

NY-198の誘発突然変異頻度試験

脇阪 義治・西本 洋司・泉 晶子

塩野義製薬株式会社 研究所

Salmonella typhimurium TA100及び TA98の2株を試験菌として、キノロン系新抗菌剤 NY-198の誘発突然変異頻度試験 (induced mutation frequency test; IMF-test) を実施した。

NY-198は、0.32, 1.6, 8, 40, 200及び1,000 μ g/mlの各試験濃度に於て、代謝活性化の有無にかかわらず、何れの試験菌に対しても全く誘発変異頻度の上昇を示さなかった。

従って本化合物は上記条件の IMF-Test に於て陰性と判定された。

キノロン系新抗菌剤 NY-198 (Fig. 1) の変異原性を誘発突然変異頻度試験法 (IMF-Test)^{1,2)}を用いて検討した。本化合物の微生物に対する復帰変異原性に関しては既にプレインキュベーション法³⁾による試験が為されており陰性の結論を得ている⁴⁾。しかしながら、その強い抗菌性の為に1.25 μ g/plate以下の低い濃度域でしか試験が出来なかったため、この点を補うべく本試験を追加実施した。以下に得られた結果を報告する。

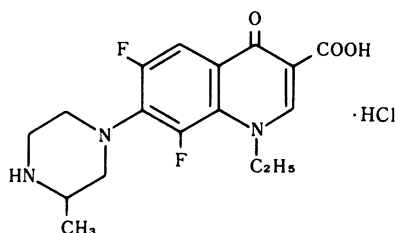


Fig. 1. Chemical structure of NY-198

I 材料と方法

1. 試験菌

Salmonella typhimurium TA100及び TA98の2株を試験菌とした。両株共に、1982年に B.N.AMES 教授から分与を受けたものである。

これ等の菌株を試験に用いる場合は、下記の要領で各菌のリン酸 buffer 懸濁液を調製し、それぞれ0.8ml/tubeの割合で用いた。即ち、先ず各株の凍結保存物 (genotypeの確認済み³⁾)を融解し、その0.05mlを7mlの nutrient broth No. 2 (Oxoid) に植え、37°Cで約24時間振とう培養して fresh broth とした。これを無菌的に遠沈(2,270 $\times$ g, 20min)して菌体を集め、5mlの Sör-

ensen のリン酸 buffer pH7.2 (SPS) で遠沈洗浄 (同上条件) した後、7mlの同 buffer に懸濁した。この懸濁液を4°Cで3時間保存して stationary phase とし、0.8ml/tubeの割合で試験に使用した。

2. 被験物質

北陸製薬より提供された NY-198 原末 (Lot No. ZB690) を被験物質として用いた。本品は、無臭、苦味のある白色の結晶性粉末である。8°C以下で密封遮光保存して使用した。

試験に際しては、その10mg/mlの SPS 溶液を上限とする公比5の5連続希釈により計6濃度の溶液を用時調製し、それぞれ0.2ml/tubeの割合で使用した。

3. 陽性対照物質

下記の3化合物を陽性対照物質として使用した。

a. Hydrogen peroxide (H_2O_2 , 三徳化学 Lot No. 6378) : 500, 1,000及び1,500 μ g/mlの SPS 溶液を0.2ml/tubeの割合で非代謝活性化系の陽性対照とした。

b. 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide (AF 2, 和光純薬 Lot No. PEJ2284) : 1 μ g/mlの DMSO 溶液を非代謝活性化系の陽性対照として0.2ml/tubeの割合で使用した。

c. 2-Aminoanthracene (2 AA, 半井化学薬品 Lot No. M4N7785) : 2.5, 5及び10 μ g/mlの DMSO 溶液を代謝活性化系の陽性対照として0.2ml/tubeの割合で用いた。

4. 培地類

a. 最小グルコース合成寒天培地 (Basal Agar) : Vogel-Bonner minimum E medium⁵⁾に2%のグルコースと1.5%の寒天 (Difco Bacto-Agar) を添加したものである。30ml/plateの平板として復帰変異原性試験 (プレート法) と同様に使用した。

b. 重層用軟寒天 (Top Agar) : 下記の組成の Top Agar を, 2 ml/plate の割合で重層用に用いた。即ち, NaCl 0.5% と Difco purified agar 0.6% を含有する 100vol. の精製水溶液に, 5mM の L-histidine 溶液 1vol. と 1mM の D-biotin 溶液 5vol. を無菌添加したものである。

c. 代謝活性化酵素系 (S 9 Mix) : 氷冷下, 下記の組成の S 9 Mix を無菌調製し, 直ちに 1.0ml/tube の割合で代謝活性化試験に用いた。

