|----------------|---------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------|
|                  |                      |           | Base pair change type                  |                |               |                 | Frame shift type |                 |                 |               |
|                  |                      |           | TA100                                  | TA1535         | WP2uvrA       | TA92            | TA98             | TA1537          | TA1538          | TA94          |
| H <sub>2</sub> O |                      |           | 144<br>158(151)                        | 22<br>22 (22)  | 14<br>17 (16) | 51<br>48 (50)   | 33<br>24 (29)    | 18<br>14 (16)   | 47<br>40 (44)   | 26<br>33 (30) |
| DMSO             |                      |           | 138<br>136(137)                        | 27<br>19 (23)  | 17<br>16 (17) | 47<br>48 (48)   | 31<br>30 (31)    | 13<br>14 (14)   | 46<br>43 (45)   | 26<br>39 (33) |
| NY-198           | 0.01                 | +         | 129<br>160(145)                        | 19<br>23 (21)  | N T           | N T             | N T              | 18<br>12 (15)   | 48<br>35 (42)   | N T           |
|                  | 0.02                 |           | 127<br>136(132)                        | 24<br>22 (23)  | 16<br>19 (18) | N T             | 37<br>22 (30)    | 11<br>11 (11)   | 38<br>40 (39)   | 33<br>29 (31) |
|                  | 0.039                |           | 155<br>150(153)                        | 21<br>27 (24)  | 23<br>20 (22) | N T             | 30<br>35 (33)    | 18<br>11 (15)   | 43<br>44 (44)   | 33<br>30 (32) |
|                  | 0.078                |           | 132<br>160(146)                        | 25<br>25 (25)  | 25<br>16 (21) | 56<br>46 (51)   | 36<br>31 (34)    | 17<br>16 (17)   | 41<br>52 (47)   | 31<br>32 (32) |
|                  | 0.156                |           | 123<br>158(146)                        | 23<br>28 (26)  | 25<br>24 (25) | 49<br>55 (52)   | 32<br>30 (31)    | 12<br>16 (14)   | 47<br>32 (40)   | 36<br>36 (36) |
|                  | 0.313                |           | 0*<br>0*(0*)                           | 0*<br>0*(0*)   | 17<br>21 (19) | 53<br>54 (54)   | 34<br>30 (32)    | 0*<br>0*(0*)    | 36<br>37 (37)   | 30<br>29 (30) |
|                  | 0.625                |           | 0*<br>0*(0*)                           | 0*<br>0*(0*)   | 16<br>18 (17) | 57<br>43 (50)   | 28<br>22 (25)    | 0*<br>0*(0*)    | 0*<br>0*(0*)    | 30<br>30 (30) |
|                  | 1.25                 |           | N T                                    | N T            | 0*<br>0*(0*)  | 46<br>42 (44)   | 0*<br>0*(0*)     | N T             | N T             | 0*<br>0*(0*)  |
|                  | 2.5                  |           | N T                                    | N T            | N T           | 0*<br>0*(0*)    | N T              | N T             | N T             | N T           |
|                  | 5                    |           | N T                                    | N T            | N T           | 0*<br>0*(0*)    | N T              | N T             | N T             | N T           |
| 2AA              | 0.5                  |           | 392<br>321(357)                        | N T            | N T           | N T             | 236<br>219(228)  | N T             | 267<br>286(277) | N T           |
|                  | 2                    |           | N T                                    | 111<br>93(102) | N T           | N T             | N T              | 177<br>178(178) | N T             | N T           |
|                  | 10                   |           | N T                                    | N T            | N T           | N T             | N T              | N T             | N T             | 76<br>78 (77) |
|                  | 15                   |           | N T                                    | N T            | N T           | 126<br>111(119) | N T              | N T             | N T             | N T           |
|                  | 80                   |           | N T                                    | N T            | 84<br>89 (87) | N T             | N T              | N T             | N T             | N T           |

( ) : mean of 2 plates                      \* : growth inhibition                      NT : not tested  
2AA : 2-aminoanthracene

文 献

1) 桶崎英一, 大道光一, 小池祥二, 高橋慶衛, 牧野米一 : NY-198の細菌学的評価—in vitro および in vivo 抗菌作用一。Chemotherapy 36 (S-2) : 99~111, 1988  
2) KADA, T.; K. TUTIKAWA & Y. SADAIE : In vitro and host-mediated 'rec-assay' procedures for screening chemical mutagens and phloxine, a mutagenic red dye detected. Mutat. Res. 16 : 165

~174, 1972  
3) AMES, B. N. ; W. E. DURSTON, E. YAMASAKI & F. D. LEE : Carcinogens are mutagens : a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70 : 2281~2285, 1973  
4) AMES, B. N. ; J. MCCANN & E. YAMASAKI : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res. 31 : 347~364, 1975

- 5) 厚生省薬務局審査課監修：GLP 基準および毒性試験法ガイドライン解説。1984
- 6) 入倉 勉，細見次郎：AM-715の *in vitro* 変異原性試験。Chemotherapy 29 (S-4) : 938~944, 1981
- 7) 島田弘康，荒内龍夫ら：新合成抗菌剤 DL-8280の変異原性に関する検討。Chemotherapy 32(S-1) : 1162~1170, 1984
- 8) 遠藤和男，笠原美樹子，高山洋一：抗菌剤 NY-198のヒトリンパ球を用いた染色体異常誘発試験。北陸製薬社内資料
- 9) 遠藤和男，渡辺正友，高山洋一：抗菌剤 NY-198のマウスにおける小核試験。北陸製薬社内資料
- 10) 田中憲穂，山影康次，斎藤まり，原 巧，渋谷 徹：NY-198のチャイニーズハムスター培養細胞による染色体試験。Chemotherapy 36 (S-2) : 433~438, 1988

## MUTAGENICITY OF NY-198 ON BACTERIA

EIICHI OKEZAKI, SHOJI KOIKE and EIICHI MAKINO

Central Research Laboratory, Hokuriku Seiyaku Co., Ltd., Fukui

A new antibacterial drug, NY-198, was studied for mutagenicity using *in vitro* tests as follows.

- 1) A rec-assay on *B. subtilis*.
- 2) A reverse mutation test on *S. typhimurium* and *E. coli*.

In the rec-assay, NY-198 caused slight primary DNA damage to the test strains, but no mutagenicity was observed in the reverse mutation test.