

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

田中 憲穂・山影 康次・斉藤 まり・原 巧・湍谷 徹

財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所

NY-198の染色体異常誘発能をチャイニーズ・ハムスター培養細胞 CHL を用いて検討した。

1) 細胞増殖抑制試験：チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL 細胞) に NY-198 を 0.8 μ g/ml から 100 μ g/ml の濃度範囲で処理した結果、直接法、代謝活性化法のいずれの方法によっても NY-198 の CHL 細胞に対する細胞増殖抑制は認められなかった。

2) 染色体異常試験：直接法により CHL 細胞に NY-198 を処理した結果、試験した 25, 50, 100 μ g/ml のいずれの処理濃度においても、24 時間処理群、48 時間処理群ともに染色体異常の有意な増加は認められなかった。また、代謝活性化法においても本剤処理群と溶媒対照群との間に染色体異常の有意な増加は認められなかった。

以上の結果より、NY-198 は今回実施した試験条件下で試験管内の CHL 細胞に染色体異常を誘起しないと考える。

NY-198 は北陸製薬株式会社中央研究所において新規に合成されたピリドンカルボン酸系の合成抗菌剤で、グラム陰性菌および陽性菌に対して *in vitro* で強力かつ広範な抗菌スペクトルを有している¹⁾。今回、安全性試験の一環として本剤の培養細胞に及ぼす細胞遺伝学的影響を評価するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL 細胞) を用いて試験管内染色体試験を実施したのでその結果を報告する。

I 実験条件および方法

1. 被験物質

NY-198 (北陸製薬株式会社提供：Lot No. ZF860) は白色の結晶性の粉末で水に溶けにくい性状を有する。使用時、それぞれの最終濃度が所定の濃度になるように、ジメチルスルホキシド (DMSO：Sigma 社；Lot No. 15F-0510) に懸濁したものを、下記の培養液で希釈して用いた。直接法の陽性対照として mitomycin C (MC：協和醗酵；Lot No. 271AEL)，代謝活性化法の陽性対照として cyclophosphamide (CP：Sigma 社；Lot No. 123F-0283) をそれぞれ培養液に溶解して用いた。

2. 使用した細胞

リサーチ・リソースバンク (JCRB) から分与 (昭和 61 年 8 月) されたチャイニーズ・ハムスター由来の CHL 細胞を、継代 10 代以内で試験に用いた。この CHL 細胞株は、染色体異常試験の検出感度に優れているために常用されている。

3. 培養液の調製と培養条件

培養には、牛胎仔血清 (GIBCO Laboratories) を 10% 添加した MEM 培養液を用いた。MEM 培養液は、イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末 (日水製薬) 9.4 g を 1 L の蒸留水に溶解し、121°C で 15 分間高圧滅菌したのち、L-グルタミン (滅菌済み、日水製薬) 300mg と 10% NaHCO₃ 溶液 12.5ml を加えて調製した。

全ての試験において、 2×10^4 個の CHL 細胞をシャーレ (径 6 cm, Lux, 培養液 5 ml を含む) に播き、37°C の CO₂ インキュベーター (5% CO₂) 内で培養した。

4. S-9 mix の調製

代謝活性化法において用いたラット肝ミクロゾーム分画 (S-9) はオリエンタル酵母製 (Lot No. 86082207) を用いた。S-9 mix は S-9 を 30% 含むように PBS, MgCl₂, KCl, G-6-P, NADP, 蒸留水を混合して調製した。

5. 細胞増殖抑制試験

培養開始後 3 日目に、直接法では培養液 5 ml と所定の濃度になるように調製した NY-198 調製液 50 μ l をシャーレに加えて 37°C で 48 時間処理した。また代謝活性化法では、培養液 2 ml と上記の S-9 mix 1 ml, NY-198 調製液 30 μ l をシャーレに加えて 37°C で 6 時間処理したのち、新鮮な 5 ml の培養液に交換し、更に 18 時間培養した。処理濃度は直接法、代謝活性化法ともに 0.8~100 μ g/ml の範囲内で行った。最高濃度 100 μ g/ml は、溶媒として用いた DMSO の限界量と、NY-198 の培養液中での

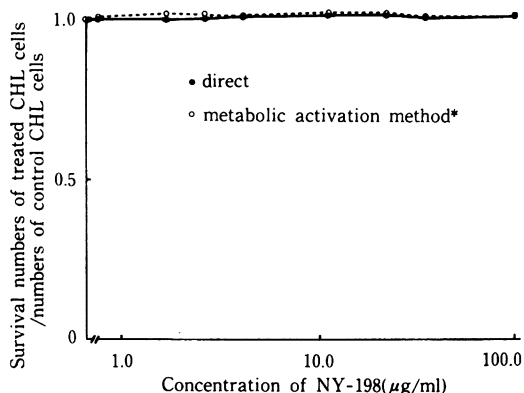


Fig. 1. Cell growth of Chinese hamster cells (CHL) treated with NY-198 by direct (37°C, 48h) and metabolic activation (37°C, 6–(18)h) methods. *: Cells were incubated with S-9 mix for 6h followed by an additional 18h after substitution with fresh culture medium.