(組成)

Phenobarbital と 5, 6-benzoflavone で 2 重に induction された rat liver S 9 (オリエンタル酵母 Lot No. 86082207)	1 ml
50 mM Glucose-6-phosphate (半井化学薬品 Lot No. M5R3349)	1 ml
40 mM NADPH (興人 Lot No. 919) ...	1 ml
40 mM NADH (興人 Lot No. M5P2867)	1 ml
20 mM MgCl ₂ と 82.5mM KCl を含有する水溶液	4 ml
1 M Sodium phosphate buffer (pH7.4)	1 ml
蒸留水	1 ml
計	10ml

5. 試験方法¹⁾²⁾

無菌の小ガラス tube (金属キャップ付き) を必要本数準備する。その中に, 1.0ml の SPS と各 20 μ l の 20% glucose, 1 mg/ml の L-histidine 溶液及び 0.1mg/ml の D-biotin 溶液を無菌的に加え, 次に, 0.2ml の各濃度の被験物質溶液, 陽性対照物質溶液又は対照溶媒を加え, 最後は 0.8ml の試験菌懸濁液を加えて, 37C で 20 分間緩く振とうした。

代謝活性化試験の場合は, SPS の代わりに 1.0ml の S 9 Mix を使用した。

反応を終えた各 tube の内容物を無菌的に遠沈 (2,270 $\times$ g, 20min) し, 得られた菌体部を 5ml の SPS で 2 回遠沈洗浄 (同上条件) し, 再び 2ml の同 buffer に懸濁して試験用の菌懸濁液とした。

各反応済み洗浄懸濁液中の復帰変異菌数の測定は, AMES らのプレート法³⁾に従って実施した。但し, 菌懸濁液は 0.2ml/plate の割合で用いた。生存菌数の測定は, 反応済み各懸濁液を希釈し, それを 0.1ml/plate の割合で nutrient agar (Oxoid) の平板に播き, 37C 24 時間培養して計数した。溶媒対照は 5 枚, 被験物質及び陽性対照物質は 3 枚のシャーレを用いて測定した。

得られた各復帰変異コロニー数及び生存菌数から, 下式により各濃度で被験物質及び陽性対照物質の IMF 値

を算出した。その結果, 処理群のプレートあたりの復帰変異コロニー数がその溶媒対照よりも明らかに増加し, しかもその IMF 値が濃度依存性の上昇を示した時, その物質を変異原性陽性と判定した。

$$\text{IMF} = (\text{Rt} - \text{Rc}) \div \text{St}$$

Rt : 処理群の試験菌懸濁液

1 ml 中の復帰変異コロニー数

Rc : 溶媒対照の試験菌懸濁液

1 ml 中の復帰変異コロニー数

St : 処理群の試験菌懸濁液

1 ml 中の生存菌数

II 成績及び考察

S.typhimurium TA100 及び TA98 を試験菌とし, 0.32, 1.6, 8, 40, 200 及び 1,000 μ g/ml の 6 濃度で NY-198 の IMF-Test を実施した。得られた結果を Table 1 及び 2 に示す。

NY-198 は, 何れの試験菌, 何れの試験濃度に於ても, 代謝活性化の有無に拘わりなく, そのプレートあたりの復帰変異コロニー数は全て溶媒対照の場合と同等又は以下であった。各濃度の被験物質の IMF 値も従って全て 0 以下であり, 濃度依存性上昇傾向は認められなかった。各用量での試験菌の生存率は, TA100 で 6.6~60.6%, TA98 では 5.7~62.5% でありほぼ所期の死滅率幅 (50~90%) に保ち得た。陽性対照の H₂O₂, AF 2 及び 2 AA のプレートあたりの復帰変異コロニー数は, 何れの系に於ても明らかに溶媒対照より増加し, その IMF 値は濃度依存性の上昇傾向を示した。

従って NY-198 は, 上記条件の IMF テストの結果陰性であると判定された。

試験濃度の上限を 1 mg/ml としたのは, それ以上では菌の死滅が大きくなりすぎて (90% 以上) 試験不能となった為である。又, 試験菌を冷却して stationary phase にしたり, 反応時間を 20 分に短縮したりしたのは, 大幅な菌の死滅を防ぎ, その生存率を 10~50% に保つ為であった。

Table 1. Induced Mutation Frequency Test on NY-198 in *S. typhimurium* TA100

Compound $\mu\text{g/ml}$	☆	Revertant Colonies		Rt-Rc (CFU/ml)	Survived Colonies			St ($\times 10^7/\text{ml}$)	IMF ($\times 10^{-7}$)
		(CFU/ml)	Mean		($\times 10^6$ CFU/ml)	Mean	Survived %		
Control(SPS)	—	715, 670, 745, 720	700	~	384, 372, 404, 380, 448	398	~	~	
Control(DMSO)	—	755, 715, 810, 744	744	~	292, 304, 348, 300, 360	321	~	~	
NY-198(SPS) 0.32	—	640, 760, 700	700	-20	256, 236, 230	241	60.6	24.1	<0
1.6	—	615, 540, 600	585	-135	140, 136, 144	140	35.2	14.0	<0
8	—	655, 625, 600	627	-93	132, 104, 108	115	28.9	11.5	<0
40	—	630, 750, 660	680	-40	68, 60, 68	65	16.3	6.5	<0
200	—	560, 640, 510	570	-150	50, 48, 54	51	12.8	5.1	<0
1000	—	285, 275, 355	305	-415	40, 30, 34	35	8.8	3.5	<0
H ₂ O ₂ (SPS) 50	—	700, 675, 730	702	-18	268, 220, 296	261	65.6	26.1	<0
100	—	855, 820, 860	845	125	202, 196, 218	205	51.5	20.5	6.1
150	—	1385, 1215, 1190	1263	543	144, 96, 92	111	27.9	11.1	48.9
AF2(DMSO) 0.1	—	3840, 3710, 3800	3783	3039	328, 290, 316	311	96.9	31.1	97.7
Control(SPS)	+	815, 800, 770, 813	813	~	372, 310, 356, 360, 334	346	~	~	
Control(DMSO)	+	650, 745, 765, 730	730	~	320, 344, 328, 358, 330	336	~	~	
NY-198(SPS) 0.32	+	830, 695, 725	750	-63	180, 136, 162	159	46.0	15.9	<0
1.6	+	620, 690, 640	650	-163	96, 106, 80	94	27.2	9.4	<0
8	+	650, 585, 620	618	-195	50, 40, 36	42	12.1	4.2	<0
40	+	510, 550, 535	532	-281	40, 30, 34	35	10.1	3.5	<0
200	+	530, 500, 465	498	-315	30, 22, 28	27	7.8	2.7	<0
1000	+	485, 505, 525	505	-308	24, 18, 26	23	6.6	2.3	<0
2AA(DMSO) 0.25	+	850, 805, 935	863	133	350, 336, 330	339	100.9	33.9	3.9
0.5	+	1050, 1175, 1270	1165	435	378, 354, 330	354	105.4	35.4	12.3
1.0	+	1820, 1785, 1760	1788	1058	290, 322, 334	315	93.8	31.5	33.6

☆: —; Without metabolic activation. +; With metabolic activation. SPS: Sørensen's phosphate buffer pH 7.2. DMSO: Dimethylsulfoxide. Rt: Revertants in 1 ml of reaction mixture treated with NY-198 or positive controls. Rc: Revertants in 1 ml of reaction mixture treated with solvents. St: Survived cell number in 1 ml of reaction mixture treated with NY-198 or positive controls. IMF: Induced mutation frequency. AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide. 2AA: 2-Aminoanthracene.