懸濁状態から設定した。シャーレは1群について3枚用いた。

培養終了後、10%中性ホルマリン液で固定しギムザ液で染色した。

NY-198のCHL細胞に対する増殖抑制作用は、NY-198処理群の溶媒対照群に対する細胞増殖の比を指標とした。すなわち単層培養密度計（オリンパス）を用いて両群の増殖度を計測した。

6. 染色体異常試験

培養方法およびNY-198の処理は細胞増殖抑制試験と同じ条件で実施した。直接法ではNY-198の処理時間は24時間および48時間とした。代謝活性化法では、S-9 mixとNY-198を含む培養液で6時間培養し、新しい培養液に交換後さらに18時間培養した。各群2枚のシャーレを用い各シャーレ毎に染色体標本作製した。

培養終了2時間前にコルヒチン（和光純薬，Lot No ACK2836）を最終濃度が約0.1μg/mlになるように培養液に加え、所定時間経過後トリプシン溶液で細胞をシャーレからはがし、各シャーレの細胞を10mlの遠沈管に集めた。集めた細胞は1,000rpmで5分間遠沈し、上清を捨てたのち沈澱した細胞に3mlの0.075M KCl溶液を加えることにより約30分間低張処理を行なった。低張処理後、カルノア液（酢酸：メタノール＝1：3，v/v）約6mlを加えて固定し、その後1,000rpmで5分間遠沈した。この固定操作を数回繰り返し細胞浮遊液を得た。スライド標本を空気乾燥法により作製し、ギムザ染色した。染色体の分析は染色体型あるいは染色分体型のギャップ、

切断、交換などの構造異常の有無と倍数体（polyploid）の有無について観察し、構造異常については1群200個、倍数体については800個の分裂中期細胞を分析した。染色体異常の頻度について、溶媒対照群とNY-198処理群間の有意差検定（ χ^2 法）を行なった。NY-198の染色体異常誘発能についての最終判定は石館ら（1983）の基準に従った²⁾。

II 結 果

1. 細胞増殖抑制試験

NY-198を0.8～100μg/mlの濃度範囲でCHL細胞に処理した場合の溶媒対照に対する増殖抑制をFig.1に示した。直接法48時間処理、代謝活性化法6時間処理のいずれの濃度においてもNY-198による増殖抑制は認められなかった。したがって、染色体試験に用いる濃度を25、50および100μg/mlの各濃度とした。

2. 染色体異常試験

直接法による染色体分析の結果をTable 1に示した。

NY-198を24時間処理した25、50、100μg/mlのいずれの群においても染色体異常の有意な増加は認められなかった。48時間処理においても全処理群において染色体異常の有意な増加は認められなかった。

代謝活性化法においても、すべてのNY-198処理群で染色体異常の有意な増加は認められなかった（Table 2）。

一方、陽性対照群では、MC（直接法）およびCP（代謝活性化法）の両処理群ともにギャップ（chromatidおよびchromosome gap）、染色分体型の切断（chromatid break）、染色分体型の交換（chromatid exchange）などが高頻度に誘発された。

以上の結果から、NY-198は直接法、代謝活性化法のいずれの方法においても染色体異常の誘発は認められなかった。したがって、NY-198は上記の試験条件下で染色体異常を誘起しないと判定した。

III 考 察

NY-198は、ピリドンカルボン酸系の合成抗菌剤でグラム陽性、グラム陰性の好気性菌や嫌気性菌に対して優れた抗菌作用と殺菌作用を示す事が示されている¹⁾。

本物質の変異原性に関しては、Rec-assayや*Salmonella typhimurium*並びに*Escherichia coli*を用いた復帰突然変異試験が実施されており³⁾、そのうち、Rec-assayにおいては、構造的に本剤と類似の反応基をもつnalidixic acid⁴⁾やnorfloxacin⁵⁾と同様陽性の結果が得られ、これはこれらの薬剤に共通なDNA合成阻害作用に起因している事が示唆されている。また復帰突然変異試験では、直接法、代謝活性化法ともに突然変異誘発作

Table 1. Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL) treated with NY-198 by direct method (without metabolic activation)

Group	Dose (μg/ml)	Time of exposure (h)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations							No. of cells with aberrations		Judgement	Polyploid (%)	Judgement
				g	ctb	cte	csb	cse	other	total	TAG	TA			
Control\$		24	200	3	1				1 ^e	5	4	2			0.7
NY-198	0	24	200	2					2 ^a	4	4	2			1.2
NY-198	25	24	200		1				2 ^b	3	2	1	—		0.5
NY-198	50	24	200	1	1			1		3	3	2	—		0.7
NY-198	100	24	200	3				1	1 ^c	4	5	2	—		1.1
MC	0.1	24	200	43	197	142	6	6	39 ^d	414	164*	158*	‡		1.1
NY-198	0	48	200	1						1	1	0			0.7
NY-198	25	48	200	3	1					4	4	1	—		1.1
NY-198	50	48	200	1	2					3	3	2	—		0.7
NY-198	100	48	200	1						1	1	0	—		1.0