Table 2. Induced Mutation Frequency Test on NY-198 in *S. typhimurium* TA98

Compound μg/ml	☆	Revertant Colonies		Rt-Rc (CFU/ml)	Survived Colonies			St (×10 ⁷ /ml)	IMF (×10 ⁻⁷)
		(CFU/ml)	Mean		(×10 ⁴ CFU/ml)	Mean	Survived %		
Control(SPS)	—	160, 145, 145, 155, 180	157	~	524, 590, 612, 604, 642	594	~	~	
Control(DMSO)	—	140, 190, 135, 175, 180	164	~	564, 576, 540, 520, 594	559	~	~	
NY-198(SPS) 0.32	—	150, 125, 120	132	-25	336, 392, 386	371	62.5	37.1	<0
1.6	—	110, 145, 110	122	-35	308, 320, 302	310	52.2	31.0	<0
8	—	135, 130, 150	138	-19	250, 258, 274	261	43.9	26.1	<0
40	—	125, 115, 150	130	-27	202, 188, 220	203	34.2	20.3	<0
200	—	130, 155, 150	145	-12	156, 182, 150	163	27.4	16.3	<0
1000	—	135, 140, 125	133	-24	42, 60, 46	49	8.2	4.9	<0
H ₂ O ₂ (SPS) 50	—	155, 200, 175	177	20	406, 480, 490	459	77.3	45.9	0.4
100	—	245, 205, 185	212	55	368, 428, 412	403	67.8	40.3	1.4
150	—	215, 295, 275	262	105	300, 284, 340	308	51.9	30.8	3.4
AF2(DMSO) 0.1	—	455, 415, 515	462	298	560, 528, 592	560	100.2	56.0	5.3
Control(SPS)	+	85, 120, 110, 135, 125	115	~	434, 460, 452, 420, 408	435	~	~	
Control(DMSO)	+	100, 115, 130, 115, 120	116	~	324, 378, 370, 394, 360	365	~	~	
NY-198(SPS) 0.32	+	95, 100, 110	102	-13	240, 270, 224	245	56.3	24.5	<0
1.6	+	60, 85, 70	72	-43	166, 180, 156	167	38.4	16.7	<0
8	+	105, 85, 75	88	-27	78, 86, 80	81	18.6	8.1	<0
40	+	75, 90, 80	82	-33	40, 62, 76	59	13.6	5.9	<0
200	+	65, 95, 80	80	-35	22, 28, 24	25	5.7	2.5	<0
1000	+	75, 85, 75	78	-37	24, 30, 20	25	5.7	2.5	<0
2AA(DMSO) 0.25	+	475, 425, 455	452	336	330, 364, 340	345	94.5	34.5	9.7
0.5	+	735, 675, 655	688	572	348, 352, 318	339	92.9	33.9	16.9
1.0	+	1255, 1160, 1300	1238	1122	308, 322, 332	321	87.9	32.1	35.0

☆: —; Without metabolic activation. +; With metabolic activation. SPS: Sørensen's phosphate buffer pH 7.2. DMSO: Dimethylsulfoxide Rt: Revertants in 1 ml of reaction mixture treated with NY-198 or positive controls. Rc: Revertants in 1 ml of reaction mixture treated with solvents. St: Survived cell number in 1 ml of reaction mixture treated with NY-198 or positive controls. IMF: Induced mutation frequency. AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide. 2AA: 2-Aminoanthracene.

文 献

- 1) 能美健彦, 松井道子, 石館 基: II, バクテリアを用いる誘発突然変異頻度の測定法, トキシコロジーフォーラム, 9: 189~198, 1986
- 2) 日本製薬工業協会・医薬品評価委員会・基礎研究部会・第三分科会・変異原性試験検討グループ・MFテスト検討サブグループ: II, 細菌を用いる誘発突然変異頻度試験: IMFテスト, トキシコロジーフォーラム, 9

: 531~539, 1986

- 3) MARON, M.D. & B.N. AMES: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, Mutation Res. 113: 173~215, 1983
- 4) 桶崎英一, 小池祥二, 牧野英一: NY-198の微生物を用いる変異原性試験. Chemotherapy 36 (S-2): 422~427, 1988
- 5) VOGEL, H.J. & BONNER, D.M.: Acetyl ornithinase of *E. coli*: Partial purification and some properties, J. Biol. Chem. 218: 97~106, 1956

INDUCED MUTATION FREQUENCY TEST ON NY-198 IN BACTERIA

YOSHIHARU WAKISAKA, YOUJI NISHIMOTO and AKIKO IZUMI

Shionogi Reseach Laboratories, Shionogi & Co., Ltd., Osaka 553, Japan

A new quinolone antibiotic, NY-198 was tested for mutagenicity in bacteria using an induced mutation frequency assay procedure (IMF-test). The IMF-test was performed with *S. typhimurium* TA100 and TA98 at concentrations of 0.32, 1.6, 8, 40, 200 and 1000 $\mu\text{g/ml}$ of NY-198 with and without metabolic activation.

NY-198 did not induce reversion of the testers at any concentration of the drug, regardless of metabolic activation. We conclude that NY-198 is negative on the IMF-test.