Abbreviations : g, chromatid gap & chromosome gap ; ctb, chromatid break ; cte, chromatid exchange ; csb, chromosome break ; cse, chromosome exchange (dicentric and ring etc.) ; TAG, total no. of cells with aberrations ; TA, total no. of cells with aberrations except gap ; MC, mitomycin C a : 2 premature chromosome condensations ; b : 2 fragments ; c : shattered chromosome ; d : deletion, 19 fragments and 19 shattered chromosomes ; e : fragment

Shattered chromosome : cells with more than 10 aberrations, those were excluded from total no. of aberrations ; Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1983)

* : Significantly different from solvent control at p<0.05

\$: Untreated

Table 2. Results of chromosome analysis of Chinese hamster cells(CHL) treated with NY-198 by metabolic activation

Group	Dose (μ g/ml)	S-9 exposure (h)	Time of exposure \$	No. of cells analysed	No. of structural aberrations						No. of cells with aberrations		Judgement	Polyploid (%)	Judgement	
					g	ctb	cte	csb	cse	other	total	TAG				TA
NY-198	0	-	6-(18)	200	1	1			1	2 ^a	5	4	3		0.7	
NY-198	25	-	6-(18)	200	1						1	1	0		1.0	-
NY-198	50	-	6-(18)	200	1			1	1		3	3	2		1.3	-
NY-198	100	-	6-(18)	200		1			1		2	2	2		1.0	-
CP	20	-	6-(18)	200	1				1		2	2	1		0.6	-
NY-198	0	+	6-(18)	200	1		1		1		3	3	2		1.7	
NY-198	25	+	6-(18)	200	2			1			3	3	1		1.8	-
NY-198	50	+	6-(18)	200	1				4		5	5	4		2.3	-
NY-198	100	+	6-(18)	200	2	1					3	3	1		2.0	-
CP	20	+	6-(18)	200	15	31	51	1	4	14 ^b	113	76*	70*	†	1.0	-

Abbreviations : g, chromatid gap & chromosome gap ; ctb, chromatid break ; cte, chromatid exchange ; csb, chromosome break ; cse, chromosome exchange (dicentric and ring etc.) ; TAG, total no. of cells with aberrations ; TA, total no. of cells with aberrations except gap ; CP, cyclophosphamide

a : 2 fragments ; b : 11 fragments and 3 shattered chromosomes

Shattered chromosome : cells with more than 10 aberrations, those were excluded from total no. of aberrations; Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1983)

* : Significantly different from solvent control at $p < 0.05$

§ : Cells were incubated with S-9 mix for 6h followed by an additional 18h after substitution with fresh culture medium.

用はみられていない³⁾。

今回実施した NY-198 の哺乳動物細胞を用いた染色体試験においても直接法、代謝活性化法ともに染色体異常の誘発はみられないことより、本剤はバクテリアの DNA に対する初期障害の可能性は示唆されるものの、哺乳動物細胞において染色体異常を誘発する可能性はないものと考えられる。

IV 結 語

本実験の結果より、NY-198 の細胞に対する増殖抑制作用はみられず、変異原に対し高感度な細胞として常用される CHL 細胞を用いる染色体試験においても、直接法、代謝活性化法ともに染色体異常の有意な増加は認められなかった。このことより NY-198 は染色体異常を誘発する作用はないと考えられる。

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) 石館 基監修: 試験法の概略, pp I~IX, [チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる] 染色体異常試験データ集, リアライズ社, 1983
- 3) 桶崎英一, 小池祥二, 牧野栄一: NY-198 の微生物を用いる変異原性試験. Chemotherapy 36 (S-2): 422~427, 1988
- 4) KADA, T; Y. SADAIE & K. TUTIKAWA: *In vitro* and host-medicated "rec-assay" procedures for screening chemical mutagens and phloxine, a mutagenic red dye detected. Mut. Res. 16: 165~174, 1972
- 5) 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

CYTOGENETIC TESTS OF NY-198 IN CULTURED CHINESE HAMSTER CELLS

NORIHO TANAKA, KOHJI YAMAKAGE, MARI SAITO, TAKUMI HARA
and TOHRU SHIBUYA

Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Hatano

NY-198 was tested for the induction of chromosome abnormalities in cultured Chinese hamster cells (CHL).

1) Cell-growth inhibition test *in vitro*

NY-198 had no effect on cell-growth inhibition of CHL by either the direct or metabolic activation method when given in a range of 0.8-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2) Chromosome aberration test

NY-198 induced no significant increase in chromosome aberrations at concentrations of 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in either of the 24- and 48-h treatment groups by the direct method, nor significant increase in chromosome aberrations in either the test or medium control groups by the metabolic activation method.

The foregoing results suggest that NY-198 does not induce *in vitro* chromosome abnormalities in Chinese hamster cells under the conditions of the present test.